

DIPLOMADOLGOZAT

Vig András

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Élelmiszertudományi Kar

Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

**Élelmiszerbiztonsági és -minőségi mérnök
mesterképzési szak**

**Élelmiszeriparban alkalmazható tanninkivonatok
zsíremészthetőségre**

gyakorolt hatásának vizsgálata

Belső konzulens:	Dr. Tormási Judit egyetemi tanár
Belső konzulens intézete/tanszéke:	Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék
Külső konzulens:	-

Készítette:	Vig András
--------------------	-------------------

Budapest

2023

Tartalom

1. Bevezetés és diplomamunka célja	1
2. Irodalmi áttekintés.....	2
2.1. Elhízás és zsírbevitel összefüggése	2
2.2. Zsírok.....	3
2.2.1. Étkezési zsírok.....	3
2.2.2. Telített zsírsavak (SFA).....	4
2.2.3. Egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA).....	4
2.2.4. Omega-3 és omega-6 zsírsavak (PUFA).....	4
2.2.5. Transzzsírsavak	5
2.3. Az emésztés folyamata és zsírok emésztése	5
2.4. Emésztésszimulációs modellek és jelentőségük	8
2.4.1. <i>In vitro</i> emészthetőségi vizsgálatok típusai.....	8
2.4.2. Infogest módszer	9
2.5. Tanninok	10
2.5.1. Tanninok csoportosítása	11
2.6.2. Kondenzált tanninok	14
3. Anyagok és módszerek.....	16
3.1. Felhasznált anyagok	16
3.2. További felhasznált anyagok.....	18
3.3. Felhasznált eszközök	18
3.4. Mérés menete	18
3.5. Mintaelőkészítés.....	18
3.6. Emésztésszimuláció.....	19
3.7. Származékképzés GC-FID mérést megelőzően.....	20
3.7.1. Gyors módszer.....	20
3.7.2. Általános módszer	21
3.8. GC-FID.....	21

3.9. Lipáz aktivitás mérése	22
3.9.1. Lipáz aktivitás mérése inaktiválás utáni titrálással	23
3.10. Lipáz aktivitás mérése pH-stat módszerrel.....	25
3.10.1. Pankreatin.....	25
3.10.2. RGE	26
3.11. Fehérjekicsapás	26
3.12. Proantocianidin tartalom meghatározása.....	27
3.13. Statisztikai értékelés	28
4. Kísérleti eredmények és értékelésük	29
4.1. Proantocianidin mérés eredménye	30
4.2. Emésztésszimulációs eredmények	30
4.2.1. Hozzáférhető zsírsavtartalom.....	30
4.2.2. Zsírsav-specifikus emészthetőség	32
4.3. Lipáz aktivitás mérésének eredményei (inaktiválás utáni titrálással)	34
4.4. Lipáz aktivitás mérésének eredményei (Grundy et al., 2021 alapján)	36
4.5. Fehérjekicsapás eredményeinek kiértékelése	38
5. Következtetések és javaslatok	43
5.1. Következtetések	43
5.2. Javaslatok.....	45
6. Összefoglalás	46
7. Irodalmi hivatkozás.....	48

1. Bevezetés és diplomamunka célja

A manapság egyre nagyobb jelentőséggel bíró elhízás, és annak egészségügyi kockázatai arra késztették az élelmiszeripar résztvevőit, hogy egészségmegőrző hatású élelmiszerekkel álljanak elő. Erre a célra számos módszer létezik, melyek közül az egyik lehetséges megoldás, az ételek/élelmiszerek tápértékének módosítására, kedvezőbbé tételére irányuló törekvés.

Az elhízás egyik legnagyobb okozója a túl magas zsírfogyasztás. Mivel azonban a fogyasztók már kialakítottak egy preferenciát az élelmiszerekkel kapcsolatban, ezért ahelyett, hogy azokat belsőleg változtatnák meg, különböző összetevők vagy adalékanyagok hozzáadásával tesznek annak érdekében, hogy a kívánt hatást elérjék, amellet, hogy megtartsák vásárlóikat.

Egy ilyen potenciális megoldással szolgálhatnak a tanninok is. A tanninokat már régóta használják borok készítése során, ahol fehérjekicsapó hatásukat érvényesítik. Emellett egyre több tannintartalmú állati takarmányt is módosítanak, itt azonban mivel az állatok tömegnövelése a cél, ezért csökkentik a tannintartalmat. Ez alapján elmondható, hogy a tanninoknak többféle, akár ellentétes hatása is lehet az ételek tápértékére. Ebből kifolyólag szerettem volna tesztelni, hogy a tanninoknak milyen hatása van a tápanyagok emészthetőségére, a zsíremészthetőségre fókuszálva.

A munkám fő célja, hogy meghatározzam van-e a kiválasztott tanninoknak hatása a zsíremészthetőségre, és ha igen, milyen mértékben és hogyan. Erre a célra három, kereskedelmi forgalomban is kapható tannint választottam, melyek összetételüket tekintve eltértek egymástól, ellagitannin, gallotannin és kondenzált tannin, így a különböző típusú tanninok specifikus hatása is feltérképezhetővé vált.

Első lépésben magukat a tanninkivonatokat vizsgáltam, mely során igazolni akartam az összetételüket, hogy valóban csak az előírt típusú tanninokat tartalmazzák-e. Erre a célra a proantocianidin-tartalmukat vizsgáltam meg. Ezt követően *in vitro* emésztésszimulációt alkalmaztam, hogy ellenőrizzem helyes-e a hipotézis, miszerint a tanninok befolyásolják a zsíremészthetőséget. Az emésztésszimuláció során a zsiradékot sült marhahús mátrix szolgáltatva. A tanninok hatását ezután egy enzimaktivitás teszttel vizsgáltam, ahol arra szerettem volna választ kapni, hogy a zsíremésztést végző enzimekre mekkora hatása van a különböző tannin kivonatoknak. Végül összefüggést kerestem a tanninok jól ismert fehérjekicsapó tulajdonsága és a zsíremészthetőségre gyakorolt hatása között.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Elhízás és zsírbevitel összefüggése

Köztudott, hogy a túlsúly (BMI: 25-30) és az elhízás (BMI: 30+), valamint a kapcsolódó egészségügyi problémák előfordulása, a túltápláltság következtében egyre nő (Norton et al., 2014). Ennek egyik fő tényezője a nagy zsírtartalmú ételek túlzott fogyasztása. Ugyan az emberek kezdik realizálni a megnövekedett zsírbevitel miatt előforduló kockázatot, teljes mértékben azonban nem tanácsos a zsírokat kizárni az étrendből, hiszen az egészséges anyagcsere működéséhez is elengedhetetlen bizonyos mennyiségű zsír bevitel.

Az elfogyasztott zsírok (szobahőmérsékleten szilárd zsiradékok) és olajok (szobahőmérsékleten folyékony zsiradékok) mennyisége és zsírsavösszetétele pozitív és negatív táplálkozásélettani jelentőséggel is bírhat. Fontos szerepet játszanak a zsírban oldódó vitaminok felszívódásában (A, D, E és K-vitamin), emellett az esszenciális zsírsavak (melyeket a szervezet nem képes előállítani) csak a táplálkozással kerülnek bevitelre. Azonban a telített zsírsavak túlzott fogyasztása a szív- és érrendszeri betegségek fokozott kockázatával járhat (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), 2010). Az ajánlott napi energiabevitel minimum 20%-át, maximum 35%-át kell, hogy fedezzék a zsírok és olajok, mely egy 2000 kcal-ás étrend esetében, egy 70 kilogrammos egyénnél minimum 0,6 g/ttkg, maximum 1,1 g/ttkg zsírbevitt jelent (EFSA, 2017).

Ennek a megoldására jöttek létre, és kezdenek világszerte elterjedni az olyan élelmiszerek, amelyek csökkentett energiatartalmúak (például csökkentett zsír- vagy cukortartalmúak), vagy amelyek pozitív hatással vannak az étvágyra az étkezésen belüli telítettség, és az étkezés utáni jóllakottság fokozása révén (és következésképpen hatással vannak az energiaszabályozásra), és mindkettő jótékony hatással lehet a testsúlycsökkentésre, és az elhízás előfordulására (Norton et al., 2014).

Egyes kutatások azt is kimutatták, hogy az ízekre és aromákra való reagálás során adott érzékszervi reakciók a sovány és elhízott emberek között eltér. A zsíros jellegre adott válaszok negatívan korrelálnak a túlsúlyosság mértékével; az elhízott személyek bizonyítottan a magas zsírtartalmú (>34% zsír) élelmiszereket kedvelik, míg a normál testsúlyúak a ~20% zsírt tartalmazó élelmiszereket (Bartoshuk et al., 2006; Drewnowski et al., 1985). A következő fejezetekben a zsírok részletesebb bemutatása fog következni.

2.2. Zsírok

A zsírok szükséges alkotóelemei a kiegyensúlyozott táplálkozásnak, hiszen amellett, hogy energiát biztosítanak, számos alapvető élettani mechanizmusban is részt vesznek. Lipideknek azon szerves molekulák összességét hívjuk, amelyek fizikai tulajdonságaikat tekintve legalább részben hidrofóbok. Szerkezetük jelentősen különbözhet egymástól, azonban a többi makromolekula-csoporttól eltérően nem alkotnak polimereket. A lipidek számos egyéb vegyület alkotásában vesznek részt, többek között a sejtmembrán alkotóelemei (foszfo- és glikolipidek), szterinek (koleszterin, koleszterol), terpének és származékaik (karotinoidek, klorofill, növényi illó olajok), epesavak, szteroid hormonok (tesztoszteron, ösztrogén, kortikoszteroidok), és prosztaglandinok (Fritz et al., 2018).

Az étrendi zsírok alatt a triacilglicerineket, foszfolipideket és a koleszterint értjük, azonban étkezési zsíradékok legnagyobb részét (>95% (Field és Robinson, 2019)), a glicerinnel zsírsavakkal alkotott háromszoros észterei, triacilglicerinek adják. Biokémiai szempontból zsírsavnak tekintünk minden olyan karbonsavat, mely a lipidekben előfordul. Az emlősökben gyakran előforduló természetes zsírsavak száma tíz körüli tehető, ezzel szemben az egész élővilágban körülbelül 100-féle zsírsav található meg. A szervezetben a zsírsavak szabad állapotban nagyon kis koncentrációban vannak jelen, leggyakrabban különböző fehérjékhez kapcsolódnak. Nagy mennyiségben találhatóak a neutrális zsírokban, olajokban, foszfo- és glikolipidekben, valamint viaszokban (Mandl, 2006).

Éhezéskor, valamint szimpatikus idegrendszeri hatásokra, olyan hormonok elválasztására kerül sor, melyek aktiválják a zsírsejtek zsírbontó enzimét, így a zsírsavak felszabadulnak a triacilglicerinekből. Ennek a folyamatnak a neve a lipolízis. A zsírsavak oxidációja jelentős energiaszabadulással jár, mivel 1 g triacilglicerinnel 40 kJ energiát jelent. Túltápláláskor a zsírsavak triacilglicerinnel formájában történő deponálásához vezet a zsírszövetben. Ez az állapot a zsírszövet felszaporodásához, ezáltal elhízáshoz vezet, mely számos betegség kockázati tényezője.

2.2.1. Étkezési zsírok

Az étrendi zsírokat leggyakrabban a bennük található kettős kötések alapján csoportosítjuk. A telített zsírsavakban nem található kettős kötés (SFA), míg az egyszeresen telítetlen zsírsavakban egy (MUFA), a többszörösen telítetlen zsírsavakban (PUFA) több kettős is előfordulhat. Ezek a kettős kötések cisz, illetve transz formában is előfordulhatnak, azonban leggyakrabban a cisz konfiguráció jellemző az étrendi zsírsavakra (EFSA, 2017). A beviteli

ajánlásokat szeparáltan is meg szokták adni a különböző zsírsavakra, valamint a transzzsírokra. Ennek okán a többszörösen telítetlen zsírokat további kategóriákra osztják: omega-6 zsírsavak, omega-3 zsírsavak, és hosszú láncú omega-3 zsírsavak (20-nál nagyobb szénatomszámú zsírsavak). Az ajánlások szerint célszerű a zsírokból történő energiát 1/3 arányban SFA-ból, 1/3 arányban MUFA-ból és 1/3 arányban PUFA-ból fedezni (Rodriguez et al., 2009).

2.2.2. Telített zsírsavak (SFA)

A telített zsírsavak (pl. palmitinsav (C16:0), sztearinsav (C18:0), vajsav (C4:0)) előállítására képes a szervezetünk, így nem szükséges táplálékkal bevinni őket. Pozitív, dózisfüggő kapcsolatot véltek felfedezni a telített zsírbevitel és a vér LDL koleszterin szintje között. A nagy mennyiségben telített zsírokat tartalmazó ételek fogyasztásának csökkentése, illetve omega-6 tartamú zsírsavakra történő cseréje csökkenti a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázatát. A legújabb ajánlásoknak megfelelően amennyire csak lehetséges, csökkentsük a bevitelüket, melyek állati eredetű termékekben fordulnak elő legnagyobb mennyiségben (EFSA, 2017).

2.2.3. Egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA)

Az egyszeresen telítetlen zsírsavakat (palmitinolajsav (C16:1n-7c), olajsav (C18:1n-9c), nervonsav (C24:1n-9c) szintén képes előállítani a szervezetünk, így nem nélkülözhetetlen összetevői az étrendnek. Nem találtak összefüggéseket annak kapcsán, hogy megelőző hatásuk lenne a táplálkozással összefüggő betegségek szempontjából (EFSA, 2017).

2.2.4. Omega-3 és omega-6 zsírsavak (PUFA)

Az omega-3 zsírok családjába tartozik az alfa-linolénsav (ALA, C18:3n-3c), eikozapentaénsav (EPA, C20:5n-3c), és dokozahexaénsav (DHA, C22:6n-3c), melyek esszenciális zsírsavaknak számítanak, hiszen a szervezet nem képes előállításukra, és nélkülözhetetlenek a metabolikus egyensúlyhoz. Képesek csökkenteni a szív- és érrendszeri betegségek kockázatát azáltal, hogy csökkentik a vér triacilglicerinné szintjét, plakk-képződést és a vérnyomást. Továbbá gyulladásgátló hatásuk van, közrejátszanak az immunrendszer megfelelő működésében, és a sportteljesítményre is pozitívan hatnak. Napi 250 mg EPA és DHA, vagy heti két alkalommal történő halfogyasztás sikeres lehet a primer prevencióban egészséges egyéneknél. A DHA fő forrásai a tengeri halak és a tenger gyümölcsei. A szervezet képes előállítani EPA-t és DHA-t az ALA-ból, viszont nagyon kis mennyiségben

(EPA ~8%, DHA ~0,5%), így önmagában az ALA fogyasztás nem képes számottevő emelkedést okozni a vér DHA szintjében. Fő ALA források: lenmag, chiamag, kendermag, dió (Rogerson, 2017).

A többszörösen telítetlen omega-6 zsírsavakat (linolsav; C18:2n-6c) nem képes a szervezet előállítani, így szintén esszenciálisnak minősülnek. Az arachidonsavat (C20:5n-6c) képes szervezetünk szintetizálni linolsavból, így nem tekinthető esszenciálisnak, viszont meghatározó szerepet játszik a szervezet metabolikus állandóságában. Pozitív, dózisfüggő kapcsolat feltételezhető a bevitt omega-6 zsírok és a HDL koleszterinszint között. Legfontosabb omega-6 források: pálmaolaj, napraforgóolaj, repceolaj, szójaolaj, szárnyasok, olajos magvak, tojás, gabonafélék (EFSA, 2017).

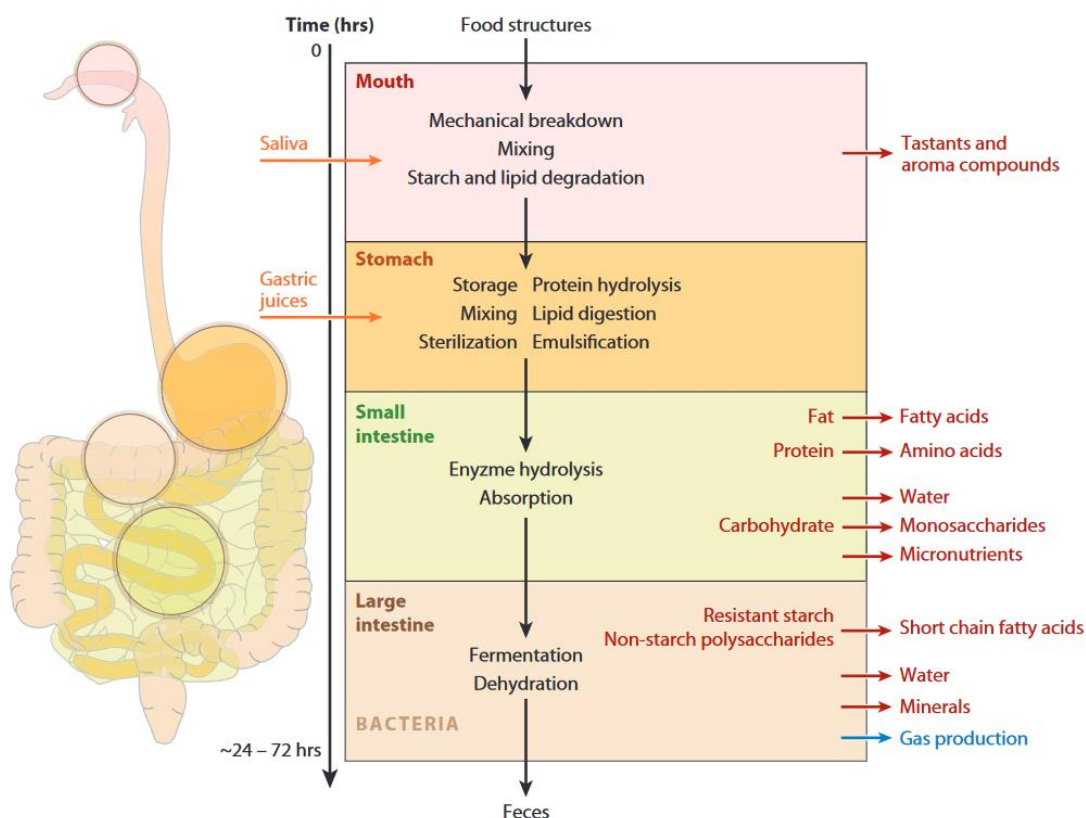
2.2.5. Transzzsírsavak

A transzzsírsavak előállítására nem képes a szervezetünk, illetve nincs is szükségünk fogyasztásukra. A rendelkezésre álló adatok azt mutatják, hogy a kérődző állatokból származó transzzsírsavak ellentétes hatást gyakorolnak a vérzsírparaméterekre, mint az élelmiszeripari gyártás során keletkezett verziók abban az esetben, ha azonos mennyiségben fogyasztják őket. Egyes tanulmányok azt mutatták, hogy a magasabb transzzsírsavbevitel és a nagyobb szív- és érbetegség-kockázat között pozitív kapcsolat áll fenn. Ennek kapcsán megállapítottak egy olyan maximális határértéket (<1% a teljes energiabevitelnek, illetve a lehetőségek szerinti legalacsonyabb bevitel), mellyel csökkenteni lehet a transzzsírsavak bevitelét, ugyanakkor nem sérül az esszenciális tápanyagok mennyisége (EFSA, 2017). Ezzel a felismeréssel párhuzamosan olyan kampányokat és politikai intézkedéseket vezettek be, melyekkel az élelmiszeripart és éttermeket arra ösztönözték, hogy csökkentsék az élelmiszerek transzzsírsavtartalmát azáltal, hogy alternatív zsírokra cserélik. Ezt azonban jellemzően telített zsírokkal oldják meg (pálmazsír, kókuszzsír), így növekedni fog az adott élelmiszer telítettzsír-sav-tartalma (Mozaffarian et al., 2010).

2.3. Az emésztés folyamata és zsírok emésztése

Amellett, hogy csak az elfogyasztott élelmiszerben lévő zsírsavak mennyiségére összpontosítanánk, relevánsabb képet kaphatunk, ha a zsírsavak emészthetőségét is figyelembe vesszük.

Az emésztés során különböző szakaszokat különítünk el egymástól, ezek a száj, gyomor, vékonybél és vastagbél, ahogy azt az 1. ábra is mutatja.



1. ábra A táplálékszerkezeteknek a szájon, a gyomron, a vékony- és vastagbélben (itt szakaszos reaktorok sorozatának tekintve) való áthaladásának vázlata, szemléltetve az egyes szakaszokban végbemenő folyamatokat, valamint az emésztett és felszívódott tápanyagok (Topping & Clifton, 2001).

A folyamat a táplálék szájba kerülésével kezdődik. A falat szájba jutását követően a nyelvünk feladata, hogy a táplálékot a zápfogak közé juttassa. Itt az étel darabolása (rágása) következik be (ami lehetővé teszi az íz- és aromavegyületek felszabadulását is, amelyek az ízélményünket biztosítják), majd a nyelv a megrágott falatot a bólusba gyűjti, amelyet hátrafelé, a gégefedő felé hajt, végül lenyelésre kerül. A száj nem csak egy mechanikus eszköz, hanem egy kémiai folyamatok színtere is. A nyálmirigyek nyálát szállítanak, amely aktív enzimeket (α -amiláz) tartalmaz a keményítők hidrolíziséhez, valamint a zsírok és olajok emulgeálására képes glikoproteineket. A hatóanyagok bejutását nemcsak az élelmiszer mechanikai tulajdonságai, hanem az íz (a rágás során jelen lévő vagy felszabaduló

íz- és aromaanyagok) is szabályozza (Norton et al., 2014). A szájból a gyomorba kerülnek az anyagok a nyelőcsővön keresztül.

A gyomor tárolóedényként működik, amelyben a szájból érkező táplálékot tovább bomlik, és keveredik a gyomormirigyek által kiválasztott gyomorsavat és emésztőenzimeket tartalmazó emésztőnedvekkel. Anatómiailag a gyomor négy fő szakaszra oszlik: a gyomorfenékre, a gyomortestre, az antrumra és a pylorusra (Widmaier et al., 2019). A gyomorban az emésztés során jellemzően előforduló pH $\sim$ 1,2. A táplálék és a gyomornedvek eredő keverékét chyme-nak nevezzük, amely egy változatos reológiai tulajdonságokkal rendelkező, vizes oldatból, lipid fázisból és szilárd részecskékből álló iszapos elegy. Ebben a szakaszban történik főként a fehérjék emésztése, melyet a pepszin gyomorsavval alkotott elegye segíti. Emellett kismértékben a zsíradékok bontása is elkezdődik, méghozzá a gyomorban termelődő lipáz enzim hatására. Az emésztésnek csak kis része történik a gyomorban (kb. 10-40%), bár jelentős mennyiségű strukturális lebontás történik. A gyomorból kilépő táplálék állapota befolyásolja a vékonybélben való viselkedést.

A szakasz végén megtörténik a savas nyák szállítása a vékonybélbe, ahol a korábban alacsony pH-érték semlegesítése megtörténik (George & Abraham, 2006). A gyomorból kilépve az étel a nyombélbe (a vékonybél első szakaszába) kerül, ahol a tápcsatorna elkeveredik az epével és a hasnyálmirigy váladékával. Ezután a jejunumba (a vékonybél középső szakasza) kerül, ahol számos emésztési reakció zajlik, mint például a fehérjék lebontása aminosavakká, szénhidrátok lebontása oligo- és monoszacharidokká, és a triacilglicerinek bontása zsírsavakra és monacilglicerinekre. A vékonybél harmadik szakaszában (ileum) már nagyrészt csak a felszabadult makro- és mikrotápanyagok felszívódása zajlik. A bélfalak mozgása felelős a chyme és a váladék keveredéséért, és lehetővé teszi, hogy a molekulák a falak felé mozogjanak a véráramba való felszívódás érdekében.

Az felszívás után visszamaradt anyag ezután a vastagbélbe kerül. Itt a maradék víz felszívódik, és a használhatatlan táplálékanyag távozik a szervezetből. A vastagbélben történtek szempontjából kulcsfontosságúak a baktériumok; ezek okozzák az emberi folyamatok által megemészthetetlen anyagok lebontását, és így a gazdaszervezet egészsége szempontjából kulcsfontosságú összetevőket (például rövid szénláncú zsírsavakat) szabadítanak fel (Norton et al., 2014).

2.4. Emésztésszimulációs modellek és jelentőségük

Az emésztés összetett biokémiai folyamatrendszer, melynek fiziológiai körülményeit igen nehéz pontosan reprodukálni. A táplálkozással kapcsolatos kérdésekre, a legpontosabb válaszokat, humán vizsgálatokkal kaphatjuk meg. Az élelmiszerek *in vivo* emésztésének tanulmányozása (klinikai vizsgálatokkal, állatkísérletekkel) azonban erőforrás-igényes, és sokszor etikailag is megkérdőjelezhető tevékenység (Jyothi Lakshmi et al., 2006; Verhoeckx et al., 2019). Az állatmodellek élettani folyamatai nem mindig feleltethetők meg az emberi szervezetben lejátszódó élettani folyamatoknak, az eredmények értelmezését és a kísérlet reprodukálhatóságát pedig megnehezíthetik a kísérleti egyedek közti nagy különbségek (Guerra et al., 2012).

Emiatt a szimulált *in vitro* gasztrointesztinális emésztést széles körben alkalmazzák az élelmiszer- és táplálkozástudomány területén. Az *in vivo* vizsgálatokkal szemben az *in vitro* módszerek előnyei, hogy költséghatékonyak, kevésbé munkaigényesek, nincs etikai korlátjuk, gyorsabbak, egyszerűbben kezelhetők, kisebb kockázatúak, és kevesebb felelősséggel járnak (Levi és Lesmes, 2014). Az *in vitro* emészthetőségi vizsgálatok információt szolgáltathatnak a vizsgált tápanyagok biológiai hozzáférhetőségéről (Fernández-García et al., 2009).

2.4.1. *In vitro* emészthetőségi vizsgálatok típusai

A kísérletek tervezése során a vizsgálati célnak megfelelő *in vitro* modellt kell kiválasztani, akár egy-egy emésztési fázis modellezése is indokolt lehet. A módszer kiválasztását segíti, ha figyelembe vesszük, hogy az adott emésztési modellt korábban milyen mintákra validálták. Három fő csoport különíthető el: a dinamikus, a szemi-dinamikus, illetve a statikus. A dinamikus modellek hatékonyabban alkalmazhatók az élettani vizsgálatok során, mint a statikusak. Azonban sokkal összetettebbek is, valamint működtetésükhöz nagy mennyiségű minta szükséges. Alkalmazásuk korlátozott, mivel a használatuk több költséget, munkát és időt igényel, mint a statikus modelleké (Brodkorb et al., 2019). Az emésztés dinamikus folyamat, a tápcsatornába kerülő élelmiszer változó sebességgel halad annak szerkezetétől, reológiai és egyéb tulajdonságaitól függően, és a fizikai-kémiai körülmények (változó pH, ionerősség, emésztőenzim koncentrációk) szintén befolyásolják a hatékonyságát. Ezeket a folyamatbeli változásokat a dinamikus modellek figyelembe veszik. Emésztési modellek legnagyobb része statikus (~89%) (Lucas-González et al., 2018). A statikus modellezésnél a fizikai folyamatok (rágás, nyírás, keverés, hidratáció, változó

paraméterek: pl. idő) csak korlátozottan imitálhatóak. Ebből kifolyólag bizonyos folyamatok, mint a gasztrointesztinális traktus komplexitása statikusan nem modellezhető. Ennek ellenére az időhatékonyság és költséghatékonyság érdekében előnyt élveznek. A szemi-dinamikus emésztési protokollok az egyszerű statikus modellek és a bonyolultabb, költségesebb dinamikus rendszerek közötti kompromisszumot képviselik. Ezek esetén a gyomor-szakaszt dinamikusan modellezzük, amelyet egy statikusan modellezett vékonybél fázissal vonnak össze (Verhoeckx et al., 2019).

2.4.2. Infogest módszer

A COST INFOGEST FA1005 Akció 2011-ben indult (2011-2014) „*European Cooperation in Science and Technology: Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process, Project No. Food & Agricultural 1005*” címmel, amelynek feladata vezető európai intézetekből álló hálózat felépítése volt, közös célja pedig az élelmiszerek emésztése, a tápcsatornában történő lebomlási folyamatok teljeskörű megismerése. A hálózat tagjai különböző szakmai háttérrel rendelkező kutatók, úgymint élelmiszermérnökök, gasztroenterológusok, táplálkozástudományi szakemberek, immunológusok, élelmiszeripari szakemberek voltak, így a téma több szemszögből is megközelíthetővé vált. A projektben kitűzött célok érdekében az *in vitro* és *in vivo* mérések közötti összefüggések feltárásához szükség volt a publikált *in vitro* emésztési modellek összehangolására és szabványosítására. A különböző modellrendszerek eltérő körülményeket alkalmaztak, ami lehetetlenné tette a különböző emésztési vizsgálatokkal kapott eredmények összehasonlítását, így ellentmondásos következtetésekhez vezethetett (Antal et al., 2020; Buggenhout et al., 2010).

Erre jelent megoldást a számos *in vitro* emésztési protokoll összefésült változatai alapján standardizált INFOGEST *in vitro* humán emésztési modell, amely egészséges felnőttek emésztését a száj-gyomor-vékonybél fázisokon keresztül modellezi. A harmonizált protokollban figyelembe vették az eddig alkalmazott emésztési modelleknél tapasztalt előnyöket és hátrányokat a valós körülmények lehető legjobb megközelítése érdekében (Claude et al., 2019).

A gyakorlatban való megvalósítás során a szájból 2 perces, gyomorban és vékonybélben 2 órás 37 °C-on zajló reakcióidőt javasoltak. A megfelelő fiziológiás körülményeket mesterséges emésztőnedvek garantálják, amelyek összetétele elektrolit törzsoldatból, enzimekből, CaCl₂-ből és vízből áll. A szimulált nyálfoladék pH-ja 7,0, a szimulált

gyomorfoliadék pH-ja 3,0 és a szimulált vékonybélfoliadék pH-ja 7,0. A szimulált emésztőnedvek minden emésztési fázisnál állandó arányban (50:50 v/v) kerülnek a száj/gyomor/vékonybél tartalmakhoz; az emésztőenzimek aktivitása, valamint a vékonybélfoliadékban használt epe kivonat koncentrációja (100 mM) a feltételezett fiziológias körülményeknek megfelelően szintén standardizált (pl. alfa-amiláz 75 U/ml, pepszin 2000 U/ml, pankreatin 100 TAME U/ml). A vékonybél fázis során a pankreatin mennyiségét általában a tripszin aktivitása határozza meg (Minekus et al., 2014). Ha a célkitűzések alapján a lipid vagy szénhidrát emésztés vizsgálatnak nagyobb jelentősége, vagy az enzim aktivitást pontosan kell szabályozni, a pankreatin helyett lehet egyedi enzimeket is (tripszin, kimotripszin, α -amiláz, lipáz és kolipáz) alkalmazni. Az egyedi enzimek alkalmazásának hátránya az, hogy a protokoll kivitelezése során kimaradnak az olyan pankreatikus proteázok, mint az elasztáz és a karboxipeptidáz, amelyeknek meghatározó szerepe lehet bizonyos bioaktív peptidek vizsgálata esetén (Alminger et al., 2014; Brodkorb et al., 2019).

Az emésztés módosítását természetes növényi anyagokkal már több kutatás is vizsgálta. Az egyik ilyen anyag a tannin is. Az eddigi kutatások célja főként a takarmányok tannintartalmának csökkentése köré összpontosult, mivel a tanninok rontják bizonyos komponensek emészthetőségét. Ilyenek például a fehérjék vagy a nyers rostok (Nelson et al., 1975; Pan et al., 2023). Ez magyarázható azzal, hogy a tanninok reverzibilis vagy irreverzibilis komplexet képeznek az adott komponenssel, illetve az enzimeket is inaktívalhatják (Griffiths, 1986). Mivel romlik az emésztés, ezért ez természetesen az energiatartalomra is hatással van. Az eddigi kísérletek azonban nem tértek ki különösképpen a tanninok zsíremészthetőségre gyakorolt hatására. Mivel ez egy rendkívül összetett molekulacsoport, mely molekulák jelenléte előnyös vagy hátrányos tulajdonsággal is bírhat, a további fejezetekben a tanninokról lesz szó, illetve azok hatásáról az emberi szervezetre.

2.5. Tanninok

A tanninok polifenolok (Haslam, 1989). Bár eredetileg a „tannin” elnevezést a fanyarságot mutató növényi kivonatoknak adták, anélkül, hogy kémiai szerkezetüket ismerték volna, a tanninokat más típusú növényi polifenoloktól megkülönböztető jellemzőik, éppen a fanyarságot okozó komponensekből adódó tulajdonságaik. Ilyen tulajdonságuk a kötődés a fehérjékhez, bázisos vegyületekhez, pigmentekhez, nagy molekulájú vegyületekhez és fémionokhoz, valamint antioxidáns hatás. A tanninok e tulajdonságai minőségi és

mennyiségi analitikai különbségeket eredményeznek a tanninok és más polifenolok között. A polifenolok általános elemzésétől eltérően a tanninok mennyiségi meghatározása a fent említett kötőtevékenységükön alapul. Ilyenek például a klasszikus bőrpor-módszer, mely az állati bőrfehérjéhez való kötődésen alapul, az RA (relatív fanyarság) és az RMB (metilénkékhez való relatív affinitás) meghatározások, melyek pedig a vérhez, illetve a metilénkékhez való kötődésen alapulnak, ellenőrzött pH mellett (Okuda et al., 1985). A tanninok ezen tulajdonságai kémiai szerkezetükön alapulnak, amely két vagy három fenolos hidroxil-csoportot tartalmaz egy fenil-gyűrűn, egy közepesen nagy méretű molekulában.

2.5.1. Tanninok csoportosítása

A tanninokat egykor két csoportba sorolták: pirogallol típusú tanninok és katechol típusú (vagy katechin típusú) tanninok, a molekuláikban található polifenol csoportok alapján. Ezen felül a koffetanninokat, a labiataetanninokat és a florotanninokat is a tanninok közé sorolták (Haslam, 1989; Okuda, 2005; Okuda és Ito, 2011). A bioaktív stilbenoidok – amelyek közül a monomer piceatannolt tartják felelősnek a lucfenyő kérgének tanninaktivitásaért (Nakayama et al., 1989) –, és a különböző rezveratrol oligomerek, valamint a barna algákból származó florotanninok (például a monomer eckol) (Okuda et al., 2009) izolálása után, az elmúlt évtizedekben a tanninok – és a rokon polifenolok – csoportját kiterjesztették ezekre a vegyületcsoportokra is. Ezzel egyidejűleg, a különböző kémiai szerkezetű, köztük kis molekulaméretű tanninok egészségügyi hatásaihoz kapcsolódóan jelentős biológiai és farmakológiai aktivitást találtak (Okuda, 1997; Okuda et al., 1995; YOSHIDA et al., 1989; Yoshida et al., 2009).

Egy másik csoportosítási mód a méretük szerinti besorolás. A múltban a kutatók azt feltételezték, hogy a tanninok meglehetősen nagy molekulákból álló fenolok nehezen kezelhető keverékei. Mára ez az állítás nem állja meg a helyét. Ami a molekulaméretet illeti, a (-) epigallokatechin-gallát és a (-) - epikatechin-gallát, a zöld tea fő "tanninja" olyan példák, amelyek meglehetősen kis molekulájuk ellenére a tanninok tulajdonságait mutatják. Az említett példákon kívül számos olyan tannin létezik, amelyek meglehetősen kis molekulákból állnak, valamint határozott kémiai szerkezetük van, és mégis a tanninok tipikus tulajdonságait mutatják (Okuda és Ito, 2011).

További csoportosítási lehetőséggel szolgál a kémiai szerkezet alapján történő megkülönböztetés. A kémiai szerkezet és összetétel állandósága alapvető fontosságú bármely célvegyület biológiai és farmakológiai tulajdonságainak jellemzéséhez. A tanninok

ezen tulajdonságait a múltban leírtakból gyakran hiányzott az összetételük ilyen állandóságának megerősítése. A tanninkémia újabb eredményei, kezdve az ellagitanninok izolálásával, két új típust eredményezett: az A-típusú, állandó szerkezetű és a B-típusú, változó összetételű tanninok csoportját (Okuda et al., 1995, 2009; Quideau és Feldman, 1996).

Ez a korábbi csoportosítási módszer azonban napjainkra szintén módosult, ezért a dolgozat készítése során az újabb kutatásokat vettem figyelembe, így ezáltal a tanninokat két csoportra osztottam; hidrolizálható és kondenzált tanninokra. A továbbiakban ezen csoportok bemutatását fogom részletezni.

2.5.1.1. Hidrolizálható tanninok, ellagitannin és gallotannin

Hidrolizálható tanninok kifejezés alatt a vízben jól oldódó, kb. 500 és 5000 Dalton közötti molekulatömeggel rendelkező másodlagos növényi anyagcseretermékeket értjük. Jellemző rájuk, hogy kicsapják az alkaloidokat és a fehérjéket. Kémiai szerkezetüket tekintve a hidrolizálható tanninok a galluszsav többszörös észterei glükózzal és oxidatív reakcióik termékeivel. Következésképpen egyértelműen megkülönböztethetők más tanninoktól, mint például a kondenzált tanninok (proantocianidinek), amelyek a katechin és a tara-tanninok, a galluszsav és a kininsav észterei (Harborne és Williams, 2000; Haslam, 2007). Összesen több mint ezer hidrolizálható tannint azonosítottak, az egyszerű glükogallintól (molekulatömeg: 332 Dalton) az 5000 Dalton feletti molekulatömegű pentamerikus ellagitanninokig (Arapitsas, 2012).

Míg a gallotanninok elterjedése a természetben meglehetősen korlátozott, az ellagitanninok számos növény családban elterjedtek. Ebbe a csoportba tartoznak például; a tölgyfában található C-glikozidos ellagitaninok (kasztalagin, vescalagin) és azok flavano-ellagitannin származékai (acutissimin B és epiacutissimin B), amelyeket az érlelt borban és whiskyben mutattak ki, valamint a gallagyl-glükozidok, amelyek szerkezete ellagsav-részt tartalmaz (punicalagin, peduncalagin).

2.5.1.2. A hidrolizálható tanninok jelentősége az élelmiszerekben

A hidrolizálható tanninok felfedezésétől napjainkig a felénk tanúsított érdeklődés a különböző tudományos és kereskedelmi területeken folyamatosan nőtt. Az élelmiszeriparban a hidrolizálható tanninok különböző módon befolyásolják az élelmiszerek minőségét. Ezen vegyületek legismertebb és legjobban kutatott tulajdonsága, amely nagy

jelentőséggel bír az élelmiszerek minőségében, a fanyarságuk. Az étrendi hidrolizálható tanninok a nyál prolinban gazdag fehérjével komplexeket képeznek és kicsapódnak. Ennek a hatásnak az eredménye egy összehúzó érzés, amely a szélsőséges szárazság és érdesség diffúz érzeteként érzékelhető, és nem korlátozódik a száj vagy a nyelv egy adott területére (Glabasnia és Hofmann, 2006; Haslam, 1989, 1996; Quideau és Feldman, 1996).

Mindemellett fontos kiemelni egészségmegőrző szerepüket is. Számos tanulmány és széles körű epidemiológiai bizonyíték hozza összefüggésbe a gyümölcs- és zöldségfogyasztást a daganatos, a degeneratív és a szív- és érrendszeri betegségek alacsonyabb kockázatával (Halliwell, 2007; Landete, 2011; Larrosa et al., 2010). Az ebben az összefüggésben fontos szerepet játszó élelmiszer-összetevők közé tartoznak a növényi polifenolok, például a hidrolizálható tanninok. A növényi polifenolok emberi szervezetben történő metabolizmusa, valamint a működésükkel és biológiai hozzáférhetőségükkel kapcsolatos mechanizmusok azonban még mindig nem tisztázott. A hidrolizálható tanninok biológiai aktivitásának feltárása érdekében a legjobban vizsgált mechanizmus az antioxidáns tulajdonságaikhoz kapcsolódik (Borges et al., 2010; Larrosa et al., 2010; Okuda és Ito, 2011; Yoshida et al., 2010). Az ehető és/vagy nem ehető növényekből izolált hidrolizálható tanninok erős biológiai aktivitást mutattak tumorelles, antimutagén, antidiabetikus, antiproliferatív, antibakteriális és antimikotikus tulajdonságok formájában (Buzzini et al., 2008; Halliwell, 2007; Landete, 2011; Larrosa et al., 2010; Salminen et al., 2011). Sajnos a kereskedelmi szabványok hiánya miatt az irodalomban kevés a hidrolizálható tanninok szerkezet-aktivitás kapcsolatát vizsgáló tanulmányok.

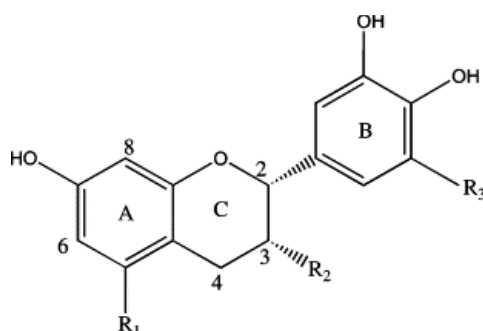
2.6.1.3. Előfordulásuk

A hidrolizálható tanninok széles körben elterjedtek a gyümölcsökben, zöldségekben és más élelmiszerekben. A hidrolizálható tanninok teljes koncentrációja az élelmiszerekben 1 mg/kg (gesztenyében) és 2 g/kg (szederben) között változik, és a bogyós gyümölcsök jelentik a leggazdagabb étrendi forrást (málna, szeder, felhőszeder, sarkvidéki málna, szamóca stb., (Larrosa et al., 2010). A hidrolizálható tanninokat kimutatták a Vitaceae családban (muskotályszőlő), feldolgozott élelmiszerekben, mint például érlelt borokban és szeszes italokban, vagy olyan élelmiszerekben, amelyekhez hidrolizálható tanninokat adtak, például húshoz, halhoz vagy borhoz, hogy kihasználják antioxidáns hatásukat. A tanninsav az Európai Unió 2232/96/EK rendelete alapján élelmiszer-aroma is lehet.

2.6.2. Kondenzált tanninok

A második csoport a kondenzált tanninok (vagy proantocianidinek) polihidroxi-flavan-3-ol oligomerek és polimerek csoportját alkotják, amelyek a flavanol alegységek között szén-szén kötésekkel kapcsolódnak. A proantocianidinek biológiai jelentőségű molekulákkal való reakcióképessége fontos táplálkozásélettani hatással jár. Többszörös fenolos hidroxil csoportjaik fehérjékkel (Harborne és Williams, 2000), fémionokkal (van Acker et al., 1998) és más makromolekulákkal, például poliszacharidokkal komplexek kialakulásához vezetnek (Harvey és Mcallan, 1992).

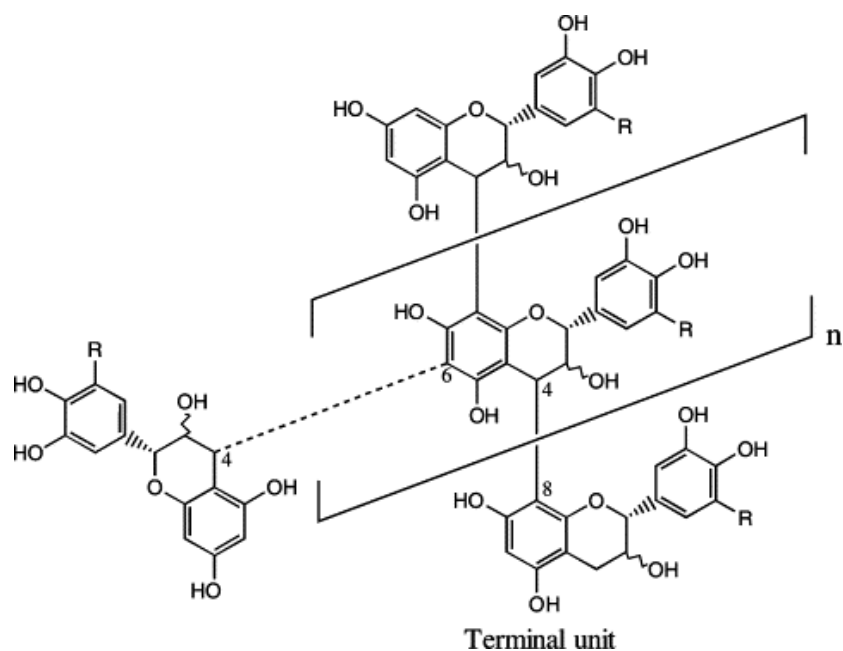
A kondenzált tanninok elemzését megnehezíti a vegyületcsoporton belül található szerkezetük sokfélesége (Schofield et al., 2001). A lehetséges szerkezeteket az 1. ábra mutatja be, ahol az R₁ hidroxil-csoport, míg az R₂ és R₃ hidroxil- vagy hidrogén-csoport lehet. A kapcsolódó csoportoknak nagy jelentősége van a kondenzált tanninok fehérjékkel való reakciókészségében.



R ₁	R ₃	Class
OH	H	Proanthocyanidin
OH	OH	Prodelphinidin
H	H	Profisetinidin
H	OH	Prorobinetinidin

2. ábra A kondenzált tanninok általános, ismétlődő egysége (Schofield et al., 2001).

Az 2. ábrán bemutatott monomer egységek kétféle kötéssel (4-8 vagy 4-6 kötés) képesek oligomerek kialakítására (3. ábra). Az így létrejövő, magasabb polimerizációs fokú molekulák általában oldhatatlanok és nehezen tanulmányozhatóak.



3. ábra Egy kondenzált tannin modellszerkezete (Schofield et al., 2001)

A legjellemzőbb monomer egység a katechin (R1, R2, R3 is OH-csoport). A katechin monomer a C gyűrű 2. és 3. pozíciójában aszimmetrikus centrummal rendelkezik. Bár a természetes tanninokban előfordulnak eltérések a sztereokémiában ezekben a pozíciókban, a modellvegyületeken végzett megfigyelések arra utalnak, hogy ezek az eltérések viszonylag kis hatással vannak a tanninvizsgálatokhoz használt reakciókra.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

A méréseim során három kereskedelmi forgalomban kapható tanninkivonatot használtam. Ezeket a Silvateam Welltan termékcsoportjából választottuk. A tanninkivonatok jellemzőit (eredet, jelölés, leírás, tannin tartalom és oldhatóság) az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat SilvaTeam Welltan tannin kivonatok (por formában) gyártó által megadott jellemzői; eredet, jelölés, leírás, tannin tartalom és oldhatóság

Név	Jelölés	Leírás	Tannin tartalom*	Oldhatóság
Quebracho fa (<i>Schinopsis lorentzii</i>)	Q	Vízzel és oldószerrel történő extrakcióval nyert kondenzált tannin.	95%	Vízben és etanolban tökéletesen oldódik.
Gesztenyefa (<i>Castanea sativa</i>)	C	Vizes extrakcióval nyert hidrolizálható ellagitannin.	75%	Vízben tökéletesen, etanolban részlegesen oldódik.
Tara hüvely (<i>Caesalpinia spinosa</i>)	T	Oldószeres extrakcióval nyert hidrolizálható gallotannin.	96%	Vízben és etanolban tökéletesen oldódik.

* Minimális tannin tartalom (száranyagra vonatkoztatva)

Az *in vitro* emésztésszimuláció különböző fázisaiban meghatározott összetételű, és pH értékkel rendelkező szervesetlen szimulánsok összetételét és egyéb paramétereit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat Mérések során használt szervetlen szimulánsok, azok jelölése, összetétele, koncentrációja, pH-ja, valamint az összetevők törzs koncentrációja

1,25x töménységű szimuláns oldatok		Szervetlen nyál szimuláns, SZNY	Szervetlen gyomornedv szimuláns, SZGY	Szervetlen vékonybél szimuláns, SZV
		(Simulated salivary fluid, SSF)	(Simulated gastric fluid, SGF)	(Simulated intestinal fluid, SIF)
		pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 7,0
Összetevő	Törzs konc., mol/L	Végző koncentráció az oldatban, mM		
KCl	0,50	15,09	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	0,50	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	1,00	13,68	25	85
NaCl	2,00	0	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,15	0,12	0,33
NH ₄ (CO ₃) ₂	0,50	0,06	0,5	0
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	0,30	1,5	0,15	0,6
HCl	6	1,1	15,6	8,4
NaOH	1	0	0	0
Hozzáadott H ₂ O, mL	-	373,72	365,70	338,50

A szervetlen szimulánsok mellett használt enzimeket és alkalmazásuk módját a 3. táblázat mutatja be. A kísérlet során való felhasználásukat a Mérés menete bekezdés, Emésztésszimuláció rész mutatja be részletesen.

3. táblázat Mérések során használt egyéb kivonatok (a feltüntetett mennyiségek 7 emésztéscsőnek felelnek meg)

Név	Alfa-amiláz enzim	Lipáz enzim (RGE)	Pankreatin	Epe
Gyártó	Sigma-Aldrich	Lipolytech	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich
Leírás	Sertés hasnyálmirigyből kinyerve, por formában.	Nyúl gyomor lipáz kivonat, por formában.	Sertés hasnyálmirigyből kinyerve, por formában.	Sertésből nyert epe kivonat, por formában.
Felhasználás	360,0 mg por 2,4 mL SZNY-ben feloldva.	380,0 mg por 7,6 mL SZGY-ben feloldva.	1060,2 mg por 22 mL SZV-ben feloldva.	16,8 mg por 10,5 mL SZV-ben feloldva.

3.2. További felhasznált anyagok

Marhahús minta, desztillált víz, sósav (HCl, 6 M, 1 mM, 0,01 M, 2 M), nátrium-hidroxid (NaOH, 1 M, 0,1 M), $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M), kloroform (analitikai tisztaságú, Lach-Ner), metanol (analitikai tisztaságú, Sigma-Aldrich), NaOH/MeOH oldat (0,8 M), $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ oldat (1 M), KOH/MeOH oldat (2 M), izooktán (analitikai tisztaságú, ROTIPURAN®), Na_2SO_4 (por formában), tömény NaCl oldat, fenolftalein indikátor, Gliceril-trinonadekanoát standard oldat (1 mg/ml-es koncentrációjú C19:0 TAG kloroformban oldva (Sigma-Aldrich), NaCl (Lach-Ner), Tris (Sigma-Aldrich), CaCl_2 (por formában, Lach-Ner), Triolein (Sigma-Aldrich), etanol (analitikai tisztaságú, Sigma-Aldrich), nátrium-acetát (Sigma-Aldrich), FeCl_3 (Reanal), BSA (szarvasmarhaszérum-albumin, Reanal), TEA (trietanolamin, Sigma-Aldrich), SDS (nátrium-dodecil-szulfát, Sigma-Aldrich), $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), BuOH (Sigma-Aldrich).

3.3. Felhasznált eszközök

Üvegeszközök, OHAUS digitális analitikai mérleg, mérőkanalak, centrifugacsövek (50 ml és 15 ml), centrifugacső állványok, forrkövek, Eppendorf csövek, GC-s mintatartók, termosztáló berendezés, Realsonic cleaner ultrahangos kád, Labinco L46 vortex, Hettich Mikro 22R centrifuga, Benchmark többhelyes asztali rázógép, átfordulás rázógép, homokos forraló, GC-FID: Agilent 7890, Heidolph Laborota 4000 efficient bepárlókészülék, Hanna instruments automata titráló berendezés pH mérővel, Thermo Electron Nicolet Evolution 300 UV-Vis Spektrométer.

3.4. Mérés menete

3.5. Mintaelőkészítés

A darált marhahúst (20% zsírtartalommal, Húsfarm friss marha darálthús, LIDL) fogyasztásra kész állapotban használtam fel az emésztésszimulációs kísérletek során. A kísérlet során a mintaelőkészítést Tormási és Abrankó (2023) alapján végeztem. A darált marhahúsból pogácsákat formáztam, majd 200 °C-on 20 perc alatt megsütöttem. A sült marhahús pogácsákat kihűlés után Moulinex HV4 típusú húsdaráló berendezés segítségével háromszor eldaráltam, majd kis adagokban -80 °C-on tároltam felhasználásig. A mintának ezen felül előzetesen meghatároztuk a zsírtartalmát Soxhlet módszer segítségével,

ISO 1442:2000 és 1444:2000 alapján, továbbá a fehérjetartalmat Kjeldahl módszerrel. A mérések eredményeképp a zsírtartalom $16,1 \pm 0,3\%$ (RSD%: 2), a fehérjetartalom pedig $29,9 \pm 0,6\%$ (RSD%: 1,9) volt.

3.6. Emésztésszimuláció

A marhahús mintákat analitikai pontossággal kimértem (0,9000 g) 50 mL-es centrifugacsövekbe, melyek táratömegét előzetesen lemértem. A tannin kivonatok hatását több szinten vizsgáltam. A tannin porokat 0,3%, 0,6%, 0,9%-os dózisokban adagoltam a marhahús tömegére számolva, az emésztést megelőzően. Végül a mintákat 4,1 mL desztillált vízzel pótoltam ki, ezáltal egy 5 mL-es mintát kialakítva. Minden összetétel esetén három párhuzamos emésztést végeztem, illetve minden mérés sorozat mellé egy vak mintát is készítettem, ami marhahús helyett, 5,0 mL desztillált vizet tartalmazott.

Ezzel párhuzamosan az emésztés során használt enzimeket is előkészítettem (2. táblázat). Pankreatin esetében, mivel nem oldható a SZV közegében enzim kivonást kellett végrehajtani, ehhez a szuszpenziót 10 másodpercig Labinco L46 vortex segítségével kevertem, majd 5 percre ultrahangos kádba helyeztem. Az 5 percet követően a keveréket 6000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltam 5 percig. A centrifugálást követően a folyadék fázist külön öntöttem, a továbbiakban ezzel dolgoztam.

A kísérlet során a száj, gyomor és vékonybél fázisát modelleztem az Infogest nemzetközileg elismert, konszenzusos *in vitro* emésztési szimulációs protokollja szerint (Brodkorb et al., 2019), azzal a kiegészítéssel, hogy gyomor lipázt is használtam (a nyúl gyomorkivonat (RGE) részeként, mely pepszint is tartalmaz).

A száj fázis során az előkészített 5 g mintához 3,50 mL SZV-t, 25 μ L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -t (0,3 M), 0,50 mL alfa-amiláz oldatot és 0,975 mL desztillált vizet adtam. Ezt a keveréket 2 percig inkubáltam 37 °C-on, közben átfordulós rázógép segítségével kevertettem. A 2 perc letelte után kivettem az inkubátorból a mintákat, ezzel befejeződött az első szakasz és a gyomor szakasz következett. A gyomor fázis végrehajtása során az eddigi keverékemhez hozzáadtam 6,40 mL SZGY-t, 5 μ L $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -t, 130 μ L HCl-t (6 M) (Tormási és Abrankó, 2023), 1,60 mL RGE-oldatot és 1865 μ L desztillált vizet. Az újonnan kapott keveréket 2 órán keresztül inkubáltam 37 °C-on és közben folyamatosan kevertettem. a 2 óra letelte után kivettem a mintákat, és elkezdtem az utolsó szakaszt. Vékonybél fázisban a keverékhez

hozzáadtam 8,50 mL SZV-t, 40 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -t, 2,50 mL epét, 5,00 mL pankreatint, 130 μL NaOH-t (Tormási és Abrankó, 2023) és 3830 μL desztillált vizet adtam. A fentiek hozzáadását követően ismét egy 2 órás inkubálás következett 37 °C-on, folyamatos keverés mellett.

A folyamat végén ismét lemértem a minták tömegét és feljegyeztem az adatokat. Ezt követően minden mintából két darab 5 mL-es részt pipettáztam át új, 50 mL-es centrifugacsövekbe, melyeknek előtte szintén lemértem a táratömegét. Az így kapott mintákhoz hozzáadtam 250 μL standard-oldatot (1 mg/mL-es koncentrációjú C19:0 TAG kloroformban oldva), valamint 6 mL kloroformot és 12,5 mL MeOH-t. Ezután 2 percen keresztül kevertem őket a Benchmixer többhelyes rázógép segítségével. Ezt követően 6,25 mL kloroformot adtam a mintákhoz, és fél perc keverés következett. A keverés után minden mintához hozzáadtam 6,25 mL desztillált vizet, és ismét kevertem őket, ezen a ponton fél percen keresztül. A keverést centrifugálás követte 6000 rpm-en, 25 °C-on 20 percig. A centrifugálás végére két fázis különült el. Minden minta esetében kettő darab 5 mL-es részt pipettáztam át az alsó fázisból egy gömblombikba. A gömblombikokból Heidolph Laborota 4000 efficient bepárlókészülék segítségével maradék nélkül eltávolítottam az oldószert. A mintákon ezt követően az ISO 12966:2-2017 szabvány szerinti előkészítést alkalmaztam.

3.7. Származékképzés GC-FID mérést megelőzően

3.7.1. Gyors módszer

A bepárolt mintákhoz 1 mL izooktánt adtam, és átmostam az előre elkészített 15 mL-es centrifugacsőbe. Ezt követően 100 μL KOH/MeOH-t (2 M) adtam hozzájuk. A hozzáadást követően 1 perc keverés következett, majd 2 percig állni hagytam a mintákat. A 2 perc leteltével 4 mL tömény NaCl oldatot adtam a mintákhoz. Ezután centrifugálás következett, melynek a paraméterei a következők voltak: 6000 rpm, 25 °C, 10 perc. A centrifugálás ideje alatt előkészítettem a mikrocöveket, melyekbe 0,5 g Na_2SO_4 -et töltöttem. A 10 perc leteltével a minták ismét 2 fázisra váltak szét, a felső fázist az előkészített mikrocövekbe pipettáztam, majd a csöveket vortexeltem fél percig. A keverés után pár percig állni hagytam a mintákat, míg a só le nem ülepedett, és a felső fázis ki nem tisztult. Ezt követően a mintákat GC mintatartóba pipettáztam.

3.7.2. Általános módszer

Az általános módszerrel kezelt mintákat párhuzamosan készítettem el a gyors módszer mintáival. A bepárolt mintákhoz 2 mL NaOH/MeOH (0,8 M) oldatot és 1-2 forrkövet adtam. Ezt követően 20 percig forraltam homokon. A 20 perc leteltével pár csepp fenolftalein indikátort adtam a mintákhoz, majd 100 µL H₂SO₄/MeOH-oldatot (1 M) pipettáztam hozzájuk egészen addig, míg semleges nem lett a keverék. Az átcsapást követően még 200 µL H₂SO₄/MeOH-oldatot adtam a mintákhoz. Ezután ismételt homokon való forralás következett, ezúttal 5 percig. A forralást követően a mintákat 15 mL-es centrifugacsövekbe mostam át 4 mL tömény NaCl oldat segítségével. Ezt követően 1 mL izooktánt adtam a mintákhoz és 15 másodpercig kevertem őket. A keverést centrifugálás követte, melynél a paraméterek a következők voltak: 6000 rpm, 25 °C, 10 perc. A centrifugálás után a mintáknál két fázis volt megfigyelhető, a felső fázist átpipettáztam GC mintatartóba.

Miután a mintákat előkészítettem a gyors és általános módszer segítségével GC-FID mérés következett.

3.8. GC-FID

A minták méréséhez Agilent 7890a GC-FID készüléket használtam. A zsírsav-metil-észterek elválasztását erre a célra alkalmas kolonnán (Phenomenex Zebron FAME-ZB; 60 m, 0,25 mm, 0,20 µm) végeztem a következő paraméterekkel; mintaadagoló hőmérséklet: 250°C, injektált térfogat: 1 µL, vivőgáz: hidrogén, áramlási sebesség: 1 mL/min, split arány: 50:1, detektor hőmérséklet: 250 °C. Az elválasztás a következő hőmérséklet profil alapján történt: 100 °C-on 3 perces hőntartást követően, 180 °C-ra emeltem a hőmérsékletet 20°C/perc sebességgel, ahol 10 perc hőntartás után 10 °C/perc sebességgel 240 °C-ra emeltem a hőmérsékletet, amit 3 percig tartottam. A minőségi és mennyiségi analízishez 37 komponenses FAME standard mixet (Supelco) használtam. A kalibráció négy szintes volt, ahol a névleges 0, 10, 20, 40 µg/mL koncentrációjú szintekhez 100 µg/mL koncentrációjú belső standardot adtam (C19:0 ME 1 mg/mL törzsoldatból (izooktánban oldva).

A 4. táblázatban láthatóak az előző pontban említett FAME standard mix komponensei, valamint a mérések során meghatározott retenciók idejük.

4. táblázat A mérések során használt FAME standard mix (Supelco) komponensei, azok jelölése és a GC-FID mérés során kapott retenciós idejük

Komponens	Rövidítés	Retenciós idő (perc)
Vajsav-metil-észter	C4:0	3.530
Karbonsav-metil-észter	C6:0	4.248
Kaprilsav-metil-észter	C8:0	5.340
Kaprinsav-metil észter	C10:0	6.643
Undekánsav-metil-észter	C11:0	7.265
Laurinsav-metil-észter	C12:0	7.879
Tridekánsav-metil-észter	C13:0	8.490
Mirisztinsav-metil-észter	C14:0	9.134
Mirisztolésav-metil-észter	C14:1n-5c	9.581
Pentadekánsav-metil-észter	C15:0	9.832
Cisz-10-pentadecénsav-metil-észter	C15:1n-5c	10.204
Palmitinsav-metil-észter	C16:0	10.661
Palmitoleinsav-metil-észter	C16:1n-7c	11.127
Heptadekánsav-metil-észter	C17:0	11.623
Cisz-10-heptadecénsav-metil-észter	C17:1n-7c	12.210
Sztearinsav-metil-észter	C18:0	12.886
Olajsav-metil-észter	C18:1n-9c	13.331
Elaidinsav-metil-észter	C18:1n-9t	13.488
Linolénsav-metil-észter	C18:2n-6t	13.975
Nonadekánsav-metil-észter	C19:0	14.439
Linolsav-metil-észter	C18:2n-6c	14.631
γ -linolénsav-metil-észter	C18:3n-6c	15.584
α -linolénsav-metil-észter	C18:3n-3c	16.384
Arachidsav-metil-észter	C20:0	16.474
Cisz-11-eikozénsav-metil-észter	C20:1n-9c	17.302
Eikozadiénsav + Heneikozánsav-metil-észter	C20:2n-6c+C21:0	18.631
Cisz-8,11,14-eikozatriénsav-metil-észter	C20:3n-6c	19.428
Arachidonsav-metil-észter + Dihomo- γ -linolénsav	C20:4n-6c+C20:3c	19.952
Behénsav-metil-észter	C22:0	20.171
Erukasav-metil-észter	C22:1n-9c	20.570
Cisz-5,8,11,14,17-eikozapentaénsav-metil-észter	C20:5n-3c	21.089
Cisz-13,16-dokozadiénsav-metil-észter	C22:2n-6c	21.351
Trikozánsav-metil-észter	C23:0	21.411
Lignocerinsav-metil-észter	C24:0	22.455
Nervonsav-metil-észter	C24:1n-9c	22.715
Cisz-4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsav-metil-észter	C22:6n-3c	23.134

3.9. Lipáz aktivitás mérése

A lipáz enzim aktivitás méréseket kétféle, eltérő elv alapján működő módszerrel is elvégeztem: i) Inaktiválás után titrálással (Sosnowska et al., 2015 szerint); ii) pH-stat

módszerrel, állandó aktivitás fenntartásával (Grundy et al., 2021 szerint). A mérések menete alább látható.

3.9.1. Lipáz aktivitás mérése inaktiválás utáni titrálással

3.9.1.1. Pankreatin

Mivel a pankreatin (Sigma-Aldrich) vizes közegben nem oldódik teljes mértékben, ezért kivonatot kellett belőle készíteni. Ebből a kivonatból került meghatározásra az enzim aktivitása. A kivonat készítéséhez a 2. táblázat szerint SZV-t készítettem. Ezt követően egy 1 mg/mL-es pankreatin szuszpenziót készítettem belőle, melyet 10 másodpercig vortexeltem, majd 5 percre Realsonic cleaner ultrahangos kádba helyeztem. Az 5 percet követően Hettich Mikro 22R centrifugába helyeztem, a következő paraméterekkel: 6000 rpm; 5 perc; 4 °C. A centrifugálást követően eltávolítottam a felülúszót, és ezzel a tiszta oldattal dolgoztam tovább.

Ezen felül szükség volt Tris pufferre, mely összetétele a következő volt: Tris (20 mM, Sigma-Aldrich), NaCl (150 mM, Lach-Ner), CaCl₂ (1,3 mM, Lach-Ner). A hozzávalókat mérőcsónakokba mértem be, majd egy 500 mL-es főzőpohárba öntöttem, ahol 200-300 mL desztillált vízben oldottam fel. Az így kapott oldatot maradék nélkül átmostam egy 500 mL-es mérőlombikba, és jelre töltöttem desztillált vízzel, végül a pH-ját 7,0-ra állítottam be.

Ez a puffer szolgált a lipid szubsztrát oldat alapjául, mely összetétele: 100 mL Tris puffer, 2,34 g Triolein (Sigma-Aldrich), 1,56 g epe (Sigma-Aldrich). Mivel az epe lassan oldódik, ezért a folyamat felgyorsítása érdekében Realsonic cleaner ultrahangos kádba helyeztem, amit 40 °C-ra melegítettem.

Az emésztésszimuláció során is használt tanninokból (Q, C, T) szintén oldatokat készítettem, 6 mg/mL-es koncentrációban.

A méréshez az 5. táblázat alapján neveztem el a mintákat és állítottam össze a reakcióelegyeket.

5. táblázat Lipáz aktivitás mérésének menete, a hozzávaló komponensek mennyiségével egy tanninra vonatkoztatva, a párhuzamosok nevével

Minta	Szubsztrát (mL)	Puffer (mL)	Tannin oldat (mL)	Pankreatin (mL)	Puffer (mL)
Vak kontroll	4	2	-	-	0,5
Kontroll 1	4	2	-	0,5	-
Kontroll 2	4	2	-	0,5	-
Vak T 1	4	1,75	0,25	-	0,5
T 1-1	4	1,75	0,25	0,5	-
T 1-2	4	1,75	0,25	0,5	-
Vak T 2	4	1,5	0,5	-	0,5
T 2-1	4	1,5	0,5	0,5	-
T 2-2	4	1,5	0,5	0,5	-
Vak T 3	4	1,25	0,75	-	0,5
T 3-1	4	1,25	0,75	0,5	-
T 3-1	4	1,25	0,75	0,5	-

Első lépésben a szubsztrátot, a puffert és a tannin oldatot mértem ki az 5. táblázatban feltüntetett módon. Ezt követően a mintákat 30 percen keresztül inkubáltam 37 °C-on, közben átfordulós rázógéppel kevertettem. Az idő leteltével minden mintához hozzáadtam a pankreatint, a vakok esetében pedig a puffert, majd egy újabb 5 perces inkubálás-kevertetés következett. A folyamat végén minden mintához 14 mL etanolt (Sigma-Aldrich) adtam, ezzel leállítva a reakciót.

Ezt követően a mintákat pH 8,0-ig titráltam Hanna Instruments automata titráló berendezés segítségével, melyet előzetesen kalibráltam. A titráláshoz használt mérőoldat 0,01 M-os NaOH volt.

A kiértékelés során a következő képletet használtam az inhibíció meghatározására:

$$\text{Lipáz inhibíció \%} = \frac{(V_{\text{kontroll}} - V_{\text{vakkontroll}}) - (V_{\text{minta}} - V_{\text{vakminta}})}{(V_{\text{kontroll}} - V_{\text{vakkontroll}})} \times 100$$

1. egyenlet: Lipáz enzim gátlás számolás, ahol: V: 0,01 M-os NaOH oldat fogyása (mL)

3.9.1.2. RGE

Az RGE lipáz aktivitás mérése megegyezik a pankreatinnál feltüntetett módszerrel, azonban ebben az esetben a Tris puffer pH-ját 5,0-ra állítottam be és a titrálás 5,5-ös pH-ig történt. Természetesen a minták előkészítése során pankreatin helyett RGE-t használtam.

3.10. Lipáz aktivitás mérése pH-stat módszerrel

3.10.1. Pankreatin

A pankreatin szuszpenzió előkészítése és koncentrációja megegyezett az előző módszerrel leírtakkal. A vizsgálóközeg elkészítéséhez szükséges anyagokat és mennyiségeket a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat 200 mL vizsgálóközeg elkészítéséhez szükséges anyagok a bemérendő mennyiségekkel és koncentrációkkal Grundy et al., 2021 alapján

Szükséges anyagok	Koncentráció (mM)	Bemérendő mennyiség (g)
Tris	0,3	0,018
NaCl	150	4,5
CaCl ₂	2	0,100
Epe	4	1,04

A hozzávalókat bemérő csónakokba mértem ki, majd 200 mL-es főzőpohárba öntöttem és feloldottam 100-120 mL desztillált vízben. Ezt követően egy 500 mL-es mérőlombikba töltöttem át és jelre töltöttem desztillált vízzel, valamint 7,5-re állítottam be a pH-t. A titrálás során használt mérőoldat ebben az esetben is 0,01 M-os NaOH oldat volt.

A tannin oldatok esetében 0,3, 0,6 és 0,9 %-os koncentrációkkal dolgoztam, az oldószer desztillált víz volt. A minták összetételét a 7. táblázat mutatja be.

7. táblázat A minták összetétele mL-ben, a lipáz aktivitás mérése során, pH stat. módszer esetében

Anyagok	Kontroll 1	Kontroll 2	Tannin 0,3	Tannin 0,6	Tannin 0,9
Vizsgálóközeg (mL)	14,5	14,5	14,25	14	13,75
Triolein (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tannin (mL)	0	0	0,25	0,5	0,75
Pankreatin (μL)	100	100	100	100	100

A vizsgálóközeg-triolein elegyet először 15 percig inkubáltam 37 °C-on kevertetés mellett, majd ezt követően hozzáadtam a tannin oldatot és megismételtem az inkubálást. Ezután a pankreatint is hozzáadtam, majd a pH-t manuális 8,0-ra állítottam be 0,01 M-os NaOH segítségével, majd egy perisztaltikus pumpa segítségével kezdtem adagolni a titráló oldatot úgy, hogy a pH 8,0-n maradjon. Az ehhez szükséges áramlási sebességet feljegyeztem. Ezt követően hozzáadtam újabb 100, 200 vagy 300 µL pankreatin oldatot, és újra feljegyeztem az áramlási sebességet. A 2. egyenlet segítségével számoltam ki az enzim aktivitását.

$$\frac{Unit}{mg\ por} = \frac{R(NaOH) \times 1000}{v \times [E]}$$

2. egyenlet: Lipáz enzim aktivitásának számítása, ahol: R(NaOH): a 0,01 M-os NaOH oldat áramlási sebessége (µmol/perc); v: enzim oldat térfogata (µL); [E]: enzim oldat koncentrációja (mg por/mL)

Ezt követően az enzim gátlását határoztam meg, melyet a 3. egyenlet ír le.

$$inhibíció \% = (100 - \frac{Enzim\ aktivitása}{\frac{K_1 + K_2}{2}}) \times 100$$

3. egyenlet: Inhibíció számítása Grundy et al., 2021 lipáz aktivitás mérését követően, ahol: K: a kontroll mintákra kapott aktivitás érték (Unit/mg por)

3.10.2. RGE

A mérés megegyezik a pankreatinnál leírtakkal a következő kivételekkel: a vizsgálóközeg pH-ja, valamint a titrálás megkezdése előtti pH 5,0-ra lett állítva; a pH-n tartáshoz szükséges áramlási sebesség meghatározása sora pH=5,5-öt tartottam; emellett ebben az esetben az adagolt enzimoldat mennyisége 500 és 1000 µL volt a titrálás megkezdése előtt.

3.11. Fehérjekicsapás

A mérések során Hagerman & Butler, 2002 kutatását vettem alapul. A tannin kivonatok hatását három fehérjén teszteltem, melyek a BSA (szarvasmarhaszérum-albumin, Reanal), pankreatin (Sigma-Aldrich) és RGE (Lipolytech) voltak.

Első lépésben egy puffert készítettem, mely során 100-120 mL desztillált vízben oldottam fel 0,2 M nátrium-acetátot (Sigma-Aldrich) és 0,17 M NaCl-t (Lach-Ner), majd egy 200 mL-es mérőlombikba öntöttem át, jelre töltöttem desztillált vízzel és pH-ját BSA esetén 5-re, pankreatin esetén 7-re, RGE esetén 3-ra állítottam be. A következő lépésben 0,1 M-os FeCl_3 (Reanal) oldatot készítettem, melyet 0,01 M-os HCl-ben oldottam fel. Ezzel a módszerrel 100 mL elegyet készítettem. A harmadik lépésben egy SDS/TEA oldatot készítettem, mely 1 m/V% SDS-t és 5 V/V% TEA-t tartalmazott. Ebből az oldatból 500 mL-t készítettem.

A három vizsgált fehérjeforrásból (BSA, pankreatin, RGE) 1 mg/mL-es oldatokat készítettem, melyeket a nátrium-acetát pufferben oldottam fel. Pankreatin esetében a már fentiekben is említett protokollt alkalmaztam.

A vizsgált tanninokból (Q, C, T) szintén 1 mg/mL-es törzsoldatokat készítettem desztillált víz segítségével. Ezekből hígítási sort készítettem, mely 1 mg/mL, 0,9 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,3 mg/mL és 0,1 mg/mL-es koncentrációval rendelkezett. Mindegyik tagból 4 mL-t készítettem, a hígítást szintén desztillált vízzel végeztem.

Ezt követően 15 mL-es centrifugacsövekbe mértem ki a tannin oldatokból 1-1 mL-t és 2-2 mL-t az egyik fehérjeforrásból (BSA, pankreatin, RGE). Minden koncentráció esetén két párhuzamost készítettem. Ezt követően a mintákat Hettich Mikro 22R centrifugába helyeztem 6000-es fordulatszámon, 24 °C-on és 15 percig centrifugáltam. A folyamat végén leöntöttem a felülúszót, és átmostam a centrifugacsöveket 1 mL acetát-pufferrel. Ezt követően a csőben maradt pelletez 4 mL SDS/TEA-oldatot és 1 mL FeCl_3 -oldatot adtam, majd addig vortexeltem, míg a pellet maradéktalanul fel nem oldódott. Ezután 15 percig állni hagytam a mintákat. Az idő leteltével Thermo Electron Nicolet Evolution 300 UV-Vis Spektrométer segítségével megmértem a minták abszorbanciáját 510 nm-en. Minden mintát kétszer mértem le, melyből átlagot számítottam.

3.12. Proantocianidin tartalom meghatározása

A kísérletek során használt tanninok (Q, C, T) közül a Q jelölésű kondenzált tannin. A mérés célja az volt, hogy meghatározzuk valóban kondenzált tannin-e (proantocianidin) a minta, valamint annak vizsgálata, hogy a másik két típus ténylegesen nem tartalmaz kondenzált tanninokat. A mérés alapját Porter et al., 1985 kutatásai szolgáltatták, a módszert azonban a

mai napig alkalmazzák növényi kivonatok proantocianidin tartalmának meghatározására (Han et al., 2015). Első lépésben mindhárom tanninból készítettem egy 0,02 m/V%-os törzsoldatot, melyben az oldószer szerepét metanol (Sigma-Aldrich) töltötte be. Ebből az oldatból hígítási sort készítettem, melyben a törzsoldat-metanol aránya a következőképpen nézett ki: 1:2; 2:5; 3:10; 1:5. A mérés során minden töménységű oldatból két párhuzamost készítettem (beleértve az eredeti törzsoldatot is).

Ezt követően egy $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) oldatot készítettem (2 m/V%), amit 2 M-os HCl-ben oldottam fel. Ezen kívül egy BuOH-HCl oldatot is készítettem, melyben a BuOH:HCl (Sigma-Aldrich) arány 95:5 volt.

A reakcióelegyek a következőképpen néztek ki; 8 mL-es üvegfiolákba pipettáztam a tannin oldatokból 1 mL-t, a BuOH-HCl oldatból 6 mL-t, a vas reagensből pedig 0,2 mL-t. Ezt követően a mintákat vortexeltem, majd 95 °C-os vízfürdőbe helyeztem 40 percre. Ezután Thermo Electron Nicolet Evolution 300 UV-Vis Spektrométer segítségével megmértem az oldatok abszorbanciáját 550 nm-en.

3.13. Statisztikai értékelés

A minták zsír- és fehérjetartalmát, illetve az emésztésszimulációs teszt utáni zsírsavakat Microsoft Excel szoftver segítségével, Student-féle t-próba segítségével hasonlítottam össze, $p < 0,05$ értéket véve szignifikancia szintnek. Az eredményeken egytényezős varianciaanalízist is végeztem, itt szintén $p < 0,05$ -ös szignifikancia szintet határoztam meg. A statisztikai próbák végrehajtása előtt szóráshomogenitás tesztet hajtottam végre.

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

A kísérlet célja volt, hogy különböző kereskedelmi forgalomban kapható tannin kivonatok zsíremészthetőségre gyakorolt hatásának vizsgálata. Ehhez a SilvaTeam Welltan tannin kivonatai közül egy ellagitannint (C), egy gallotannint (T) és egy kondenzált tannint (Q) vettem alapul.

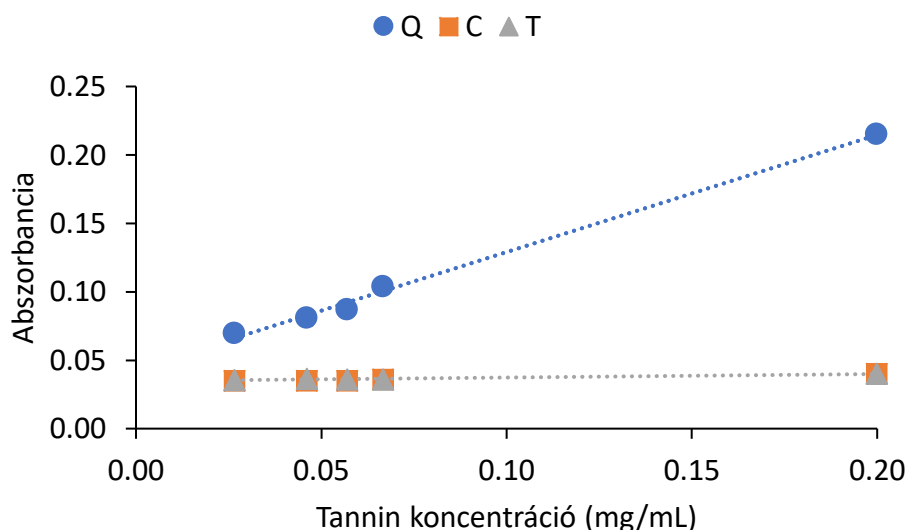
Először a tannin mintákat összetétel tekintetében vizsgáltam, amihez egy olyan kísérletet végeztem el, mely proantocianidinek kimutatására szolgál. Ezzel meg tudtam állapítani, hogy a C és T minták valóban hidrolizált tanninok-e, vagy esetleg részben tartalmazznak-e kondenzált tanninokat, illetve hogy a Q tannin tényleg kondenzált tannin-e, vagy sem.

Ezután egy statikus *in vitro* emésztésszimulációt végeztem, mely során megvizsgáltam, hogy a tannin kivonatoknak van-e és amennyiben igen, milyen mértékben van hatása a zsíremészthetőségre, ezen belül pedig a különböző zsírsavak emészthetőségére.

Ezt követően a szimulációban használt enzimek (pankreatin és RGE) és a tanninok kapcsolatát vizsgáltam, arra kerestem a választ, hogy a tanninok hatása milyen mechanizmus szerint történik. Ehhez két mérést végeztem: i) a tannin kivonatok lipáz enzim aktivitásra gyakorolt hatásának mérését enzimaktivitás tesztek segítségével; ii) a tannin kivonatok fehérjekicsapásának mérését, mely vizsgálat célja az volt, hogy megmutassa van-e kapcsolat a fehérjekicsapás és a zsírok gátlása között.

4.1. Proantocianidin mérés eredménye

A mérés során mindhárom tannin kivonat összetételét szerettem volna ellenőrizni. A vizsgálat csak proantocianidinek, azaz kondenzált tanninok esetén ad pozitív választ, egyéb esetben nem történik változás. A pozitív reakció vörös színű elszíneződést takar, negatív esetben sárga marad a minta.



4. ábra A három vizsgált tannin (Q, C, T) proantocianidin tartalom vizsgálatának eredményei a koncentrációk függvényében

A 4. ábra alapján egyértelműen megállapítható, hogy egyedül Q tannin esetében volt pozitív reakció. A Q mintára mért eredményeket összevetve C és T minták eredményeivel szignifikáns változást tapasztaltam (ANOVA: $p = 0,022$), míg C és T összehasonlítása során nem volt szignifikáns különbség (t próba: $p = 0,648$). Továbbá Q esetében a koncentráció növelésével arányosan nőtt az abszorbancia érték is. Az eredmények igazolták a tanninok összetételét, miszerint Q tannin valóban kondenzált tanninokat tartalmaz. Mivel C és T esetében nem történt abszorbancia változás, ezért nem tartalmaz egyik minta sem kondenzált tanninokat, ami megfelel a leírásnak, miszerint kizárólag hidrolizálható tanninokból állnak a kivonatok.

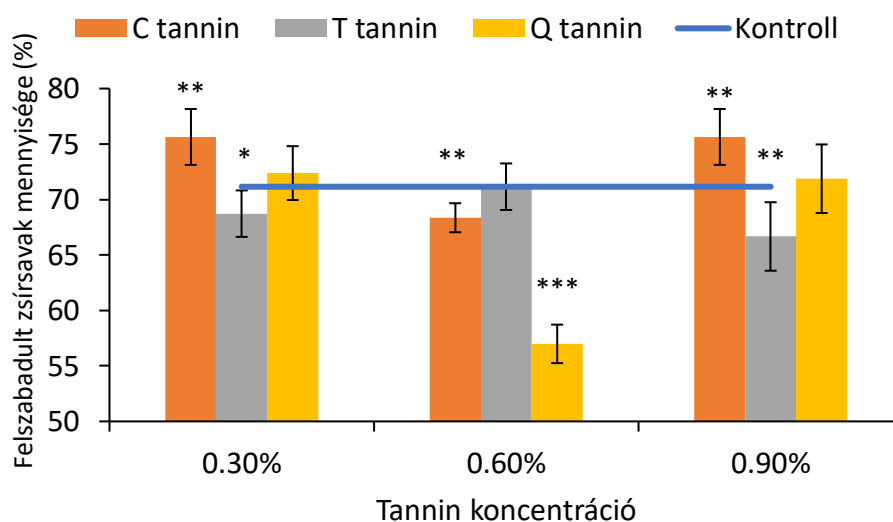
4.2. Emésztésszimulációs eredmények

4.2.1. Hozzáférhető zsírsavtartalom

Az *in vitro* szimuláció során a három különböző összetételű tannin kivonat (Q – kondenzált tannin, C – ellagitannin, T – gallotannin) zsíremésztésre gyakorolt hatását vizsgáltam, három

különböző koncentrációban (0,3%; 0,6%; 0,9%) sült marhahús mátrixon. A vizsgálat célja az volt, hogy meghatározzam melyik tannin, és milyen mértékben képes a különböző a sült marhahús zsírtartalmának emésztését gátolni, és melyik koncentráció alkalmazása a legeredményesebb.

A hozzáférhető zsírsavtartalmat emésztésszimuláció után Tormási és Abrankó (2021) módszere alapján határoztam meg, a vékonybél emésztmény összes-, és észterezett zsírsav profilja alapján. Az eredmények értékelése során az adatokból összes zsírsav felszabadulást (%) és a zsírsav egyedi felszabadulását is kiszámoltam. A kontrollként alkalmazott, sült marha hús zsíremészthetőségét és a három tannin hozzáadásának hatását a három vizsgált koncentrációban az 5. ábra mutatja be.



5. ábra Az emésztésszimuláció során felszabadult zsírsavak mennyisége (%) a különböző tannin kivonatok vonatkozásában, három különböző koncentrációban (0,3%, 0,6%, 0,9%) vizsgálva, a kontroll érték (kezelés nélküli sült marhahús emészthetősége; kék vonal) jelölésével. Minden esetben Student-féle t-próba segítségével hasonlítottam össze az eredményeket a kontroll értékkel, melynek jelölése a következőképpen történt: $p > 0,05$ esetén nincs jelölés; $p < 0,05$ esetén *; $p < 0,01$ esetén **; $p < 0,001$ esetén ***.

Az 5. ábra alapján látható, hogy minden tanninnak volt gátló hatása egy vagy több koncentrációban is, melyek közül a Q tannin bizonyult a legeredményesebbnek. A kontrollhoz való hasonlítás során, 0,3%-os koncentráció mellett C és T tannin esetében volt az eltérés szignifikáns ($p < 0,05$), míg Q esetében nem érték el az értékek a szignifikanciaszintet ($p = 0,05$). A 0,6%-os tannin koncentráció alkalmazása mellett azonban a Q és C esetében voltak az eredmények szignifikánsak (rendre, $p = 0,000$; $p = 0,002$), míg T esetében nem ($p = 0,999$). A legnagyobb (0,9%-os) koncentráció mellett csak a Q tannin

esetében nem volt szignifikáns eredmény ($p = 0,600$), C és T tannin esetében igen (rendre, $p = 0,004$; $p = 0,007$).

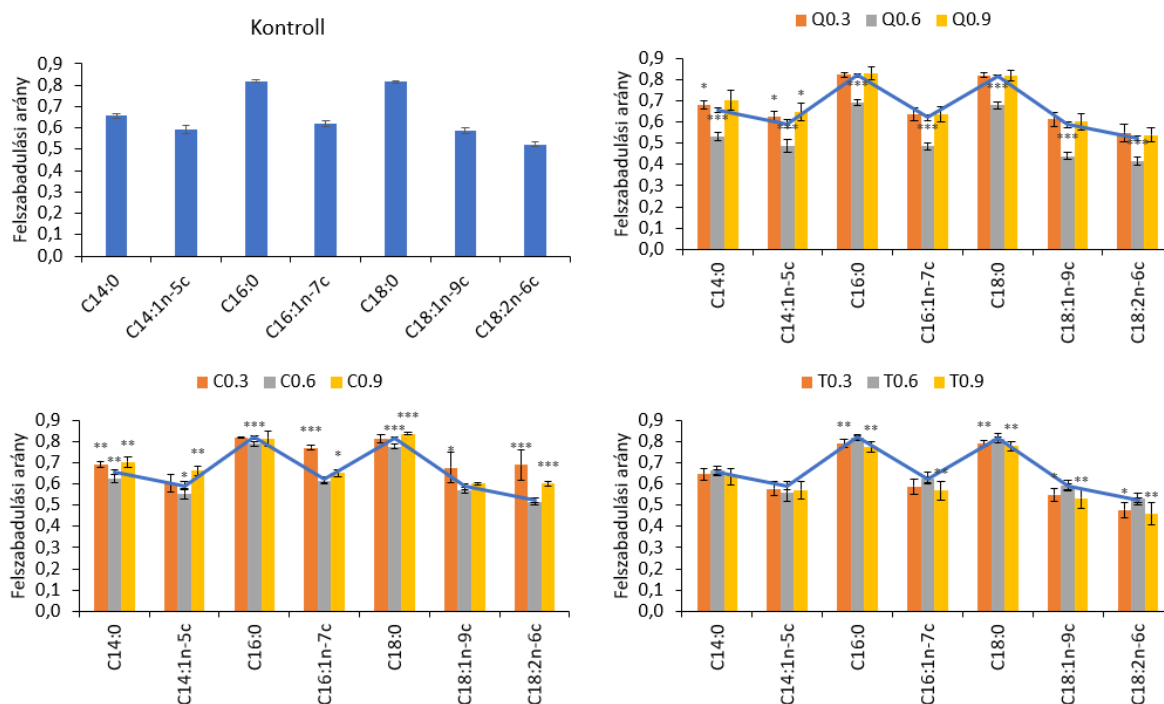
Mikor a különböző tanninokra kapott eredményeket hasonlítottam össze, egyetlen esetben nem volt szignifikáns különbség, T tannin esetében 0,3%-os és 0,6%-os értékek között. Minden más esetben az eredmények szignifikánsnak bizonyultak ($p < 0,05$).

Ugyan az eredmények statisztikai értékelése több helyen is szignifikáns eltérést mutatott a kontroll, sült marhahús emésztésének eredményéhez képest, a legtöbb esetben ez a különbség 3-6%-os eltérét jelent a kezelések hatására. Egy esetben volt releváns csökkenés az emészthető zsírsavtartalomban, méghozzá a Q tannin 0,6%-os hozzáadása után. Ebben az esetben a zsíremészthetőség 14,2%-ot csökkent, ami 19,9%-os gátlást jelentett. Kismértékű gátlást még a T tannin hozzáadása esetén lehetett felfedezni, ahol a 0,3%-os adagolás 3,4%-os (abszolút: 2,4%), míg a 0,9%-os adagolás 6,3%-os (abszolút: 4,5%) gátlást eredményezett. C tannin esetében 0,6%-os adagolás mellett 3,9%-os (abszolút: 2,8%) gátlást tapasztaltam.

Így elmondható, hogy legnagyobb hatást a Q tannin – kondenzált tannin – tudott kifejteni, és egyedül a 0,6%-os koncentráció alkalmazása mellett. A hidrolizálható tanninok esetében T tannin esetében, 0,3% és 0,9% adagolása mellett volt érdemi gátlás megfigyelhető, míg a C tannin esetében 0,6%-os koncentráció alkalmazása mellett jelentkezett hatást.

4.2.2. Zsírsav-specifikus emészthetőség

Az összes zsíremészthetőség, azaz a felszabadult zsírsavak mennyisége mellett, azok minőségét is megvizsgáltam. Ehhez a tannin hozzáadásra a vékonybél folyadékban megjelent szabad zsírsavak mennyiségét, azok emésztményben mérhető összes mennyiségéhez viszonyítottam, mely által a zsírsavak egyedi felszabadulási arányát kaptam meg. Az így kapott eredmények a kontroll és a tanninnal adagolt emésztések esetén a 6. ábrán láthatók. Az ábrán az hét legnagyobb koncentrációban előforduló zsírsav szerepel.



6. ábra Az emésztésszimulációs kísérletek során talált hét legjelentősebb zsírsav (C14:0; C14:1n-5c; C16:0; C16:1n-7c; C18:0; C18:1n-9c; C18:2n-6c) összehasonlítása százalékos felszabadulásuk alapján. A kék vonal a kontroll felszabadulási arányait mutatja. Minden esetben Student-féle t-próba segítségével hasonlítottam össze az eredményeket, melynek jelölése a következőképpen történt: $p > 0,05$ esetén nincs jelölés; $p < 0,05$ esetén *; $p < 0,01$ esetén **; $p < 0,001$ esetén ***.

A 6. ábrán megfigyelhető, hogy a zsírsavak egyedi felszabadulását tükrözi az összes zsírsav felszabadulás eredményei. A Q tannin esetében megfigyelhető, hogy 0,6%-os koncentráció mellett jelentős gátlás történt minden esetben, ami összhangban van az 5. ábrán tapasztaltakkal. Ezek közül is kiemelendő C14:0, C16:1n-7c C18:1n-9c és C18:2n-6c tapasztalt csökkenés (19,2%; 21,8%; 25,0%; 20,9% csökkenés a kontrollhoz képest).

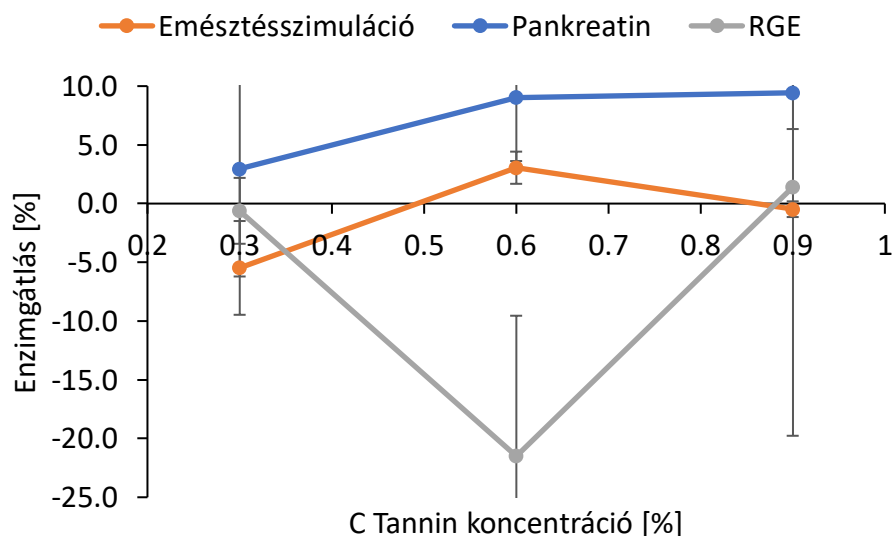
Ezek a zsírsavak aszimmetrikus triacilglicerinek alkotnak (Smith et al., 1998). Az aszimmetrikus triacilglicerinek az RGE enzimkomplexben található lipáz enzim aktivitásának hatására a gyomorban előemésztődnek. Ha ez az előemésztés – RGE gátlás révén – elmarad, a vékonybélbe jutó aszimmetrikus triacilglicerinek emészthetősége – ezzel együtt az ezeket alkotó zsírsavak emészthetősége – csökken, hiszen ezek a pankreatin számára kevésbé preferált szubsztrátot jelentenek (Tormási és Abrankó, 2023). Ezen zsírsavak specifikus gátlása erre a jelenségre utal, vagyis a Q tannin feltehetőleg gyomri lipáz gátlással feje ki a hatását, így a pankreatin által kevésbé preferált triacilglicerinek, így ezen zsírsavak felszabadulása kissé jobban képes gátlódni.

A C tannin esetében 0,3%-nál és 0,9%-nál az említett zsírsavak esetében pontosan ellentétes jelenség volt tapasztalható. Ebben az esetben még a kontrollnál (71,2% felszabadulás) is nagyobb felszabadulás volt tapasztalható. A 0,6%-os koncentráció mellett minimális gátlást tapasztaltam (abszolút: 3,5%), mely a zsírsavak egyedi felszabadulási arányaiban egységesen tükröződött.

A T tannin esetében 0,3% és 0,6% esetében nem volt számottevő gátlás tapasztalható (abszolút: 4,4%; abszolút: -0,3%). A legnagyobb (0,9%-os) koncentráció mellett nagyobb gátlás volt (6,8%), azonban még mindig a vártaknál kevesebb. Ebben az esetben a 0,6%-os Q tanninál is megfigyelt C16:1n-7c, C18:1n-9c és C18:2n-6c nagyobb mértékben volt gátolva (8,3%; 9,5%, illetve 12,1%), mint a többi zsírsav.

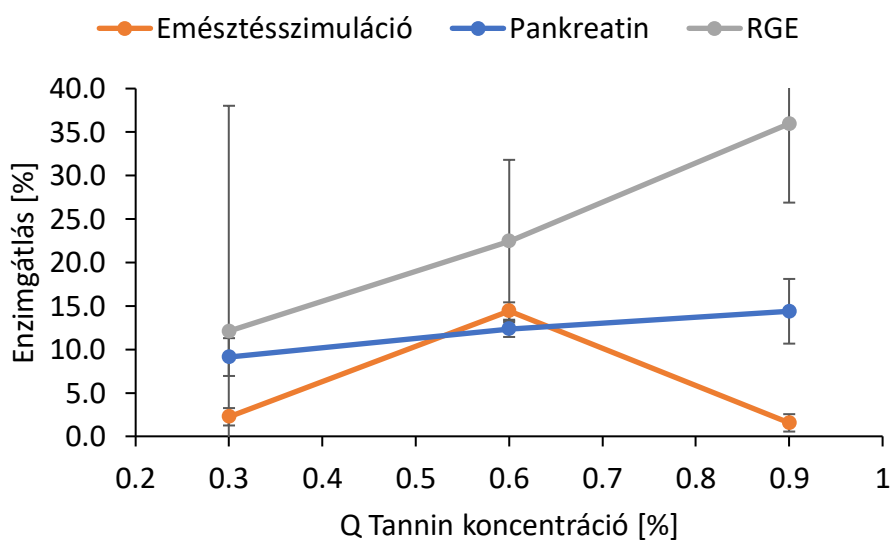
4.3. Lipáz aktivitás mérésének eredményei (inaktiválás utáni titrálással)

A mérés során külön vizsgáltam a tannin kivonatok enzimgátló hatását, pankreatin és az RGE enzimkomplexeken, és összevettem az emésztésszimuláció után mért zsírsav emészthetőségbeli különbségekkel (gátlással). A kísérletet mindkét enzimmel, mindhárom tannin koncentráció mellett elvégeztem. Az eredmények a 7-8-9-ábrán láthatóak, rendre a C-Q-T tanninok esetén.



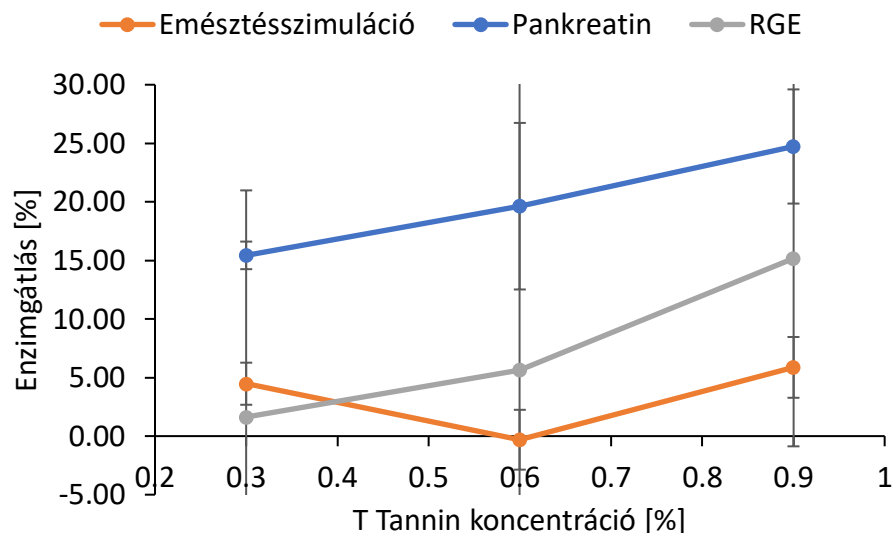
7. ábra A két vizsgált enzim és az emésztésszimuláció során mért enzimgátlás mértéke százalékban kifejezve, a három vizsgált tannin koncentrációnál, C tannin esetében.

A 7. ábra alapján a C tannin esetében a pankreatin enzim aktivitására gyakorolt gátló hatás hasonló trendet mutat, mint az emésztésszimuláció során tapasztalt gátlás, itt a pankreatin gátlása azonban 5%-kal volt jelentősebb. Az RGE enzimmel végrehajtott gátlási kísérletek eredményei csak a 0,6%-os koncentrációnál mutatnak hatást, ami pedig kiemelkedően alacsony volt a kontrollhoz képest. Ez alapján a C tanninnak nincs jelentős hatása az RGE enzimkomplex lipáz enzimére, azonban a hasnyálmirigy lipáz aktivitását némileg csökkenteni képes. Az *in vitro* emésztésszimuláció során mért eredmények korrelálnak a pankreatinra kifejtett hatással, melyet némileg módosít a gyomri szakaszban lezajló zsíremésztés zavartalansága, melyet a C tannin RGE-vel szemben tanúsított inertsége okoz.



8. ábra A két vizsgált enzim és az emésztésszimuláció során mért enzimgátlás mértéke százalékban kifejezve, a három vizsgált tannin koncentrációnál, Q tannin esetében.

A 8. ábra a Q tannin hozzáadásával mért enzimgátlás eredményeit mutatja. Ennél a tanninnál az RGE gátlása volt a leginkább jelentős. A pankreatin szintén egyre nagyobb aktivitás csökkenéssel reagált az egyre nagyobb tannin koncentrációk jelenlétében, azonban ezek az értékek elmaradtak az RGE-től. Ezen eredmények alátámasztják a zsírsav-specifikus felszabadulás során tett megállapításokat, melyek a Q tannin RGE gátlására utaltak.



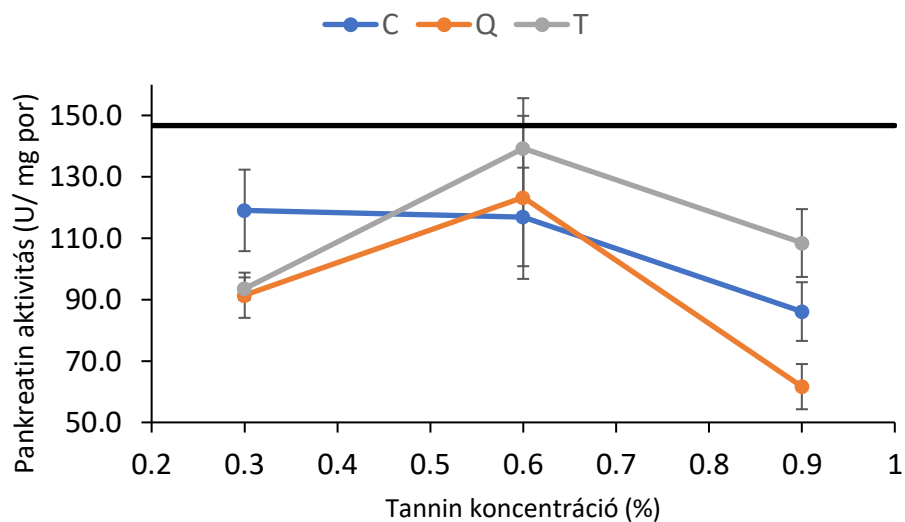
9. ábra A két vizsgált enzim és az emésztésszimuláció során mért enzimgátlás mértéke százalékban kifejezve, a három vizsgált tannin koncentrációnál, T tannin esetében.

A 9. ábrán láthatóak a T tannin használata melletti enzimgátlás eredményei. Itt ismét a pankreatin gátlása volt a legjelentősebb (csakúgy, mint C esetében), és egyfajta párhuzamban vannak az értékek az RGE-re kapott értékekkel, azonban kb. 10%-kal elmaradnak az RGE értékei a pankreatin értékeitől.

A három tannin eredményei alapján megállapítható, hogy a hidrolizálható tanninok nagyobb mértékben gátolják a pankreatint, mint az RGE-t, míg a kondenzált tannin esetében ez fordítva érvényesül.

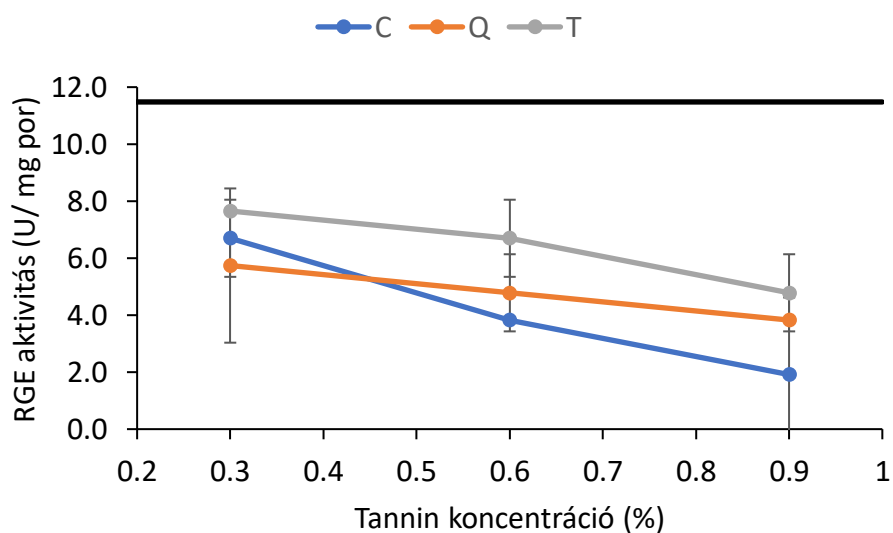
4.4. Lipáz aktivitás mérésének eredményei (Grundy et al., 2021 alapján)

Az enzimek aktivitását és a tanninok enzimaktivitásra gyakorolt specifikus hatását egy másik módszerrel is megmértem (Grundy et al., 2021). Az előzőekben bemutatott – adott reakció idő alatt kifejtett hatás elvén működő – módszerhez képest, ez a módszer egy korszerűbb elven működő protokoll, ahol az enzim aktivitását folyamatosan fenntartva vizsgálhatjuk az egyes gátlószerek hatásának mértékét. Az aktivitást ebben az esetben, a folyamatosan felszabaduló szabad zsírsavak semlegesítéséhez szükséges NaOH (0,01 M) áram (mL/min) alapján számolhatjuk. Az így kapott enzimaktivitás vizsgálat eredménye a három tannin kivonat hozzáadásával pankreatin esetén a 10. ábrán és RGE esetén a 11. ábrán látható.



10. ábra Pankreatin enzim aktivitása a három vizsgált tannin esetében 0,3%-os, 0,6%-os és 0,9%-os koncentráció mellett. A fekete vonal a kontroll értéket jelöli.

A 10. ábrán bemutatott adatok azt mutatják, hogy a tannin kivonatoknak minden koncentrációban lehet gátló hatása a hasnyálmirigy lipáz aktivitására, azonban a hatás nem feltétlen dózis-függő.



11. ábra RGE enzim aktivitása a három vizsgált tannin esetében 0,3%-os, 0,6%-os és 0,9%-os koncentráció mellett. A fekete vonal a kontroll értéket jelöli.

A 11. ábrán bemutatott eredmények esetén azonban dózis-függő RGE lipáz gátlás figyelhető meg, vagyis arra utal, hogy a tannin koncentráció növelésével nő a kifejtett hatás.

A fenti ábrák alapján a tannin-oldatok a kontrollhoz (csak enzim) viszonyított gátló hatását is kiszámoltam, melyet a 8. táblázatban tüntettem fel.

8. táblázat Pankreatin és RGE enzim gátlása %-ban kifejezve, a három vizsgált tannin esetében 0,3%-os, 0,6%-os és 0,9%-os koncentráció mellett

Tannin koncentráció	Pankreatin gátlás (%)			RGE gátlás (%)		
	C	Q	T	C	Q	T
0,3%	18,8	37,7	36,2	41,7	50,0	33,3
0,6%	20,3	15,9	5,1	66,7	58,3	41,7
0,9%	41,3	58,0	26,1	83,3	66,7	58,3

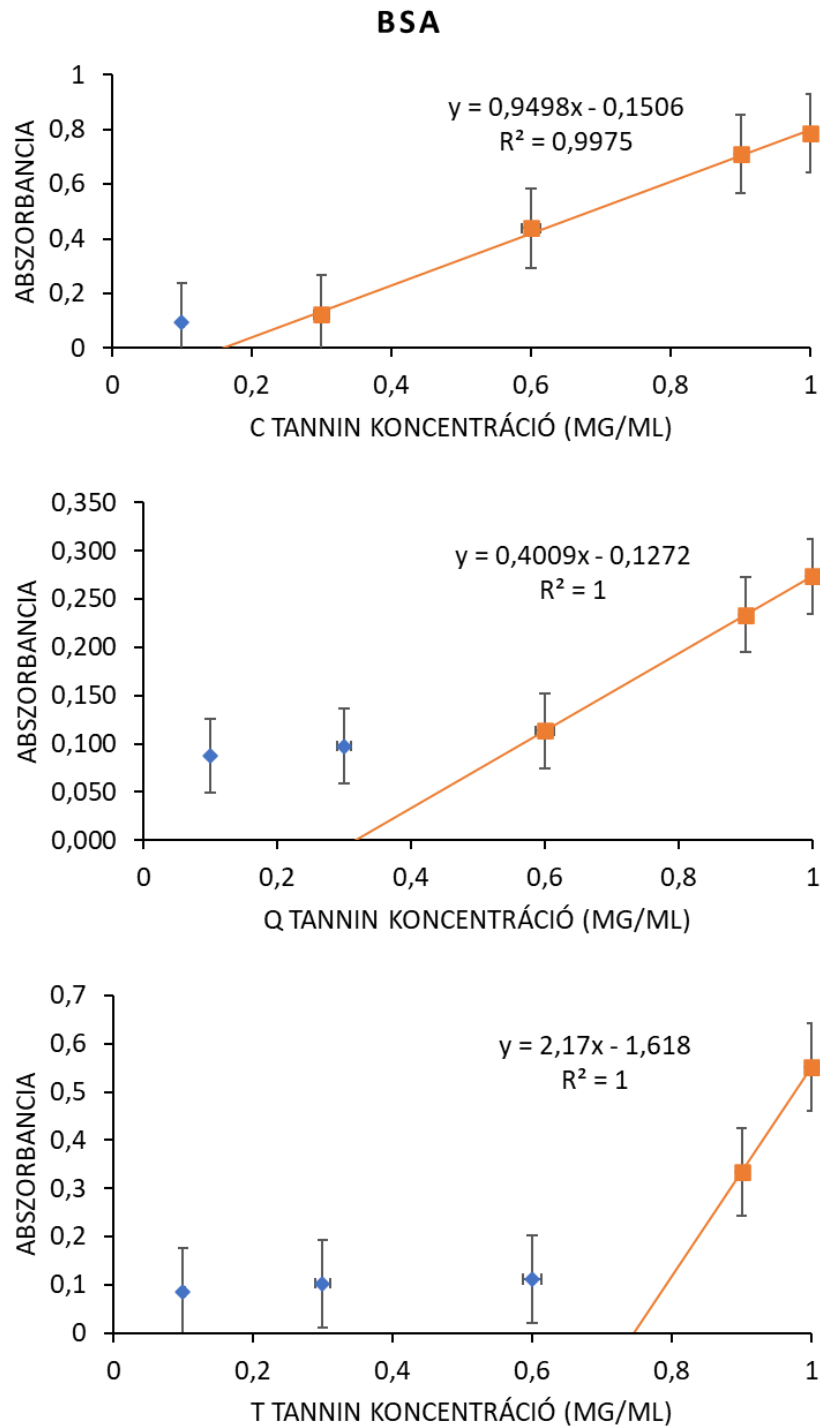
A 8. táblázat a gátlás százalékokat mutatja be. Az RGE gátlása minden esetben nagyobb volt, mint a pankreatiné, ami azonban fordítva volt megfigyelhető az inaktiválás után mért enzim gátlás esetén. Ettől eltekintve a mérés eredményei hasonlítanak az inaktivitás utáni titrálós módszer eredményeihez (kivéve Q). A különbség feltehetően magyarázható azzal, hogy ebben az esetben folyamatosan működik az enzim, ezáltal a kifejtett gátló hatás is jelentősebb lehet, mint a másik módszernél, ahol csak adott ideig reagáltatjuk az enzimet.

A Q tannin eltérő viselkedése a két különböző típusú enzimaktivitás teszt során, szintén utalhat a Q tannin egyedi jellegére, mely az *in vitro* emésztésszimuláció eredményéből is levonható volt, és feltehetőleg az összetételéből – kondenzált tannin – adódhat.

4.5. Fehérjekicsapás eredményeinek kiértékelése

A mérések során három fehérjeforrást használtam (BSA, pankreatin, RGE). Ebben az esetben is mindhárom tannin hatását megvizsgáltam, ebben az esetben hígítási sort készítettem belőlük. A kísérlet célja, hogy megvizsgáljam melyik tannin, milyen mértékben képes kicsapni a fehérjéket a különböző mintákból, valamint melyik az a legkisebb koncentráció, ami szükséges a reakcióhoz. A kísérlet végén kapcsolatot kerestem a kicsapott fehérje mennyisége és a zsíremészthetőség gátlása között.

A mért eredmények a 12-13. ábrán láthatóak, BSA és az emésztőenzimek esetén, rendre.



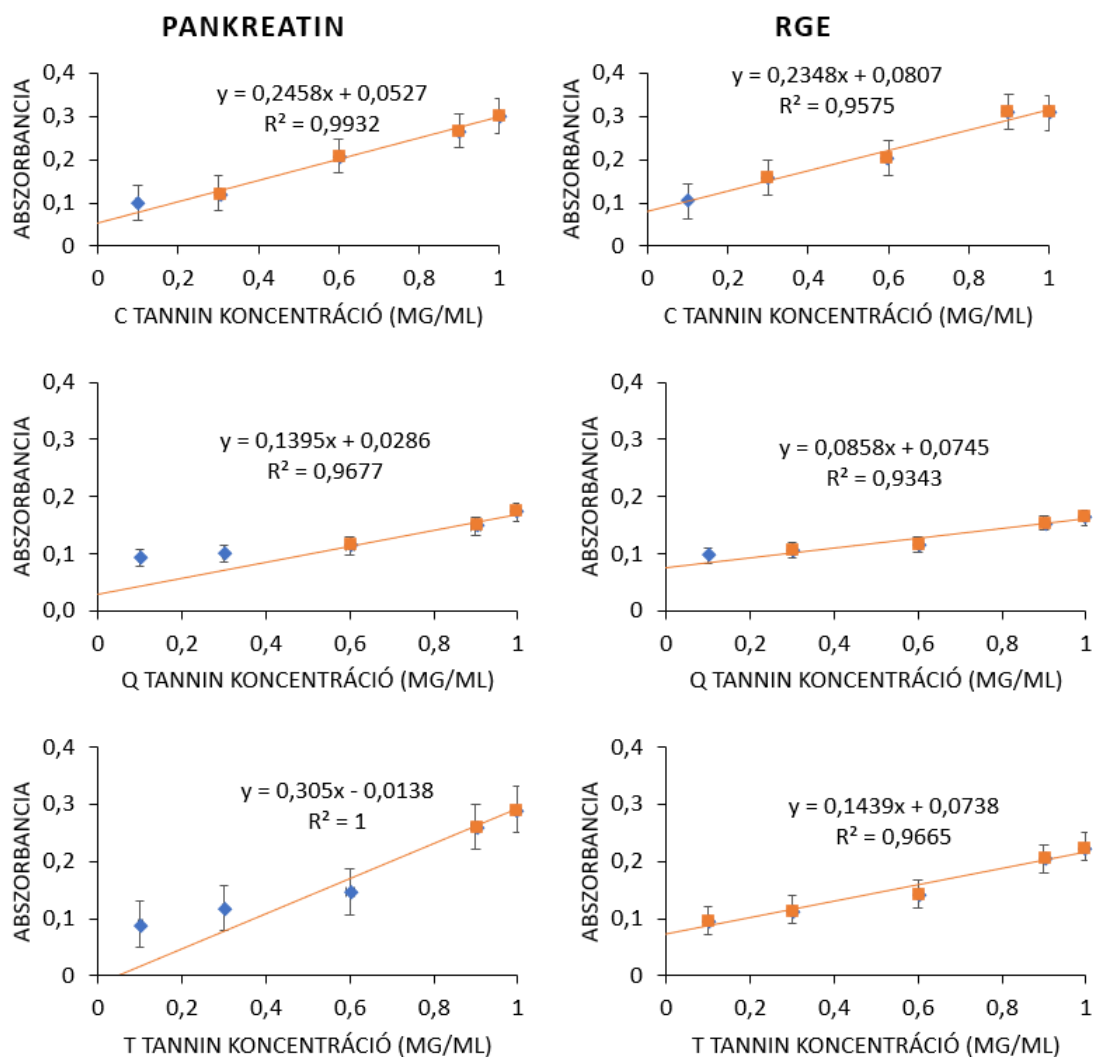
12. ábra Fehérjekicsapás eredményei C, Q és T tannin esetében, a hígítási koncentrációk és a hozzájuk tartozó abszorbancia értékek ábrázolásával, BSA alkalmazása mellett.

A 12. ábrán látható értékek minden tannin esetében és minden koncentráció között szignifikánsak voltak ($p < 0,05$). Az értékelés során a 0,1-es abszorbancia értéket tekintettem a kicsapás alsó határának, vagyis az ez alatti eredmények esetén nem volt fehérjekicsapás tapasztalható.

Mivel az abszorbanca érték arányos a fehérjekicsapással (A. E. Hagerman & Butler, 2002), ezért megállapítható, hogy C tannin rendelkezik a legnagyobb fehérje kicsapó képességgel. Ezen felül szintén a C tannin esetén már 0,3 mg/mL-es tannin koncentrációnál észlelhető volt a fehérjekicsapás. A T tannin esetében már 0,9 mg/mL-es koncentrációra volt szükség ahhoz, hogy fehérjekicsapás legyen észlelhető, ez a tannin azonban szintén nagyobb mennyiségben volt képes kicsapni a BSA fehérjét. A Q tannin esetében közepes koncentráció tartományban (0,6 mg/mL-es koncentrációnál) már volt észlelhető fehérjekicsapás, azonban az abszorbanca értékek általánosságban alacsonyabbak volt, mint a másik két tannin esetében, vagyis a hatás mértéke kisebb volt.

Ez alapján arra következtethetünk, hogy a kondenzált tanninok fehérjekicsapó jellege kevésbé hatékony a hidrolizálható tanninokkal szemben. Valamint az is elmondható, hogy az ellagitanninok (C) fehérjekicsapása a legjelentősebb, valamint a gallotanninok (T) esetében nagyobb koncentráció szükséges. Ez tovább erősíti a szerkezetből adódó eltéréseket a három tannin hatásában. Az ellagitanninok abban különböznek a gallotanninoktól, hogy galloilcsoportjaik C-C kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, míg a gallotanninok galloilcsoportjait depsidkötések kötik össze (Sáyago-Ayerdi et al., 2013).

A BSA referencia mellett a tannin kivonatok a két vizsgált enzimmel szemben mutatott specifikus kicsapási tulajdonságait is megvizsgáltam, méghozzá az emésztés során alkalmazott kémhatás figyelembe vételével. Az RGE-re kifejtett hatást pH=3 puffer oldatban, míg pankreatinra kifejtett hatást pH=7-es puffer oldatban előkészítve végeztem el a kísérleteket. A kapott eredmények a 14. ábrán láthatók.



13. ábra Fehérjekicsapás eredményei C, Q és T tannin esetében, a hígítási koncentrációk és a hozzájuk tartozó abszorbancia értékek ábrázolásával, pankreatin és RGE alkalmazása mellett.

A 13. ábrán látható értékek összhangban vannak a BSA során tapasztalt felvetésekkel, azonban pankreatin esetében általánosságban alacsonyabb volt a fehérjekicsapás mértéke. Ebben az esetben Q tanninnál a legmagasabb koncentráció mellett sem érte el az abszorbancia a 0,2-es értéket, ami rendkívül alacsony fehérjekicsapást jelent, tekintve, hogy 0,1-es értéktől észlelhető a kicsapás.

RGE esetében is a pankreatinhoz hasonló mértékű fehérjekicsapás történt, azonban a T tannin értékei kissé elmaradtak a C-hez képest, csakúgy, mint a BSA esetében. Ezen felül a C tanninnál az is megfigyelhető, hogy az értékek a koncentráció növelésével ellaposodtak. Mivel a többi tannin esetében az értékek nem érték el a 0,3-as abszorbancia szintet, így csak feltételezni lehet, hogy 0,9 mg/mL-es koncentráció után a nagyobb tannin koncentráció nem okoz nagyobb fehérjekicsapást, mivel a különböző fehérje források azonos mennyiségű fehérjét tartalmaztak.

A pankreatin és RGE eredményei összhangban vannak A. Hagerman et al., 1992 eredményeivel, aki arra a következtetésre jutott, hogy önmagában a kondenzált és hidrolizálható tanninok fehérjekicsapása között nincs jelentős különbség. A molekulatömeg játszik döntő szerepet, miszerint a kicsapható mennyiség arányosan nő a tanninok molekulatömegével. Ezen felül az alkalmazott pH szintén meghatározó tényező az interakció során, amit a kísérleteim szintén igazoltak, hiszen a különböző pH-n végzett kicsapások T tannin esetén jelentős különbséget mutattak. Ez az eredmény fontos szempont lehet az emésztés egyes szakaszaiban kifejtett hatás vizsgálatakor, hiszen a kémhatás emésztés során szisztematikusan változik.

Az ok, amiért a fenti eredmények nem tükrözik az emésztésszimuláció során tapasztaltakat az lehet, hogy bár a fehérjekicsapás mérése során egyformán érvényesülnek – azonos reakció idő, ideális körülmények – a tanninok, az emésztés során ez nem így van. A hidrolizálható tanninok például a gyomor savas közegében könnyebben lebomlanak, így a fehérjekicsapó képességük – mely molekulaméret függő is – elveszhet az emésztés előrehaladtával. A hidrolizálódást követően a keletkező galluszsav felszívódik és a vizelettel ürül ki. Ezzel szemben a kondenzált tanninok metabolizmusa jóval összetettebb, kevésbé hajlamos a savas közegű hidrolízisre, valamint az így megmaradó nagyobb molekulatömeg arányaiban jelentősebb fehérje-tannin interakciót tehet lehetővé, így a gyomri szakaszban nagyobb hatással lehet az emésztésre is. Ez a folyamat szintén alátámaszthatja a zsírsav-specifikus eredmények következtetéseit, miszerint a gyomorban RGE lipázra kifejtett hatás kondenzált tannin esetén tud érvényesülni, míg hidrolizálható tannin esetén nem.

5. Következtetések és javaslatok

5.1. Következtetések

A proantocianidin meghatározása során azt találtam, hogy Porter et al., 1985-ban végzett kutatása során alkalmazott módszer alkalmas a tannin kivonatok vizsgálatára. Kizárólag a Q jelölésű (kondenzált) tannin esetében kaptam pozitív válaszreakciót, ez alapján megerősítést nyert a minták tannin összetétele.

Az *in vitro* emésztésszimuláció során kapott eredmények alapján (5. és 6. ábra) megállapítható, hogy egyedül Q tannin (kondenzált tannin) esetében volt számottevő gátlás (14,2%-os csökkenés a kontrollhoz képest) tapasztalható, 0,6%-os tannin koncentráció mellett. Ebből arra lehet következtetni, hogy a hidrolizálható tanninok nem vagy csak kis mértékben befolyásolják a zsírok emészthetőségét. A zsírsav specifikus emészthetőség eredményei összhangban vannak az emésztésszimulációs eredményekkel. A 0,6%-os tannin koncentráció esetében, Q tannin alkalmazása során C14:0, C16:1n-7c C18:1n-9c és C18:2n-6c esetében volt jelentős gátlás (19,2%; 21,8; 25,0%; 20,9% csökkenés a kontrollhoz képest). Ezek a zsírsavak aszimmetrikus triacilglicerineket alkotnak (Smith et al., 1998), melyek a pankreatin által kevésbé preferált triacilglicerinek. A gyomri előemésztés hiányában – RGE lipáz gátlása esetén – ezen zsírsavak emészthetősége csökken, így ezen zsírsavak felszabadulása kissé jobban képes gátlódni. Mivel kizárólag a 0,6%-os tannin koncentráció mellett történt jelentős gátlás, így arra következtethetünk, hogy nagyobb koncentráció esetében a tanninok egymást gátolják. Miután a tanninok körbe ölelik a szubsztrátot, ezt követően a többi tannin már nem képes kiváltani a hatását.

A lipáz aktivitás mérése során tapasztalt eredmények inaktiválás utáni titrálás esetében azt mutatták, hogy Q tannin esetében az RGE gátlása jelentősebb volt, mint a pankreatin (5-20%-os különbség a koncentráció függvényében). Ez összhangban van a zsírsav-specifikus emészthetőség eredményeivel. Ezzel szemben C és T tanninok (hidrolizálható tanninok) esetében pankreatin esetében volt nagyobb gátlás tapasztalható. Ebből arra következtethetünk, hogy a hidrolizálható tanninok nagyobb eséllyel bontják a szimmetrikus triacilglicerineket.

Ezzel szemben a másik módszer esetében, ahol statikus pH mellett történt a titrálás kissé eltérő eredményeket tapasztaltam. A kapott lipáz aktivitás értékek azonban egybevágnak az irodalmi adatokkal, Grundy et al., 2021 alapján. Ennél a módszernél mindhárom tannin esetében az RGE gátlása volt a nagyobb mértékű, valamint a gátlás értékei is magasabbak

voltak, mint az inaktiválás utáni titrálás esetében. Ez azzal magyarázható, hogy ebben az esetben tovább működött az enzim, ezáltal nagyobb gátló hatást tudott kifejteni, mint az inaktiválás mérése utáni esetben.

A fehérjekicsapás eredményei azt mutatták, hogy minden tannin esetében más minimális koncentráció szükséges a mérhető mennyiségű fehérjekicsapásához. A C tannin esetében volt ez a koncentráció a legalacsonyabb (~0,3% tannin), ezt követte a Q tannin (~0,4%), végül a T tannin (~0,6%). BSA használata mellett volt a legnagyobb fehérjekicsapás tapasztalható a mért abszorbancia alapján (0,9-es maximális abszorbancia érték). Megállapítható, hogy pankreatin és RGE között nem volt jelentős különbség fehérjekicsapás tekintetében, valamint a kondenzált és hidrolizálható tanninok között sem volt jelentős különbség. Ez az eredmény összhangban van A. Hagerman et al., 1992 méréseivel, aki szintén azt a megállapítást tette, hogy önmagában a kondenzált és hidrolizálható tanninok fehérjekicsapása között nincs jelentős különbség. Következtetésként továbbra is igaz A. Hagerman et al., 1992 megállapítása, miszerint a kicsapás mértékét jelentős mértékben a pH és a molekulaméret határozza meg.

A mérési eredményeim, vagyis hogy az emésztésszimuláció során egyedül a Q tannin (kondenzált) bizonyult eredményesnek, a tanninok közti szerkezeti különbséggel magyarázható.

A C és T tanninok, azaz a hidrolizálható tanninok könnyebben lebomlanak az emésztésszimuláció során a gyomri szakaszban fellépő alacsony kémhatás hatására, így feltehetőleg nem a fehérjekicsapás és a gyomri lipáz gátlás nem tud érvényesülni, így kisebb mértékben – vagy egyáltalán nem – tudják befolyásolni a zsírok emészthetőségét. A hidrolizálódást követően a keletkező galluszsav felszívódik, és a vízzel ürül ki.

Ezzel szemben a Q tannin, vagyis a kondenzált tanninok metabolizmusa jóval összetettebb. A gyomri savas pH-n nem hidrolizálható, így a fehérjekicsapási képessége és az enzimgátlási hajlama is érvényesülni tud, ami jelentős zsíremészthetőség csökkenést eredményez. Emellett azt is meg kell említeni, hogy ennek a hatásnak optimuma van (0,6% tannin koncentráció), mely felett és alatt sem tud érvényesülni a gátló hatás.

5.2. Javaslatok

Mivel az irodalomban rendkívül alacsony számú kísérlet foglalkozik a tanninok zsírok emészthetőségére gyakorolt hatásával, így javasolnám ezen adatok bővítését. A méréseim során darált marhahúst vizsgáltam, szükségesnek tartom egyéb mátrixok vizsgálatát is, mint például tejtermékek és egyéb magas zsírtartalmú élelmiszerek.

Ezen felül további vizsgálatokat javasolnék a fehérjeemészthetőség vizsgálatára, illetve a zsír- és fehérjeemésztés összefüggésének vizsgálatára. További visszaigazolás szükséges arra a kijelentésre, miszerint a hidrolizálható tanninok nincsenek hatással az emésztésre, mivel idő előtt elhidrolizálnak.

Végezetül pedig javasolnám további kondenzált tanninok zsíremészthetőségre gyakorolt hatásának vizsgálatát, annak érdekében, hogy igazolni lehessen, hogy valóban van hatásuk.

6. Összefoglalás

Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap a túltápláltság, és az abból adódó egészségügyi következmények. Az egyik fő probléma a zsírok és zsíros élelmiszerek túlzott mennyiségű bevitele. Az elhízásra és annak megelőzésére egyre többen hívják fel a figyelmet, egyre több élelmiszergyártó törekszik az egészségesebb termékek előállítására. Az egyik lehetőség a megfelelőbb tápanyagok bevitelére, hogy a meglévő élelmiszerekhez olyan adalékanyagot adunk, melyek az adott termék tápanyagértékeit kedvezően befolyásolják. Erre a lehetőségre lehet egy lehetséges megoldás a tanninok hozzáadása a termékekhez. A tanninok polifenol vegyületek, melyek két fő csoportba sorolhatóak; hidrolizálható tanninok és kondenzált tanninok. Takarmányok esetében már számos esetben kimutatták, hogy a tanninok jelenléte csökkenti az emésztés során a fehérjék és rostok emészthetőségét.

Munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a tanninok ezek mellett csökkenthetik-e a zsírok emészthetőségét is, ezáltal a zsírok bevitelének mennyiségére is hatással lehetnek-e. Ennek igazolására a SilvaTeam által szolgáltatott, kereskedelmi forgalomban is kapható különböző tannin kivonatokat vizsgáltam. Első lépésben igazoltam a tanninok összetételét az alapján, hogy kondenzált vagy hidrolizálható tannint tartalmaznak. Ezt követően egy statikus *in vitro* emésztésszimulációt végeztem el az Infogest módszer alapján, mely során darált marhús szolgált mátrixként. A szimulációt követően külön megvizsgáltam a tanninok a szimuláció során használt enzimek (pankreatin, RGE) lipáz aktivitására gyakorolt hatását. Erre két módszert is elvégeztem, hogy átfogóbb képet kapjak a tanninok hatásáról. Végül a kivonatok fehérjekicsapását vizsgáltam, melyet a zsíremészthetőségre gyakorolt hatással hasonlítottam össze, illetve vontam le következtetéseket.

Az eredmények kiértékelése során azt tapasztaltam, hogy a Q jelölésű (kondenzált) tannin volt egyedül jelentős hatással a zsíremészthetőségre, méghozzá 0,6%-os tannin koncentráció mellett. A zsírsav-specifikus emészthetőség vizsgálata során ezzel összefüggésben voltak a felszabadulási értékek, ahol azt tapasztaltam, hogy főként az aszimmetrikus triacilglicerinek gátlása volt megfigyelhető, amiből arra következtethetünk, hogy az RGE gátlása lép fel a Q tannin hatására. A lipáz aktivitás mérése során szintén azt tapasztaltam, hogy Q tannin esetében az RGE gátlása volt a jelentősebb, míg a hidrolizálható tanninok esetében a pankreatin gátlása az inaktiválás utáni titrálás esetében. A másik módszer során (statikus pH melletti titrálás) minden tannin esetében az RGE gátlása volt a jelentősebb. A két módszer

értékei összességben párhuzamban voltak (kivéve Q tannin esetében, ami szintén a kondenzált tanninok különbözőségére utalhat), azonban az értékek eltértek a módszerek különbözőségei miatt. A fehérjekicsapás során BSA-t is vizsgáltam, a pankreatin és RGE mellett. Összességében a különböző típusú tanninok fehérjekicsapási értékei között nem volt számottevő különbség, tehát a kicsapás mértékét nem a tannin típusa, hanem a pH és a molekulaméret befolyásolja.

Az a megállapítás, hogy az emésztésszimuláció során egyedül a kondenzált tanninnak volt hatása valószínűleg azzal magyarázható, hogy a hidrolizálható tanninok az emésztés kezdeti szakaszában elhidrolizálódnak, ezáltal nem képesek kifejteni a hatásukat az emésztés lefolyására, míg a kondenzált tanninok összetettebbek, nagyobb rezisztenciával rendelkeznek az emésztés során, így a feltárt hatásukat ki tudják fejteni az emésztés során.

Mivel az irodalomban kevés adat áll rendelkezésre a tanninok zsíremészthetőségre gyakorolt hatásával kapcsolatban, ezért további mérések szükségesek, melyek során további mátrixok, illetve tanninok vizsgálatát javasolnám. Ezáltal egy átfogóbb képet kaphatunk a tanninok hatásáról és a fő befolyásoló tényezőkről.

7. Irodalmi hivatkozás

1. Alminger, M., Aura, A.-M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., & Santos, C. N. (2014). In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12081>
2. Antal, O., Szerdahelyi, E., & Takács, K. (2020). *In vitro* humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén *Application of in vitro human digestion models in the field of nutrition science*.
3. Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135(3), 1708–1717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>
4. Authority (EFSA), E. F. S. (2017). Dietary Reference Values for nutrients Summary report. *EFSA Supporting Publications*, 14(12), e15121E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>
5. Bartoshuk, L. M., Duffy, V. B., Hayes, J. E., Moskowitz, H. R., & Snyder, D. J. (2006). Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: Problems, solutions and new perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1471), 1137–1148. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1853>
6. Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. *Food & Function*, 1(1), 73–83. <https://doi.org/10.1039/C0FO00008F>
7. Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
8. Buggenhout, S. V., Alminger, M., Lemmens, L., Colle, I., Knockaert, G., Moelants, K., Loey, A. V., & Hendrickx, M. (2010). In vitro approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced

microstructural changes. *Trends in Food Science and Technology*, 21(12), 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.09.010>

9. Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., Ieri, F., & Romani, A. (n.d.). Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(12), 1179–1187.

10. Claude, M., Lupi, R., Picariello, G., Drouet, M., Larré, C., Denery-Papini, S., & Brossard, C. (2019). Digestion differently affects the ability of native and thermally aggregated ovalbumin to trigger basophil activation. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 118, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.040>

11. Drewnowski, A., Brunzell, J. D., Sande, K., Iverius, P. H., & Greenwood, M. R. (1985). Sweet tooth reconsidered: Taste responsiveness in human obesity. *Physiology & Behavior*, 35(4), 617–622. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90150-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90150-7)

12. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3), 1461. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461>

13. Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>

14. Field, C. J., & Robinson, L. (2019). Dietary Fats. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(4), 722–724. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz052>

15. Fritz P., Ignits D., & Katona S. (2018). A zsírok táplálkozás-élettani hatásai, valamint a sporttáplálkozásban betöltött szerepük. *recreation*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.21486/recreation.2018.8.3.1>

16. Dr. Mandl József (2006): Biokémia. Semmelweis Kiadó, Budapest

17. George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan--a review. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 114(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>

18. Glabasnia, A., & Hofmann, T. (2006). Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European Oak Wood (*Quercus robur* L.) and Quantitative Analysis in Bourbon Whiskey and Oak-Matured Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3380–3390. <https://doi.org/10.1021/jf052617b>
19. Griffiths, D. W. (1986). The Inhibition of Digestive Enzymes by Polyphenolic Compounds. In M. Friedman (Ed.), *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods* (pp. 509–516). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0022-0_29
20. Grundy, M. M. L., Abrahamse, E., Almgren, A., Alminger, M., Andres, A., Ariëns, R. M. C., Bastiaan-Net, S., Bourlieu-Lacanal, C., Brodkorb, A., Bronze, M. R., Comi, I., Couëdelo, L., Dupont, D., Durand, A., El, S. N., Grauwet, T., Heerup, C., Heredia, A., Infantes Garcia, M. R., ... Carrière, F. (2021). INFOGEST inter-laboratory recommendations for assaying gastric and pancreatic lipases activities prior to in vitro digestion studies. *Journal of Functional Foods*, 82, 104497. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104497>
21. Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
22. Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (2002, May 1). *Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf60218a027>
23. Hagerman, A., Robbins, C., Weerasuriya, Y., Wilson, T., & Mcarthur, C. (1992). Tannin Chemistry in Relation to Digestion. *Journal of Range Management*, 45, 57–62. <https://doi.org/10.2307/4002526>
24. Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73(2), 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.004>
25. Han, K.-H., Kitano-Okada, T., Seo, J.-M., Kim, S.-J., Sasaki, K., Shimada, K., & Fukushima, M. (2015). Characterisation of anthocyanins and proanthocyanidins of adzuki bean extracts and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 14, 692–701. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.018>
26. Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)

27. Harvey, I., & Mcallan, A. (1992). *Tannins: Their biochemistry and nutritional properties*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Tannins%3A-their-biochemistry-and-nutritional-Harvey-Mcallan/c2fbf48eae80e214f2e9476f986aa41efc330>
28. Haslam, E. (1989). *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. CUP Archive.
29. Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59(2), 205–215. Scopus. <https://doi.org/10.1021/np960040+>
30. Haslam, E. (2007). Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68(22), 2713–2721. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.009>
31. Jyothi Lakshmi, A., Gupta, S., & Prakash, J. (2006). Comparative analysis of influence of promoters and inhibitors on in vitro available iron using two methods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(7–8), 559–569. <https://doi.org/10.1080/09515070601043328>
32. Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>
33. Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 513–539. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.005>
34. Levi, C. S., & Lesmes, U. (2014). Bi-compartmental elderly or adult dynamic digestion models applied to interrogate protein digestibility. *Food & Function*, 5(10), 2402–2409. <https://doi.org/10.1039/c4fo00478g>
35. Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 107, 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>
36. Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunteun, S. L., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A.

- (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
37. Mozaffarian, D., Jacobson, M. F., & Greenstein, J. S. (2010). Food reformulations to reduce trans fatty acids. *The New England Journal of Medicine*, 362(21), 2037–2039. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1001841>
38. Nakayama, Y., Takahashi, M., Fukuyama, Y., & Kinzyo, Z. (1989). An Anti-plasmin Inhibitor, Eckol, Isolated from the Brown Alga Ecklonia kurome Okamura. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 3025–3030. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869774>
39. Nelson, T., Stephenson, E., Burgos, A., Floyd, J., & York, J. (1975). Effect of Tannin Content and Dry Matter Digestion on Energy Utilization and Average Amino Acid Availability of Hybrid Sorghum Grains. *Poultry Science*, 54, 1620–1623. <https://doi.org/10.3382/ps.0541620>
40. Norton, J. E., Wallis, G. A., Spyropoulos, F., Lillford, P. J., & Norton, I. T. (2014). Designing Food Structures for Nutrition and Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 177–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092315>
41. Okuda, T. (1997). Structure-Activity Relationship of Antioxidant and Antitumor Polyphenols. In H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, & T. Yoshikawa (Eds.), *Food Factors for Cancer Prevention* (pp. 280–285). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-67017-9_56
42. Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66(17), 2012–2031. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.023>
43. Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/molecules16032191>
44. Okuda, T., Mori, K., & Hatano, T. (1985). Relationship of the Structures of Tannins to the Binding Activities with Hemoglobin and Methylene Blue. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33(4), 1424–1433. <https://doi.org/10.1248/cpb.33.1424>

45. Okuda, T., Yoshida, T., & Hatano, T. (1995). Hydrolyzable Tannins and Related Polyphenols. In R. G. S. Berlinck, T. Hatano, T. Okuda, T. Yoshida, W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, & Ch. Tamm (Eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (pp. 1–117). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9363-1_1
46. Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., & Ito, H. (2009). Ellagitannins renewed the concept of tannins. In *Chemistry and Biology of Ellagitannins* (pp. 1–54). World Scientific Publishing Co. https://doi.org/10.1142/9789812797414_0001
47. Pan, L., Feng, S., Li, W., & Zhu, W. (2023). Sorghum tannin extract impedes in vitro digestibility and fermentability of nutrients in the simulated porcine gastrointestinal tract. *Journal of Animal Science*, 101, skad126. <https://doi.org/10.1093/jas/skad126>
48. Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)
49. Quideau, S., & Feldman, K. S. (1996). Ellagitannin Chemistry. *Chemical Reviews*, 96(1), 475–504. <https://doi.org/10.1021/cr940716a>
50. Rodriguez, N. R., DiMarco, N. M., Langley, S., American Dietetic Association, Dietitians of Canada, & American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. (2009). Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(3), 509–527. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.01.005>
51. Rogerson, D. (2017). Vegan diets: Practical advice for athletes and exercisers. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14, 36. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0192-9>
52. Salminen, J.-P., Karonen, M., & Sinkkonen, J. (2011). Chemical Ecology of Tannins: Recent Developments in Tannin Chemistry Reveal New Structures and Structure–Activity Patterns. *Chemistry – A European Journal*, 17(10), 2806–2816. <https://doi.org/10.1002/chem.201002662>
53. Sáyago-Ayerdi, S. G., Moreno-Hernández, C. L., Montalvo-González, E., García-Magaña, M. L., Mata-Montes de Oca, M., Torres, J. L., & Pérez-Jiménez, J. (2013). Mexican

‘Ataulfo’ mango (*Mangifera indica* L) as a source of hydrolyzable tannins. Analysis by MALDI-TOF/TOF MS. *Food Research International*, 51(1), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.034>

54. Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 21–40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

55. Smith, S. B., Yang, A., Larsen, T. W., & Tume, R. K. (1998). Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation. *Lipids*, 33(2), 197–207. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0196-8>

56. Sosnowska, D., Podsędek, A., Redzynia, M., & Żyżelewicz, D. (2015). Effects of Fruit Extracts on Pancreatic Lipase Activity in Lipid Emulsions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 344–350. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0501-x>

57. Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>

58. Tormási, J., & Abrankó, L. (2023). Impact of Grape Seed Powder and Black Tea Brew on Lipid Digestion—An In Vitro Co-Digestion Study with Real Foods. *Nutrients*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/nu15102395>

59. van Acker, S. A. B. E., van Balen, G. P., van den Berg, D., Bast, A., & van der Vijgh, W. J. F. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 56(8), 935–943. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00102-6)

60. Verhoeckx, K., Bøgh, K. L., Dupont, D., Egger, L., Gadermaier, G., Larré, C., Mackie, A., Menard, O., Adel-Patient, K., Picariello, G., Portmann, R., Smit, J., Turner, P., Untersmayr, E., & Epstein, M. M. (2019). The relevance of a digestibility evaluation in the allergenicity risk assessment of novel proteins. Opinion of a joint initiative of COST action ImpARAS and COST action INFOGEST. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 405–423. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.052>

61. Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T., Shoeppe, T. C., & Vander, A. J. (2019). *Vander’s human physiology: The mechanisms of body function* (Fifteenth edition, international student edition). McGraw-Hill Education.

<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=2947470>

62. Yoshida, T., Amakura, Y., & Yoshimura, M. (2010). Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms11010079>
63. Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., & Okuda, T. (2009). Structural Diversity and Antimicrobial Activities of Ellagitannins. In *Chemistry and Biology of Ellagitannins* (pp. 55–93). WORLD SCIENTIFIC. https://doi.org/10.1142/9789812797414_0002
64. YOSHIDA, T., MORI, K., HATANO, T., OKUMURA, T., UEHARA, I., KOMAGOE, K., FUJITA, Y., & OKUDA, T. (1989). Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V: Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Studies on Inhibition Mechanism of Autoxidation by Tannins and Flavonoids. V: Radical-Scavenging Effects of Tannins and Related Polyphenols on 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radical*, 37(7), 1919–1921.

NYILATKOZAT

Vig András (név) (hallgató Neptun azonosítója: HYQ4CD) 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: 2023 év 11 hó 02 nap


belső konzulens

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Vig András
A Hallgató Neptun kódja:	HYQ4CD
A dolgozat címe:	Élelmiszeriparban alkalmazható tanninkivonatok zsíremészthetőségre gyakorolt hatásának vizsgálata
A megjelenés éve:	2023
A konzulens intézetének neve:	Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Élelmiszerkémia és Analitika 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 állítotam, 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 tulajdon-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: 2023. év 11. hó 04. nap


Hallgató aláírása