

PÁLYAMUNKA

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

**ALMATÖRKÖLY KIVONAT HOZZÁADÁSÁNAK
HATÁSA FEHÉRJEEMÉSZTHETŐSÉGRE**

Effect of apple pomace extract addition on protein digestibility

Készítette: **Kárász Luca Mónika**
KIEZL9
Biomérnök, alapképzés
Nappali tagozat
Budai Campus

Témavezető: Dr. Tormási Judit, Egyetemi adjunktus,
Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

2024
Budapest

Tartalom

1. Bevezetés és célkitűzések.....	3
2. Szakirodalmi áttekintés	5
2.1 Az almatörköly felhasználása	5
2.2 Az almatörköly összetétele, komponensei.....	6
2.3 Emészthetőség vizsgálata.....	6
2.3.1 Infogest módszer	7
2.3.2 Fehérjék emészthetősége	8
2.4 Mintaelőkészítési módszerek	10
2.5 Az almatörköly hatása a fehérjeemészthetőségére	12
3. Anyagok és módszerek.....	14
3.1 Használt anyagok	14
3.1.1 Minták	14
3.1.2 Emésztés.....	14
3.1.3 Mintaelőkészítés.....	16
3.1.4 Fehérjetartalom mérése OPA módszerrel	16
3.1.5 Proantocianidin tartalom meghatározása	17
3.2 Módszerek	17
3.2.1 Emésztés.....	17
3.2.2 Metanolos mintaelőkészítés	18
3.2.3 Integrált mintaelőkészítés	18
3.2.4 Savas hidrolízis	19
3.2.5 Fehérjetartalom meghatározása OPA-módszerrel	19
3.2.6 Proantocianidin tartalom meghatározása	20

3.2.7 Statisztikai elemzés.....	20
4. Kiértékelés.....	21
4.1 A sült marhahús fehérjeemészthetősége	21
4.2 Az almatörköly hatása a fehérjeemészthetőségre	22
4.2.1. Standard mintaelőkészítés után mért eredmények.....	22
4.2.2. Integrált mintaelőkészítés után mért eredmények	23
4.3 A metanolos és integrált mintaelőkészítési módszer összehasonlítása.....	24
4.4 Almatörköly por proantocianidin tartalma.....	27
5. Következtetések.....	29
6. Összegzés	31
7. Irodalomjegyzék.....	33

1. Bevezetés és célkitűzések

Az almatörköly az almafeldolgozó ipar mellékterméke, ami például az almalé gyártása során keletkezik. Ez az ital a második legkedveltebb gyümölcsle a narancslé után és több milliárd litert készítenek belőle évente. Emiatt nagy mennyiségű almatörköly is keletkezik, aminek a nem megfelelő kezelése súlyos természeti szennyezést okozhat vagy közegészségügyi veszélyeket idézhet elő. Azonban az így keletkező mellékterméknek számos ipari szektorban, többek között az élelmiszeriparban is lehetséges a felhasználása. Az élelmiszeriparban a magas tápanyagtartalma miatt feltételezhetően használható étrend kiegészítőként, funkcionális élelmiszerként, illetve élelmiszer adalékanyagként.

Az almatörkölyben található komponensek, mint bioaktív anyagok jelentős szereppel bírnak az almatörkölyt tartalmazó élelmiszerek, illetve ételek szervezetre gyakorolt hatásában. Az almatörkölyben található összetevők, például a rostok vagy a korábban már említett bioaktív vegyületek, befolyásolhatják az almatörkölyvel dúsított élelmiszerek vagy ételek emberi szervezetre gyakorolt hatásait, például az enzimek megkötése vagy azok aktivitásának szabályozása révén.

A fehérjék az emberi szervezet számára nélkülözhetetlenek, így fontos, hogy megfelelő mennyiségű és minőségű fehérjét vigyünk be a szervezetbe. Ha az almatörkölyt magasabb fehérjetartalmú élelmiszerekhez adjuk hozzá – például hibrid hústermékek kialakításának céljából –, akkor a fentiekben említett hatások lényegesek lehetnek az élelmiszerek fehérjemínőségének szempontjából. Emiatt határoztam úgy, hogy megvizsgálom ezeket a hatásokat.

A szakdolgozatom egyik célja, hogy megvizsgáljam az almatörköly kivonat fehérjeemészthetőségre gyakorolt hatását. Ezt a hatást egy *in vitro* emésztésszimulációs kísérlet során, egy hústermékeket modellező teszt mátrix (sült marhahús) fehérjeemészthetőségének vizsgálatával szeretném elemezni. Az almatörköly mellett szeretném vizsgálni annak bioaktív anyagokban gazdag kivonatainak hatását is, ezért két különböző kivonat (vizes és aceton-vizes) hozzáadásának hatását is szeretném tesztelni. Az emésztésszimulációt követően a mintákat Sousa et al., 2023 módszere alapján fogom előkészíteni.

Ezenkívül léteznek más módszerek is, mivel a fehérjeemésztés vizsgálata továbbra is rendkívül változatos lehet. Emellett az almatörkölyben és annak kivonataiban található bioaktív anyagok nemcsak a fehérjére, hanem más makrotápanyagokra is hatással lehetnek. Ezért különösen húsok és húskészítmények esetében érdemes lenne olyan mintaelőkészítési módszereket kidolgozni és alkalmazni, amelyekkel több tápanyag is izolálható az emésztett mintából, így lehetővé téve azok emészthetőségének egyidejű meghatározását egyetlen mintából. Emiatt

szakdolgozatom másik célja, hogy a fehérjeemészthetőség vizsgálatához egy ilyen alternatív módszer tesztelése volt, és az eredmények összevetése a Sousa et al, 2023 standard módszerrel előkészített minták eredményeivel. Ezzel az új módszerrel a vizsgált mátrixnak nem csak a fehérjeemészthetősége határozható meg, hanem a zsíremészthetősége vagy akár a zsírban oldódó vitaminok mennyisége is, így ez a módszer gyorsabb, az egyes komponensek emészthetőségének megvizsgálásához nem kell külön mintaelőkészítés.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 Az almatörköly felhasználása

Az almatörköly az alma feldolgozása során létrejövő melléktermék, mely héjdarabokat, magokat, valamint megmaradt gyümölcspépet tartalmaz. Emiatt számos olyan fontos komponens található meg benne, amely magas tápanyagtartalmú, és az emberi szervezetre előnyös hatást gyakorol. Ez indokolja, hogy felhasználhatóságának lehetőségével számos területen foglalkoznak. Ezen túlmenően az almatörköly azért is figyelmet érdemel, mivel különböző ipari folyamatok során jelentős mennyiségben keletkezik. A nem megfelelő kezelése igen komoly negatív hatással lehet a környezetre, mivel káros komponensek termelődhetnek, és emellett kellemetlen szagokat is áraszthat (Zhang *et al.*, 2021). Biogáz és bioüzemanyag termelése, állatételmezés és alkoholok előállítása a legelterjedtebb felhasználási módok.

Egyik jelentős felhasználása jelenleg ennek a mellékterméknek a fermentáció, ami a mai világban egyre nagyobb jelentőséggel bíró biotechnológiai terület. Fermentációs folyamatok során szubsztrátként alkalmazzák egyes helyeken az almatörkölyt, mivel fermentálható cukortartalommal rendelkezik. Végezhető olyan fermentáció is, amely magára a fermentációra összpontosít, és nem alkalmaz úgynevezett downstream folyamatokat. Készíthető olyan fermentáció is, amelynél szükségesek tisztítási és szeparációs folyamatok. Mindkét módszerhez anaerob baktériumokat használnak (Zhang *et al.*, 2021; Kauser *et al.*, 2023). Egy 2023-ban megjelent tanulmányban almatörkölyt használtak pektin és bioüzemanyag termelésére hígított kénsav és anaerob fermentáció alkalmazásával. A pektin egy stabilizáló és emulgeáló anyag, az almában azonban egy „ragasztó” szerepet tölt be, a cellulózt, hemicellulózt és a fehérjéket tartja össze (Vaez *et al.*, 2023).

Manapság a fogyasztók nagy figyelmet szentelnek a húsok minőségének, amit befolyásol az állat étrendje, így nagyon sok helyen a baromfikat almatörkölyvel etetik, mivel természetes eredetű és magas tápértékű adalékként szolgál.

Az állatételmezés mellett egyre nagyobb szerepe van az alternatív, élelmiszeripari melléktermékek visszaforgatásának az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerek estén is. Ezen filozófia mentén, készültek olyan kolbászok is, amelyek készítéséhez almatörkölyben található rostot használtak, így a termék rosttartalma magasabb lett. A sütőiparban is felhasználják akként, hogy kekszekbe, kenyerekbe és egyéb sütőipari termékekhez adják hozzá az almatörkölyből készült lisztet, amely folytán ezek rosttartalma nő, továbbá az érzékszervi tulajdonságaik is javulnak. Emellett a pektintartalma miatt zselés élelmiszerek előállítására is használható (Zhang *et al.*, 2021; Kauser *et al.*, 2023).

2.2 Az almatörköly összetétele, komponensei

Az almatörköly az alma feldolgozása során keletkező melléktermék, így olyan komponenseket tartalmaz, amelyek az almában is megtalálhatóak, de a mennyiségük nem feltétlen egyeznek az ép almában található mennyiséggel. A makrokomponensek mellett, számos bioaktív anyagot is tartalmaz: ásványi anyagok, vitaminok és polifenolok. Antioxidáns tulajdonsága is van köszönhetően a vitaminok és a polifenolok jelenlétének, amelyek a szabadgyökök semlegesítésére képesek, ezáltal az emberi szervezet egészségének fenntartására pozitív hatással lehetnek (Waldbauer, McKinnon and Kopp, 2017).

Az almatörköly az almában lévő magokat is tartalmazza, amelyek a gyümölcsben található zsírsavak főtömegét foglalják magukba, legfőképpen linolsavat és olajsavat. Az alma feldolgozása során fel nem használt részek gazdagok rostban – főleg pektinben –, így e részek keveréke, az almatörköly magasabb rosttartalmú lesz, mint az alma. Szénhidrátok közül glükóz és fruktóz, valamint poliszacharidok is találhatóak benne (Gazalli *et al.*, 2014; Skinner *et al.*, 2018; Vaez *et al.*, 2023).

Az almatörköly ásványi anyag tartalma kalciumból, magnéziumból, foszforból, cinkből és vasból áll, a vitaminok közül pedig E- és C-vitamin mutatható ki benne. E-vitaminok hozzájárulnak a korábban említett antioxidáns tulajdonsághoz is (Skinner *et al.*, 2018).

Az antioxidáns kapacitását vitaminok – a korábban említett E- és C-vitamin –, valamint a polifenol tartalma biztosítja. Az utóbbi vegyületek közül többet is kimutattak és legfőképpen az almahéjában izolálták őket. Ilyen polifenol vegyület például a kvercetin, katechin, kávéssav, ferulsav, p-kumársav, vagy épp a hidroxifahéjsav. Vizsgálatokkal kimutatták, hogy az egyes almafajok polifenol-tartalma különböző, ezért az almatörkölyben megtalálható polifenol vegyületek mennyisége függ attól, hogy milyen alma feldolgozásából keletkezett a melléktermék (Gazalli *et al.*, 2014; Skinner *et al.*, 2018).

A héj legkülső részében, a kutikulában – ami egy lipofil filmréteg viasszal – található urzolsav, valamint ennek egyik izomerje, az oleanolsav. Ezek a vegyületek pentaciklusos triterpenoidok, amelyek gyulladáscsökkentő és antioxidáns tulajdonsággal bírnak (López-Hortas *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2018; Skinner *et al.*, 2018).

2.3 Emészthetőség vizsgálata

Emésztés során az étel az emésztőrendszeren keresztül haladva kémiai és fizikai változásokon megy keresztül, köszönhetően az emésztőrendszerben lévő eltérő viszonyoknak. Az élelmiszerek hatása a szervezetre függ a mikrokomponensek, mint az ásványi anyagok és

vitaminok, valamint a makrokomponensek (fehérje, lipidek, szénhidrátok) típusától, illetve ezek mennyiségétől.

Az emészthetőség vizsgálata során a különböző tápanyagok emésztésének, felszívódásának hatékonyságát vizsgáljuk, annak érdekében, hogy az egyes részfolyamatokat megértsük vagy módosítsuk, illetve, hogy felszívódásukat javítsuk. A makrokomponensek az emésztőrendszer egyes részein áthaladva, az emésztés folyamata során különböző termékekké alakulnak, mint például az aminosavak, zsírsavak, monoszacharidok és még számos egyéb vegyület.

Az emésztés folyamatának nyomon követéséhez használhatóak, *in vivo*, azaz élőszervezetben végzett vizsgálatok, vagy *in vitro*, vagyis élőszervezeten kívül történő vizsgálatok. A legmegbízhatóbb vizsgálati eredményeket természetesen az embereken végzett kísérletek adják, azonban ezek a legkörülményesebbek. A legrealisabb képet az emészthetőségről – az emberi szervezet után – az állatok segítségével végzett, *in vivo* vizsgálatok adják, amelyek során az állattal megetetik a vizsgálni kívánt élelmiszert, majd az ürülék vagy bél vizsgálatával állapítják meg az emészthetőséget (Tavano, Neves and Da Silva Júnior, 2016; Zewdie, 2019). Egy tanulmány a sertés fehérjeemésztését vettette össze az emberi fehérjeemésztéssel. A kapott adatok a két szervezet esetében jól korrelálnak, így az emberi fehérjeemészthetőség mértékének predikciója a sertéseken végzett kísérletek segítségével megvalósítható (Hodgkinson *et al.*, 2022). E vizsgálati módszerek ugyanakkor jelentős költségekkel járnak, az állati kísérletek etikai aggályokat is felvetnek, valamint engedélyek is szükségesek hozzájuk. Az *in vitro* módszerekhez laboratóriumi körülmények között biztosítjuk a szükséges környezetet, vagyis megpróbáljuk megteremteni azokat a körülményeket, amelyek a szervezetben vannak, ezáltal az emésztés szimulációját végezzük el (Zhou, Tan and McClements, 2023). Ebből kifolyólag előtérbe kerültek az *in vitro* vizsgálati módszerek, mint például az Infogest módszer.

Az Infogest módszer az úgynevezett COST (European Cooperation in Science and Technology, Európai Tudományos és Technológiai Együttműködés) keretein belül jött létre. Ez egy Európai Unió által finanszírozott program, amely lehetőséget ad a kutatóknak, hogy kutatási hálózatokat hozzanak létre. Maga a módszer létrehozásának célja az volt, hogy összeegyeztesse az *in vitro* protokollokat, amelyek az emberi emésztés szimulálására alkalmasak. Arra is törekedtek, hogy egy olyan módszert fejlesszenek ki, ami könnyen használható a kutatócsoportoknak, és ami segítségével a kísérleti eredmények összehasonlíthatóak (Egger *et al.*, 2016).

2.3.1 Infogest módszer

Az Infogest módszer *in vitro* emésztési modell, amelyet 2014-ben fejlesztettek ki (Minekus *et al.*, 2014; Brodkorb *et al.*, 2019). Ez a módszer világszerte elterjedt és rendkívül gyakran

használt. A módszer képes biztosítani az emberi szájban, gyomorban és vékonybélben uralkodó viszonyokat. E módszer arra alkalmas, hogy az emésztés során felszabadult – emberi szervezet számára hozzáférhető, azaz transzport folyamatokkal elérhetővé tehető – molekulák mennyiségét/koncentrációját meghatározzuk az emésztés után. Kifejlesztése alatt figyelembe vették az emésztőrendszer egyes állomásainál uralkodó hőmérsékletet, pH értékeket, a jelenlévő enzimek mennyiségét és aktivitását, valamint az egyes állomások közötti áthaladáshoz szükséges időt. A módszerhez használt nyál, gyomor- és vékonybélnedv egységes, tehát előre meghatározott összetételt használnak. A szimuláció előtt a használt enzim készítmények aktivitási szintjeit mennyiségileg meg kell határozni. Az Infogest módszer használható az emésztés után meghatározott tápanyagok (például peptidek, aminosavak, zsírsavak és egyszerű cukrok) végső koncentrációjának meghatározására. Ezért alkalmas a különböző élelmiszerek és italok gyomor-bélrendszeri sorsának összehasonlítására (Zhou, Tan and McClements, 2023). Egy 2018-ban készült tanulmányban különböző állatok tejeinek biológiai aktivitását, a proteinek megemésztése során keletkező termékeket és az egyes emésztési állomásokon található enzimek gátlásának mértékét vizsgálták Infogest és tömegspektrometria kombinációjával (Tagliazucchi *et al.*, 2018). Egy másik tanulmány keretein belül a disznó-, marha-, csirke-, és pulykahús fogyasztásának a peptidek biológiai aktivitására való lehetséges hatékonyságát vizsgálták meg (Martini, Conte and Tagliazucchi, 2019). A tojás fehérjének emésztését is vizsgálták, amely során a fehérjék degradációját SDS-PAGE (gélelektroforézis technika nátrium-dodecil-szulfát alkalmazásával) segítségével követték nyomon (Santos-Hernández *et al.*, 2020).

2.3.2 Fehérjék emészthetősége

A fehérjéket peptid kötésekkel összekötött aminosavak alkotják, amelyek fontos építőkövei az emberi szervezetben létfontosságú szerveknek, hormonoknak és a szervezetben található testnedveknek. A szervezet fő nitrogénforrása, amely a fehérjeláncok hasítása során keletkezik. A proteázok proteolitikus, azaz fehérjebontó funkcióval rendelkező enzimek, amelyek egyaránt előfordulnak növényekben, állatokban és mikrobákban (Zhang, He and Simpson, 2018). A proteázok a polipeptid láncokat felépítő aminosavak közötti peptid kötésekkel képesek bontani, emiatt alkalmasak a fehérjék hidrolíziséhez. Egyes aminosavakat a szervezet nem képes előállítani, így ezeket külső forrásból kell bevinni a szervezetbe. Így az élelmiszerek fehérjetartalma és a fehérjék emészthetősége fontos kérdés a fogyasztók számára. A fehérjék emészthetősége azt jelenti, hogy a szervezet milyen mértékben képes lebontani és felszívni a fehérjéket az emésztési folyamat során. Ez az arány azt mutatja meg, hogy a táplálékban

található fehérjék mekkora részét tudja a test hasznosítani, azaz aminosavakra bontani és beépíteni a sejtekbe, szövetekbe. A fehérjék minőségének kiértékelésére ma már számos módszer létezik.

A köztudatba 1989-ben hozták be a PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score, fehérje emészthetőséggel korrigált aminosav érték), fehérje minőségére szolgáló értéket. A PDCAAS egy olyan mutató, ami patkányokon meghatározott teljes traktusbeli emészthetőségén alapuló emészthetőségi értéket használ, majd ezt megszorozza a termék első limitáló aminosav koncentrációjával (Abelilla, Liu and Stein, 2018; Craddock *et al.*, 2021).

PDCAAS értéket meghatározó képlet:

$$\text{PDCAAS (\%)} = \frac{\text{mg első limitáló aminosav 1 g vizsgált fehérjében}}{\text{mg ugyanabból az aminosavból 1g referenciafehérjében}} \cdot \text{TD} \quad (1)$$

ahol TD a vizsgált fehérje valódi emészthetősége, amit patkányokon végzett vizsgálatokkal határoztak meg úgy, hogy a fehérje nitrogén bevitel és a széklet nitrogén kibocsátás közötti különbséget határozzák meg.

A 100%-ot meghaladó PDCAAS értékkel rendelkező fehérjék értékét 100%-nak veszik. Ez a fehérjeminőségi mutató a teljes emésztés után méri a fehérjeemészthetőséget, így nem tesz különbséget a vékonybélben emésztett fehérje és a vastagbélben történő erjedés között (Schaafsma, 2005).

A 2013-ban megjelent DIAAS (Digestive Indispensable Amino Acid Score, emészthető nélkülözhetetlen aminosav érték) is a fehérje minőségére utal, azonban az ileális – vékonybél végén – fehérjeemészthetőséget veszi figyelembe, mivel a felszívódás a vékonybélben történik (Craddock *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2023).

DIAAS értéket meghatározó képlet:

$$\begin{aligned} \text{DIAAS (\%)} = \\ = \frac{\text{mg első limitáló nélkülözhetetlen aminosav 1 g vizsgált fehérjében}}{\text{mg ugyanabból az aminosavból 1g referenciafehérjében}} \cdot 100 \end{aligned} \quad (2)$$

A DIAAS értékei meghaladhatják a 100%-ot, valamint az FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Az Egyesült Nemzetek Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete) ennek az értéknek a használatát ajánlja, mivel ez pontosabb mérési módszert biztosít (Moughan and Lim, 2024).

A fehérjék többsége érintetlen marad, amíg el nem jutnak a gyomorig, azonban a fehérjék emésztése már a szájban is elkezdődik hidratációval és az élelmiszer komponensek oldhatóvá

tételével. A gyomorba kerülve az ott lévő sósav denaturálja a fehérjéket, így a protolitikus enzimek – amelyek a peptid kötések felbontásához szükségesek – könnyebben hozzáférhetnek a kötésekhez. Emellett a sósav a gyomor által kiválasztott pepszinogént aktív proteázzá, pepszinné alakítja, amely a fehérjéket kisebb peptid fragmensekre bontja. Ezen fragmenseket tovább bontják kisebb hosszúságúra további, az emberi emésztőrendszerben található enzimek, mint például a tripszin, kimotripszin, karboxipeptidáz, vagy a kollagenáz. Az emésztés végső szakasza a vékonybélben történik, ahol az amino- és tripeptidázok lebontják a megmaradt rövid peptidláncokat egyes aminosavakká, dipeptidekké és tripeptidekké, melyek a bélnyálkahártya sejtjein keresztül felszívódhatnak. A maradék anyagok, amelyek nem abszorbeálódnak a vékonybélben, tovább haladnak a vastagbélbe, ahol mikrobiális környezetben további átalakulásokon mennek keresztül, majd a nem szükséges anyagok kiürülnek a szervezetből (Boye, Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2012).

A fehérjék emészthetőségének vizsgálata történhet pH-stat módszerrel, amely segítségével a fehérjék enzimatisz hidrolízise, vagyis az aminosavak felszabadulása követhető nyomon. A vizsgálat során a szükséges pH-t beállítjuk a megfelelő vegyületek használatával, majd a vizsgálni kívánt mintát hozzáadjuk. A pH-t folyamatosan mérni kell, és amint változást észlelünk, vissza kell állítani az eredeti értékre, vagyis a pH értékének a vizsgálat teljes folyamata alatt konstansnak kell lennie. Ezt egy általunk előre meghatározott vegyülettel tehetjük meg, amelyet megfelelő mértékben adagolunk, hogy a pH végig az adott értéken legyen. A hozzáadott mennyiséget és a hozzáadás időpontját is feljegyezzük, mivel ezen paraméterek segítségével tudjuk meghatározni a hidrolízis mértékét (Mat *et al.*, 2016). Ezt a paramétert a fent említett SDS-PAGE technikával is meg tudjuk mérni, mivel a hidrolízis során különböző méretű, molekulatömegű peptidek keletkeznek, amelyek ezek alapján szétválaszthatóak (Zhou, Tan and McClements, 2023).

Spektrofotometriás mérések is szolgálhatnak a fehérjék emészthetőségének meghatározására, amelyek során a jelenlévő peptid-kötések és az oldható fehérjék mennyiségét tudjuk mérni. Ezen elven alapul a Bradford-módszer, vagy bicinkonin használata során lejátszódó folyamat.

2.4 Mintaelőkészítési módszerek

A mintaelőkészítés alapvető fontosságú, mivel biztosítja a mérések pontosságát és megbízhatóságát, emellett segít eltávolítani a zavaró anyagokat, javítja az analitikai módszerek érzékenységét, és elősegíti a kísérletek reprodukálhatóságát. Biztosítja, hogy a minta megfeleljen a vizsgálati módszerek specifikus követelményeinek, így pontosabb és értelmezhetőbb eredményeket kaphatunk. A fehérjék vizsgálatához a forrásától függően a

fehérjét ki kell nyerni, amely lehetséges a fehérjék kicsapásával, amely során a fehérjék oldhatóságának csökkentése történik egy reagens hozzáadásával (Novák and Havlíček, 2016). A kicsapás történhet triklór-ecetsav (TCA), kloroform/metanol vagy ammónium-szulfát ((NH₄)₂SO₄) hozzáadásával.

A TCA segítségével történő csapadékképzés során általában 10-20%-os vizes TCA oldat hatására a mintában lévő fehérjék és oldhatatlan anyagok csapadékot képeznek. A csapadékból ki kell vonni a TCA maradékokat, illetve egyéb szennyeződések, amelyet jéghideg acetonnal történő átmosással lehet kivitelezni (Novák and Havlíček, 2016).

A kloroformot és metanolt általában hidrofób fehérjék kicsapásához használják (Vertommen *et al.*, 2010). A mintához adva a kloroform és metanol fázisokat hoz létre, amelyek különböző anyagokat tartalmaz. A felső vizes-metanolos fázis tartalmazza vízben oldódó anyagokat, míg az alsó, kloroformos rétegben hidrofób molekulák találhatók. Ezen két fázis között helyezkedik el a fehérje kicsapódása által keletkezett csapadék (Vertommen *et al.*, 2010; Novák and Havlíček, 2016).

Ammónium-szulfáttal ((NH₄)₂SO₄) történő kicsapás során a fehérjék nem denaturálódnak, hanem az oldhatóság csökkenése miatt kicsapódnak (Bollineni *et al.*, 2015). Az ammónium-szulfát magas oldhatósággal rendelkezik, amely lehetővé teszi a nagyon nagy ionerősségű oldatok készítését, emellett az ára is alacsony, így széleskörben alkalmazzák fehérjék kicsapására (Duong-Ly and Gabelli, 2014).

2023-ban az Infogest *in vitro* módszert kiegészítették egy analitikai folyamattal, amely lehetővé teszi a fehérje minőségének és a korábban említett DIAAS érték meghatározását. A tanulmány alapjául szolgáló kutatás egyik célja tehát az volt, hogy egy olyan *in vitro* Infogest módszeren alapuló vizsgálati módszert hozzon létre, ami segítségével az előre jelzett, valós ileális (a vékonybél harmadik szakaszában történő) emészthetőség meghatározása lehetséges aminosav szinten, valamint amely során a DIAAS érték is kiszámolható. A kutatás másik célja az volt, hogy összehasonlítsák az *in vitro* módszerrel végzett mérések eredményét az *in vivo* módszerrel kapott eredményekkel, hét fehérjeforrás tanulmányozásán keresztül. A kísérlet során három izolált fehérjét és négy élelmiszert vizsgáltak. A kísérlet első szakaszában emésztés történt az Infogest protokoll szerint. Az emésztést követően metanolos kicsapást alkalmaztak, majd centrifugálták a mintákat. Ezek után a felülúszókat és a pelleteket szétválasztották, majd három különböző módszert alkalmaztak: Kjeldahl, OPA és HPLC (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia). Az emészthetőség meghatározására mindhárom módszer esetén ugyanazt a formulát használták. Az eredmények azt mutatták, hogy az *in vitro* mérések korreláltak az *in vivo* értékeivel (Sousa *et al.*, 2023).

2.5 Az almatörköly hatása a fehérjeemészthetőségére

A polifenolos vegyületek – melyek az almatörkölyben is megtalálhatók – hatással lehetnek a fehérjék emészthetőségére, mivel képesek kapcsolódni az endogén fehérjékhez, mint a proteázok vagy a nyálban, gyomorban és bélben található fehérjékhez. Ennek a kapcsolódásnak a következménye, hogy a proteázok aktivitása, a szubsztrátumoknak a hozzáférhetősége változik meg. Ez az interakció azonban nem mindig eredményez negatív hatást, az enzim szerkezete lazulhat, de akár stabilizálódhat is a kapcsolódás hatására. A nagyobb szerkezettel rendelkező anyagok, mint a tannin vagy a polifenolok glikozidjai legtöbb esetben lazítják az enzimek struktúráját a kötődés során (Cirkovic Velickovic and Stanic-Vucinic, 2018).

Számos tanulmány az egyes emésztő enzimekre gyakorolt hatást vizsgálta meg. A pepszin aktivitását vizsgáló irodalomban az eredmények nem egyhangúak, mivel egyes eredmények azt mutatták, hogy a polifenolos vegyületek inaktiválták a pepszint, de aktiváló hatást is kimutattak. Ezen mérések azonban különböző körülmények, szubsztrátok és értékelési módszerek segítségével történtek (Tagliazucchi, Verzelloni and Conte, 2005). Ezzel szemben a tripszin aktivitására gyakorolt hatás már egyértelműbb, mint a pepszin esetében. A tanulmányok arról számoltak be, hogy a teában található katechinek gátolják a tripszin aktivitását, de nem maximálisan, vagyis csak csökkenti az enzim aktivitását és nem szünteti meg teljesen (Huang and Zhao, 2008). Azt is megfigyelték, hogy a tannin monomerjei, mint az előbb említett katechin vagy a galluszsav sokkal kevésbé aktívak a gátlásban, mint a nagyobb molekulatömegű tannin savak.

Némely tanulmány a polifenolos vegyületek az *in vitro* fehérjeemészthetőségre gyakorolt hatását tanulmányozta. Az eredmények alapján megállapították, hogy ezen vegyületek csökkentik az az *in vitro* fehérjeemészthetőség értékét, amit a polifenolos vegyületek és a fehérjék között létrejövő kovalens vagy nem kovalens interakcióval magyarázták (De Toledo *et al.*, 2013). Azonban ezen tanulmányok is eltérő körülmények között készültek, így nehéz őket összehasonlítani. Egy vizsgálat során azt figyelték meg, hogy a sajthoz, tejhez és joghurthoz adott zöld tea kivonat szignifikánsan csökkentette a proteolízist a gyomorban, de az emésztés bél fázisában nem mutatott ki hatást (Lamothe *et al.*, 2014).

A polifenolok hatását vizsgálták továbbá többféle ásványi anyag jelenlétében is. A vizsgálatokhoz tanninsavval, Ca^{2+} , Mg^{2+} és Mn^{2+} kationokkal kezelték a marha szérum albumint (Bovine serum albumin, BSA), majd ennek a fehérjének az emészthetőségét mérték meg. A mintákat minden esetben kezelték tannin savval, majd két különböző koncentrációban adták hozzájuk a kationokat. Az összes minta fehérjeemészthetősége csökkent a tannin sav jelenléte miatt. A Ca^{2+} és Mg^{2+} hozzáadásával ez az érték jelentős mértékkel csökkent, de a

legalacsonyabb emészthetőségi érték a Mg^{2+} -ionok jelenlétében volt mérhető. Ha ezen kationok kicsapási hajlandóságát vizsgáljuk meg, ugyanezt a sorrendet kapjuk, vagyis a három kation közül a Mg^{2+} a leghajlamosabb rá, majd ezt követi a Ca^{2+} és végül a Mn^{2+} (Kaspchak *et al.*, 2019).

Egy tavaly készült tanulmányban azt vizsgálták, hogy az aszkorbinsav (C-vitamin) befolyásolja-e az emészthetőségét különböző tápanyagoknak, többek között a fehérjének is. Az emésztést az Infogest *in vitro* emésztési módszerrel végezték el. Tejpor, tojásfehérje és tejsavófehérje izolátumokat használtak mintának, amelynek az emésztése aszkorbinsav nélkül és aszkorbinsav jelenlétében történt, majd ezután Bradford módszer segítségével mérték meg az emésztett minták fehérje tartalmát, amit az *in vitro* fehérje emészthetőség meghatározása (IVPD) követett. A kapott eredmények alapján azon mintákra, amelyhez 1 g aszkorbinsavat adtak fehérje – és a zsír – emészthetősége nőtt, azonban 2 g aszkorbinsav hozzáadása esetén ez a hatása ellentétes volt, vagyis csökkent az emészthetőség értéke. Az aszkorbinsav a fehérjén belüli hidrogén kötések gyengíti, így a proteolitikus enzimek több helyen képesek támadni a fehérjét (Alsedfy *et al.*, 2023). Emellett egy másik vizsgálat azt mutatta ki, hogy az aszkorbinsav az emberi hasnyálmirigyben található α -amilázokkal szemben gátló hatással is rendelkezhet (Borah, Sarkar and Duary, 2019).

Az élelmi rostok fehérje emészthetőségre gyakorolt hatásával több tanulmány is foglalkozott. Az egyikben a repcemag fehérje- és rostösszetevői között esetlegesen létrejövő kölcsönhatásokat vizsgálták. Élelmi rost frakciókat készítettek repcemag héjból és tisztított repceembrió rostokból, majd ezen frakciónak a repcefehérje koncentrátum emészthetőségére való hatását vizsgálták. Az élelmi rost hozzáadása általánosságban csökkentette a repcefehérje koncentrátum emészthetőségét, de eltérő mértékben. A repcemag héjból készült rost esetében a fehérjeemészthetőség csökkent mindhárom koncentráció – alacsony, közepes, magas – hozzáadásával, de az alacsony és közepes koncentrációjú rostokkal emésztett minták szignifikánsan nem különböztek egymástól. Azonban a magas koncentrációjú minta emészthetőségi eredménye szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott, mint az alacsony és közepes minták eredményei. A repceembrióból készült rost alacsony és közepes koncentráció hozzáadása során a fehérjeemészthetősége szignifikánsan különbözött egymástól, míg a magas koncentrációt tartalmazó minták értékei szignifikánsan nem különböznek a másik két koncentrációnál kapott értékektől. Ebben az esetben a kontrollnál mért emésztési értékekhez viszonyítva szignifikánsan nem csökkent, míg a repcemaghéjból készült rost esetében szignifikánsan csökkentette a fehérje emészthetőségét (Joehnke *et al.*, 2018).

3. Anyagok és módszerek

3.1 Használt anyagok

3.1.1 Minták

- sült marhahús:
 - 20% zsírtartalommal rendelkező, Húsfarm friss marha darálthús (Lidl), amelyekből pogácsa formában volt megsütve 20 percig 200 °C-on, majd Moulinex HV4 típusú húsdaráló berendezés segítségével háromszor volt ledarálva és felhasználásig -80 °C-on volt tárolva.
- almatörköly (ESZAT Kft., cím: 4700 Mátészalka, Jármű út, 57.):
 - 2022 őszének elején szüretelt Idared almafajta, amelyet normális ipari körülmények között préseltek és nem alkalmaztak enzimes kezelést.
- almatörköly kivonatok:
 - Az acetonos almatörköly kivonathoz 2 g almatörköly port adagoltam 20 ml 70% aceton tartalmú és 30% víz tartalmú elegybe. Ezt körülbelül 2 percig homogenizáltam IKA T45 ultra turrax segítségével, majd centrifugáltam 4 °C-on, 6000 rpm-n 20 percig. A felülúszót leszedtem és vákuum centrifugába tettem, ezután felöntöttem 10 ml-re.
 - A vizes almatörköly kivonat elkészítéséhez 1 g almatörköly porhoz 20 ml vizet adtam és 1 percig homogenizáltam IKA T45 ultra turrax segítségével.
- darált fehérjementes keksz:
 - 1 kg keksz tartalmaz 415 g tisztított kukoricalisztet, 286 g margarint, 232 g szukrózt, 50 g cellulózt, 7 g sütőport, 5g celite és 5g őrölt gyömbér (Moughan *et al.*, 2005)

3.1.2 Emésztés

- emberi nyálból kivont amiláz (Sigma-Aldrich, A1031)
- nyúl gyomrában lévő lipáz vagy RGE (Lipolytech, RGE15)
- sertésből kivont pankreatin (Sigma-Aldrich, P7545-25G)
- sertésből kivont epe (Sigma-Aldrich, B8631)
- szervesetlen száj szimuláns oldat (1. táblázat)
- szervesetlen gyomor szimuláns (1. táblázat)
- szervesetlen vékonybél szimuláns (1. táblázat)
- 37%-os sósav vagy HCl (Thomasker Finomvegyszer, UN1789)

- kalcium-klorid vagy $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (Sigma-Aldrich, SLBW0813)
- nátrium-hidroxid vagy NaOH (Reanal Kft, mikrogyöngyök)
- az emésztés egyes fázisaihoz használt enzim oldatok az alábbiak szerint lettek elkészítve.
 - Az α -amiláz enzim porból 720 mg-ot kimértem és hozzáadtam 4,8 ml száj emésztési szimulánst (1. táblázat).
 - Az RGE enzim porból 760 mg-ot oldottam fel 15,2 ml szervesetlen gyomor szimuláns oldatban (1. táblázat).
 - Az epét tartalmazó oldatot később készítettem el, mivel azt szükséges inkubálni 2 óráig 37 °C-on.
 - A pankreatin szuszpenzió készítéséhez 2120,5 mg port átnedvesítettem a 44 ml szervesetlen vékonybél szimulánssal (1. táblázat), vortexeljük (10 másodperc) és 5 percig ultrahangos kádba tettem. Ezután 5 percig 4 °C-on és 6000 fordulatszámmal centrifugáltam. Az így keletkezett csapadékról leöntöttem a felülúszót és a későbbiekben ezt használtam.

1. táblázat: Az Infogest in vitro emésztésszimuláció során felhasznált szimuláns oldatok összetétel (Forrás: *Brodkorb et al., 2019*)

Összetevők	Törzsoldat koncentráció (mol/l)	Szervesetlen nyál szimuláns (pH = 7,0)	Szervesetlen gyomornedv szimuláns (pH = 3,0)	Szervesetlen vékonybél-nedv szimuláns (pH = 7,0)
		0,5 literhez szükséges térfogat (ml)	0,5 literhez szükséges térfogat (ml)	1 literhez szükséges térfogat (ml)
KCl	0,5	15,09	6,9	13,6
KH_2PO_4	0,5	3,7	0,9	1,6
NaHCO_3	1	6,84	12,5	85
NaCl	2	0	11,8	19,2
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	0,15	0,5	0,4	2,2
$\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$	0,5	0,06	0,5	–
$\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$	0,3	0	–	–
HCl	6	0,092	1,3	1,4
NaOH	1	–	–	–
Desztillált víz	–	373,72	365,7	677

3.1.3 Mintaelőkészítés

- metanol vagy CH_3OH (VWR Chemicals, 18F224014)
- DDP vagy dithiodipropánsav (Sigma-Aldrich, MKCH8880)
 - 0,12 g DDP-t mértem ki egy 15 ml-es centrifuga csőbe és feloldottam 5 ml desztillált vízben. Ehhez 2,4 ml 1 M-os NaOH oldatot, majd 4,6 ml desztillált vizet adtam és hűtőszekrényben tároltam.
- 0,2 M HCl vagy sósav:
 - Az oldat elkészítéséhez 0,4 ml-t mértem ki a 6 M-os HCl-ből és 11,6 ml desztillált vizet adtam hozzá, majd a hűtőszekrénybe raktam felhasználásig.
- kloroform vagy CHCl_3 (Carlo Erba Reagents, V3L655013N)
- C19 TAG vagy nonadekánsav triglicerid (Sigma-Aldrich, analytical standard)

3.1.4 Fehérjetartalom mérése OPA módszerrel

- nátrium-tetraborát vagy bórax (Reanal Rt., 85012108)
- nátrium-dodecil-szulfát vagy SDS (Reanal Rt., 94061668)
- 1,4- ditiotreitól vagy DTT (Carl Roth, 222-468-7)
- o-ftálaldehid vagy OPA (Alfa Aesar, 10224302)
- L-szerin (Sigma-Aldrich, 56-45-1)
- 5%-os Triklórecetsav vagy TCA (Sigma, SLBH172V)
- etanol (Reanal Labor, vízmentes)
- OPA reagens:
 - 50 ml OPA reagenst készítettem, amihez 1,905 g bóraxot és 25 ml vizet egy főzőpohárba tettem és körülbelül 25 perc alatt feloldottam 55 °C-os ultrahangos vízfürdőben. Az így kapott meleg, opálos oldathoz 50 mg SDS-t és 44 mg DTT-t adtam és további 5 percig ultrahangos kádban homogenizáltam. Eközben 40 mg OPA-t feloldottam 1 ml etanolban és hozzáadtam az oldathoz. Az így készített oldatot átmostam 50 ml-es mérőlombikba és jelre töltöttem desztillált vízzel. Az elkészített OPA-reagenst a felhasználásig alufóliába csomagolva a hűtőbe tettem.

3.1.5 Proantocianidin tartalom meghatározása

- Q tannin por (95%-os kondenzált tannin, SilvaTeam Welltan)
- Dimetil-szulfoxid vagy DMSO (Fluka, 448903/1)
- BuOH vagy C₄H₉OH (Reanal, 99071331):
 - Az oldathoz 47,5 ml butánt keverünk össze 2,5 ml 37%-os sósavval.
- Ammónium-vas(III)-szulfát vagy NH₄Fe(SO₄)₂ x 12 H₂O₂ (Reanal, 85113943)
 - Kimérünk 0,2 g sót és 3,33 ml 6 M sósavat és 6,66 ml desztillált vizet adunk hozzá, ezután addig keverjük míg a só fel nem oldódik fel.

3.2 Módszerek

3.2.1 Emésztés

Az emésztéshez az Infogest protokollt alkalmaztam, amelyhez kontroll mintaként sült marhahúst használtam. Az almatörköly hatását háromféle módon (liofilizált por, vizes kivonat és acetón-vizes kivonat), együttemésztési kísérletekben vizsgáltam. Az emésztésszimulációt minden összetétel esetén három párhuzamosban végeztem el. A vak mintába desztillált vizet és fehérjementes, ledarált kekszet raktam. A csövek tömegét lemértem a későbbi számolásokhoz. Az emésztéshez szükséges minták összeállítás a 2. táblázatban látható. A kivonatokhoz készítünk vak mintákat is, amely a metanolos mintaelőkészítés esetében 4 ml desztillált vizet és 1 g fehérjementes kekszet tartalmaz, az integrált mintaelőkészítés során a vak mintához 5 ml desztillált vizet használtam.

2. táblázat: Az emésztett minták összetevői (Forrás: saját munka)

Minták	sült marhahús (g)	almatörköly por/kivonat (mg/ml)	desztillált víz (ml)
Almatörköly por kontroll	0,9	—	4,1
Almatörköly por	0,9	150	3,95
Acetónos kivonat	0,9	0,75	3,35
Vizes kivonat	0,9	3	1,1

Az emésztés első szakasza a szájban lejátszódó folyamatokat modellezi. Ebben a szakaszban, az első enzimes lépéshez, a mintához hozzáadtam 3,5 ml szervesetlen nyál szimuláns oldatot, 25 µl CaCl₂(H₂O)₂-t, 0,5 ml α-amiláz-oldatot és 0,975 ml desztillált vizet, majd 2 percig, 37 °C-on inkubáltam. Ezután következik a gyomorban történő emésztés, amihez 10 ml emésztményhez adtam 6,4 ml szervesetlen gyomor szimuláns, 5 µl CaCl₂(H₂O)₂-t, 130 µl HCl-

t, az 1,6 ml RGE-t tartalmazó enzim oldatot és 1,865 ml desztillált vizet, majd ezt 2 óráig, 37 °C-on inkubáljuk. Az inkubációs idő letelte után a 20 ml emésztményhez 8,5 ml szervesetlen vékonybél szimuláns oldatot, 40 µl $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -t, 2,5 ml epét tartalmazó oldatot, 5 ml pankreatint tartalmazó oldatot, 130 µl NaOH-t és 3,830 µl desztillált vizet adtam, majd 2 óráig 37 °C-on inkubáltam.

Az emésztésszimuláció után az emésztményekből vett mintákat (2 ml) kétféleképpen készítettem elő az analitikai mérések végrehajtása előtt. Az egyik a metanolos mintaelőkészítés, ami a jelenleg elfogadott előkészítési módszer, a másik a tanszéken kidolgozott alternatíva, az integrált mintaelőkészítési módszer.

3.2.2 Metanolos mintaelőkészítés

Ez a mintaelőkészítés a Sousa et al., 2023 protokoll alapján történt. A módszer szerint a fehérjéket metanollal csapjuk ki, úgy, hogy a metanol koncentrációja 80% legyen, ezáltal az emészthető fehérje rész egy lépésben izolálható oldhatóság alapján. Ehhez 2 ml mintához 8 ml metanolt adtam, majd vortexelés után 1 óráig inkubáltam -20 °C-on. Ezt követően a mintákat centrifugáltam 20 percig, 4 °C-on és 5500 rpm-n és leöntöttem a felülúszót. A további mérések során a felülúszó fehérjetartalmának meghatározásán keresztül információt kaptam a fehérjeemészthetőségről.

3.2.3 Integrált mintaelőkészítés

Az alternatívaként használt – integrált – mintaelőkészítési módszer lényege, hogy a vizsgált emésztmény mátrixból, nem csak az emészthető fehérje-tartalmat izoláljuk, hanem előtte a minta zsírtartalmát is elkülönítjük. Így az első lépésben a fehérje analitika szempontjából fontos mintaelőkészítési lépést (zsírtalanítás) hajtjuk végre, majd második lépésben az emészthető fehérjetartalom izolációja is megtörténik.

A végrehajtásához 2 ml emésztményhez hozzáadtam 250 µl belső standardet – 1 mg/ml koncentrációjú C19:0TAG kloroformban oldva –, 2,25 ml kloroformot és 5 ml metanolt és 2 percig vortexeltem. Ezután ismét 2,5 ml kloroformot adtam hozzá és fél perc vortexelés után 2,5 ml desztillált vizet, majd ismét fél percig kevertetés után és centrifugáltam a mintákat 20 percig 6000 rpm-n. Ekkor ez két fázisú rendszert kaptam, ahol a felső fázisban találhatóak meg a fehérjék, míg az alsó, kloroformot tartalmazó fázis zsírt tartalmaz, így alkalmas a zsíremészthetőség vizsgálatára. A keletkezett fázisok közül a felsőből 5 ml-t kimértem és hozzáadtam 7,5 ml metanolt. Ezeket a mintákat vortexeltem és a fagyasztóba tettem 1 órára, majd centrifugáltam 20 percig, 4 °C-on és 5500 rpm-n.

3.2.4 Savas hidrolízis

Az integrált mintaelőkészítéssel előállított minták felülúszójából 500 µl, a metanolos mintaelőkészítéssel előállított felülúszójából 220 µl pipettáztam üveg kromatográfiás mintatartóba és bepároltam vákuumbepárlóval, így az oldószert elpárologtattam. A hidrolízishez desztillált vizet, DDP-oldatot, 0,2 M HCl-oldatot és 37%-os HCl-t használtam az AOAC.2018.06. szabványos módszere szerint. A bepárolt mintákhoz 260 µl desztillált vizet, 120 µl DDP oldatot, 120 µl 0,2 M HCl-oldatot és 500 µl 37%-os HCl-at adtam, majd a mintákat vortexeltem, majd 110°C-os szárítószekrénybe tettem 15 órára.

3.2.5 Fehérjetartalom meghatározása OPA-módszerrel

A fehérjetartalom meghatározása Nielsen és mtsai. által leírt OPA-módszerrel történt (Nielsen, Petersen and Damdbmann, 2001). A mérési módszer alapja, hogy a fehérje amino-csoportjai és az OPA a DTT jelenlétében egy UV aktív vegyületet képeznek, amely 340 nm-en detektálható. Kalibrációs oldatot készítettem L-szerint felhasználva. Először egy 5000 mg/l koncentrációjú törzsoldatot készítettem, amihez 25 mg L-szerint feloldottam 5 ml desztillált vízbe. Ezt az oldatot felhasználva csináltam egy másodlagos törzsoldatot, 1000 mg/l koncentrációval, amihez az előző oldatból 400 µl-t pipettáztam 1600 µl desztillált vízhez. A kalibrációhoz a táblázat (3. táblázat) alapján oldatokat készítettem majd ezen oldatok 25 µl-éhez 725 µl OPA-reagenst adtam és 10 perc reakció idő után 340 nm-en megmértem a minták abszorbanciáját.

3. táblázat: Az OPA méréshez szükséges kalibráló oldatsor összeállításának leírása (Forrás: Nielsen, Petersen and Damdbmann, 2001)

Koncentráció (mg/L)	1000 mg/L törzsoldat (µl)	5% TCA (µl)
0	0	1000
25	25	975
50	50	950
75	75	925
100	100	900
125	125	875
180	180	820
250	250	750

Az emésztményekből készített, hidrolizált mintákat 1:5 arányban hígítottam, vagyis 50 µl mintához 250 µl 5%-os TCA-t adtam, majd ebből az oldatból 25 µl-t pipettáztam 725 µl OPA reagenshez és 10 perc reakció idő után megmérte az abszorbanciát 340 nm-en. Az így kapott adatok és a kalibráció alapján számoltam ki a minta fehérjeemészthetőségét.

In vitro fehérjeemészthetőség kiszámolásának egyenlete:

$$IVPD (\%) = \left[\left(\frac{Abs-y}{m} - vak \right) \cdot \frac{5,7}{bf \cdot 1000} \right] \cdot 100, \quad (3)$$

ahol Abs: a minta abszorbanciája, y: a kalibrációs egyenlet tengelymetszete, m: a kalibrációs egyenes meredeksége, vak: a vak minta koncentrációja (mg/l), ami a kalibrációs egyenesből van kiszámolva, bf: a bemért fehérje tömege (mg)

3.2.6 Proantocianidin tartalom meghatározása

A mérés a Porter et al, 1985 alapján történt (Porter, Hrstich and Chan, 1985). A proantocianidok vagy kondenzált tanninok meleg, savas közegben (95:5 v/v%-os n-BuOH-HCl) antocianidokká alakulnak, melyek 550 nm-en spektrofotometriásan detektálhatóak.

5 mg tannin porhoz hozzáadtam 100 µl DMSO-t, majd ezt összekeverve hozzáadtam 9,9 ml metanolt és centrifugáltam 10 percig, 5500 rpm-n. A centrifugált metanolos tannin kivonat felülúszójának 1 ml-éhez 6 ml BuOH-HCl oldatot és 0,2 ml vasreagenst adtam. Kupakkal lezártam az üveget és 95 °C-os vízfürdőbe tettem 40 percre. Ezután 550 nm-en megmértem az abszorbanciát és kalibráció – amely 95%-ban tiszta, kondenzált tanninok felhasználásával készült – segítségével kiszámoltam a por tannin tartalmát.

Az almatörköly kivonatok proantocianidin tartalmának meghatározásához 600 µl almatörköly kivonathoz 10 ml metanolt adtam és centrifugáltam 10 percig, 5500 rpm-n. A felülúszó abszorbanciáját 550 nm-en lemértem és a kivonatok tannin tartalmát meghatároztam kalibráció segítségével.

3.2.7 Statisztikai elemzés

Minden adat átlag ± standard eltérés formában jelenítettem meg minden egyes minta három ismétlésére vonatkozóan. Az egyváltozós varianciaanalízist (ANOVA) Tukey post-hoc tesztel alkalmaztam RStudio használatával. A Student-féle t-próbát és a táblázatokat Microsoft Excel segítségével készítettem el. A különbségeket p < 0,05 esetén szignifikánsnak tekintettem. A metanolos és integrált mintaelőkészítési módszerrel mért minták eredményeinek az összehasonlítását Bland-Altman grafikus ábrázolással végeztem el (Bland and Altman, 1986). A két módszer átlaga található az x tengelyen, az y tengelyen pedig a két módszer közötti különbség. A torzítás, vagyis a különbség átlaga a módszerek közötti várható különbséget jelzi, az intervallum alsó és felső határértékei pedig a módszerek közötti különbségek ± 1,91*szórás értékét ábrázolják.

4. Kiértékelés

Az almatörköly kivonatok fehérjeemészthetőségre gyakorolt hatását Infogest *in vitro* emésztésszimulációval vizsgáltam meg sült marhahús minta mátrixon. Első lépésként, meghatároztam a sült marhahús fehérjeemészthetőségét, majd együttemésztesi kísérletben vizsgáltam az almatörköly (por) és kivonatainak (vizes, aceton-vizes) hatását.

Az emésztésszimuláció elvégzése után a fehérjeemészthetőség meghatározását kétféleképpen is elvégeztem. A mintákat előkészítettem a jelenleg elfogadott standard protokoll által meghatározott metanolos kicsapással, illetve egy másik, úgynevezett integrált mintaelőkészítést is alkalmaztam.

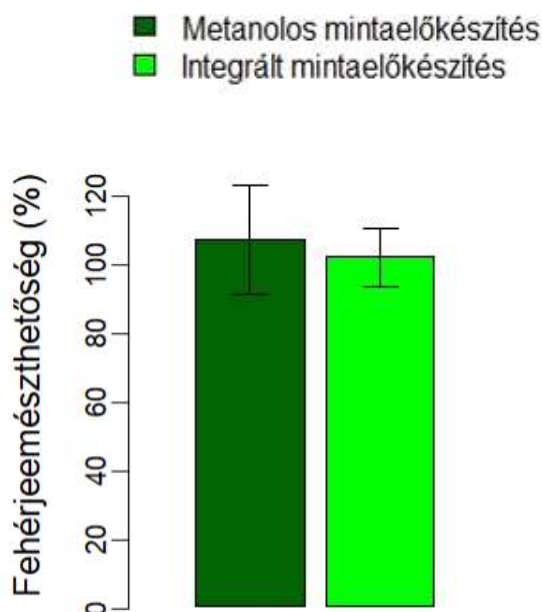
Mindkét módszerrel előkészített minták fehérje-tartalmát OPA-módszerrel határoztam meg, savas hidrolízist követően aminosav szinten aminosav-csoportok mennyisége alapján. A kapott eredmények alapján fehérjeemészthetőséget számoltam.

Végül az almatörköly por és az abból készült kivonatok proantocianidin-tartalmát is megvizsgáltam, annak érdekében, hogy a tapasztalt hatást esetleg ezen a polifenolos molekulák mennyiségéhez tudjam kötni.

4.1 A sült marhahús fehérjeemészthetősége

A marhahús fehérjeemészthetőségének értéke, amelyet metanol segítségével készítettem elő és kontroll mintaként vizsgáltam, $99 \pm 11,6\%$ -ot adott eredményül.

1. ábra: A kontroll minták fehérjeemészthetősége a két eltérő mintaelőkészítést alkalmazva (Forrás: saját munka)



Az integrált mintaelőkészítés esetében a marhahús fehérjeemészthetősége $94 \pm 7,8\%$ (1. ábra). Ez a két érték szignifikáns különbséget nem mutatott ki ($p = 0,553$), viszont a szórás mértéke jobb lett az integrált mintaelőkészítés során.

A szakirodalmi cikkekben, amelyekben szintén vizsgálták a marhahús fehérjeemészthetőségét, ahol ennél az értéknél kisebbet kaptak eredményül. Xie és társai húsok és húsanalógok tápértékét vizsgálták szintén *in vitro* fehérjeemésztési módszer segítségével. A vizsgált mintákat – sertés, marhahús, valamint növényi alapú húsanalógok – megfőzték, majd az Infogest protokoll alapján történt az emésztés, amely után etanolt adtak az emésztményekhez 3:1 arányban, majd a BCA kit segítségével mérték meg a fehérjeemészthetőséget. A főtt marhahús fehérjeemészthetősége körülbelül 80% (pontos adat nincs feltüntetve), amely kevesebb az általam mért értékeknél, ami azzal magyarázható, hogy a cikkben szárított minta emésztési vizsgálata történt, ami csökkenti az emészthetőség értékét, mivel a szárított minták esetében az emésztés előtt még víz felvétel történik (Xie *et al.*, 2022).

Wen és társai fehérjék *in vitro* emésztési termékeit vizsgálták marhahús, sertéshús, csirke és hal minták felhasználásával. A mintákat megfőzték, majd az emésztés során pepszinnel és tripszinnel kezelték. A marhahús fehérjeemészthetősége 80% körüli (pontos adat nincs feltüntetve) értéket adott eredményül, azonban ezt az értéket tömeg alapján számolták ki, a referencia termék tömegéhez viszonyítják az emésztetlen frakció tömegét (Wen *et al.*, 2015).

Farouk és társai különböző tényezők marhahús fehérjeemészthetőségére gyakorolt hatásait vizsgálták. Az egyik ilyen tényező a szarvasmarha kora, ezért megvizsgáltak tehénből, bikából és borjúból származó húst. A mintákat megfőzték, majd pepszinnel és pankreatinnal történt az emésztésszimuláció. Az eredmények alapján mindhárom minta (tehén, bika, borjú) esetében 90% feletti eredményeket kaptak, amely az általam mért eredményekkel egyezik (Farouk *et al.*, 2019).

A felsorolt mérések végrehajtása során eltérő emésztésszimulációt alkalmaztak, valamint az emészthetőség mértékének a meghatározása se egyező. Ezeket a szempontokat figyelembe kell venni az eredmények összehasonlítása során.

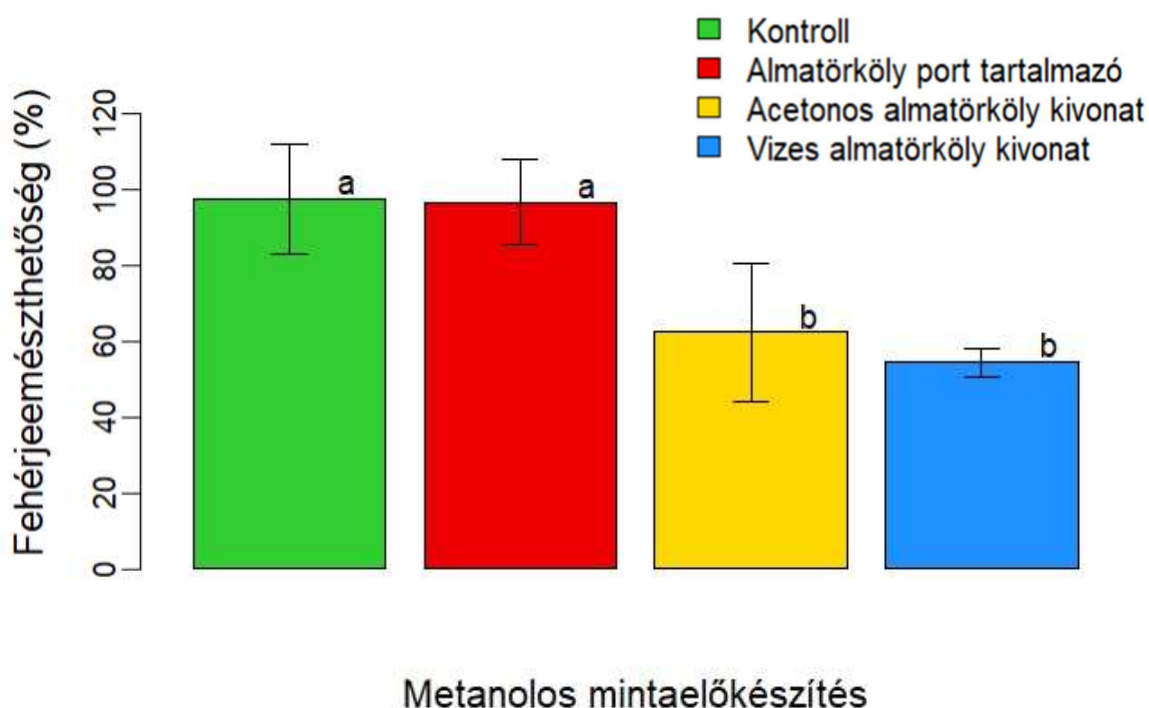
4.2 Az almatörköly hatása a fehérjeemészthetőségre

4.2.1. Standard mintaelőkészítés után mért eredmények

Az almatörköly különböző kivonatait tartalmazó minták marhahús fehérjeemészthetőségére (IVPD) gyakorolt hatását az 2. ábra szemlélteti. A mérések során a kontroll IVPD értékére $99 \pm 14,7\%$ -ot, az almatörköly port tartalmazó mintáké $99 \pm 11,6\%$ -ot kaptunk, így ezen két érték között szignifikáns eltérés nem mutatható ki ($p = 0,989$). Ebből arra következtethetünk, hogy a

marhahús fehérjeemészthetőségét az almatörköly por hozzáadása nem befolyásolja. Ezzel szemben az acetonos (IVPD: $63 \pm 18,3\%$) és vizes almatörköly kivonatot tartalmazó (IVPD: $55 \pm 3,7\%$) minták a kontrolltól szignifikánsan eltérnek ($p = 0,004$ és $p < 0,001$). Mindkét esetben a fehérjeemészthetőség csökkenését tapasztaltuk, a vizes kivonat esetében mintegy 44%-kal, míg az acetonos kivonat hozzáadása 37%-kal csökkentette az IVPD értékét. Az ANOVA teszt szignifikáns eltérést mutatott a négy csoport között ($p = 1,23 \cdot 10^{-5}$), ami arra utal, hogy az egyes csoportok között statisztikailag jelentős különbségek vannak. Ennek részletesebb vizsgálatára Tukey HSD tesztet alkalmaztam, amely megerősítette, hogy az acetonos és a vizes kivonatokkal kezelt minták IVPD értékei egymástól nem térnek el szignifikánsan, ugyanakkor mindkét csoport értékei jelentősen eltérnek a kontrolltól és az almatörköly port tartalmazó mintáktól.

2. ábra: A metanollal előkészített minták fehérjeemészthetőségének értékei (Forrás: saját munka)



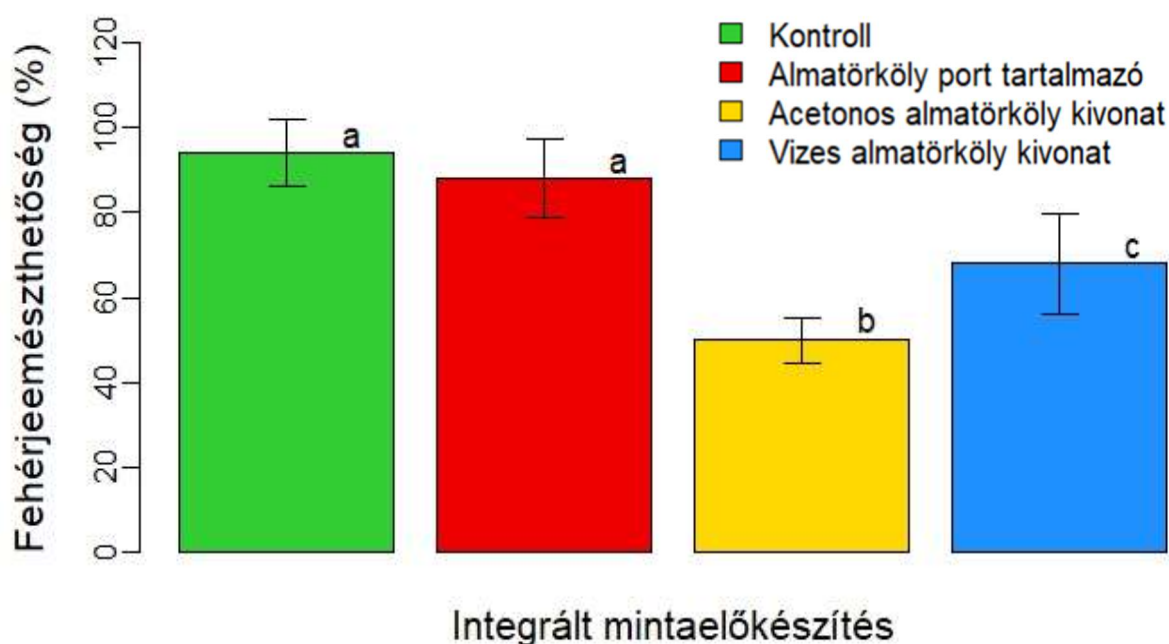
4.2.2. Integrált mintaelőkészítés után mért eredmények

Az integrált mintaelőkészítéssel készített minták fehérjeemészthetősége az 3. ábra mutatja be. A kontroll minták *in vitro* fehérjeemészthetőségi értéke $94 \pm 8,0\%$, az almatörköly port tartalmazó marhahús minták fehérjeemészthetősége $88 \pm 9,1\%$, vagyis a kontrollhoz képest az almatörköly hozzáadása 6%-os csökkenést idézett elő. A Student-féle t-próba azonban nem mutatott szignifikáns különbséget e két csoport között ($p = 0,243$). Az acetonos almatörköly

kivonattal kezelt minták fehérjeemészthetősége lényegesen alacsonyabb, $50 \pm 5,4\%$ volt, ez a kivonat hatása eredményezte a legnagyobb csökkenést, mintegy 47%-ot. A t próba alapján a két hatás között szignifikáns eltérést mutatott ki ($p = 5,46 \cdot 10^{-7}$). A vizes kivonattal együttemésztett sült marhahús minta IVPD értékére $68 \pm 11,7\%$ kaptam, amely a kontroll képest 28%-os csökkenést jelent, így a vizes kivonatot tartalmazó minták szintén szignifikánsan különböznek ($p = 0,001$) a kontroll mintáktól.

Az ANOVA statisztikai elemzés eredményei azt mutatják, hogy a négy csoport között szignifikáns eltérés tapasztalható ($p = 1,03 \cdot 10^{-7}$). További, részletes vizsgálat érdekében elvégeztem egy Tukey HSD tesztet, amely kimutatta, hogy bár a kontroll és az almatörköly port tartalmazó minták fehérjeemészthetősége nem tér el szignifikánsan egymástól, ugyanakkor a kivonatokat tartalmazó minták szignifikánsan különböznek mind a kontrolltól, mind egymástól fehérjeemészthetőség szempontjából. Ez alapján feltételezhető, hogy az almatörköly különböző feldolgozási módjai eltérő hatást gyakorolnak a fehérjeemészthetőségre, és a kivonat típusától függően különböző mértékben csökkentik a fehérjék emészthetőségét.

3. ábra: Az integrált módszerrel előkészített minták fehérjeemészthetőségének értékei
(Forrás: saját munka)



4.3 A metanolos és integrált mintaelőkészítési módszer összehasonlítása

A metanolos és integrált mintaelőkészítési módszerrel kapott eredmények összehasonlítása a 4. ábrán látható.

A metanolos előkészítéssel kapott eredményhez képest az integrált előkészítés után mért eredmények között 5% eltérés volt. Ez a különbség azonban nem szignifikáns ($p = 0,553$). Az

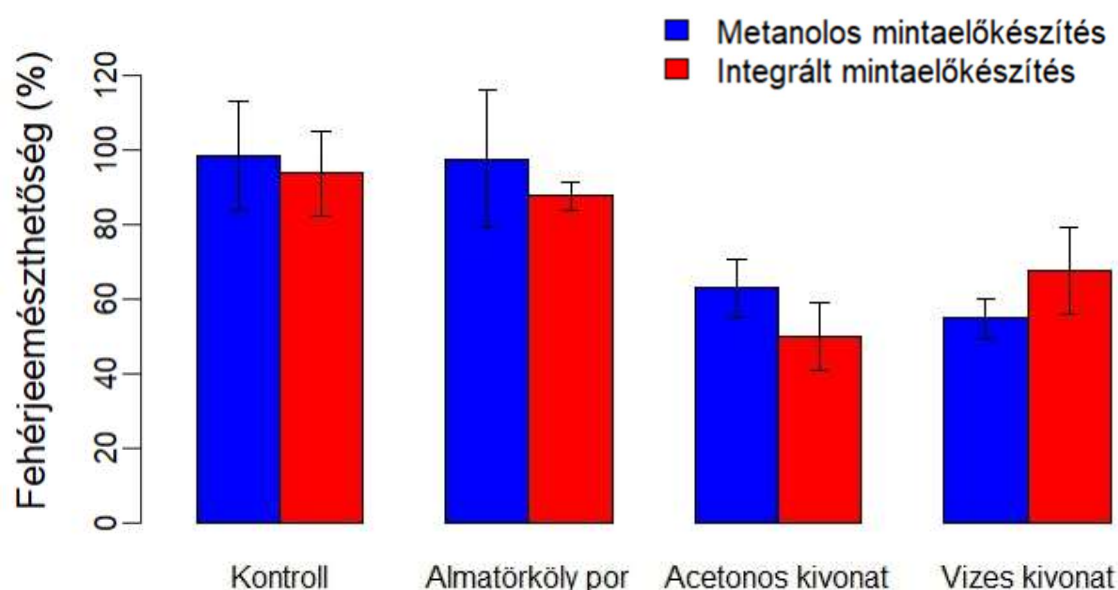
integrált mintaelőkészítés további előnye, hogy kisebb szórást eredményezett. Míg a metanolos módszerrel mért szórás 14,7% volt, addig az integrált módszerrel ez az érték csak 8,0% lett, vagyis majdnem a felére csökkent.

Az almatörköly port tartalmazó minták tekintetében metanolos és az integrált mintaelőkészítés esetén minimális különbség van a fehérjeemészthetőségben (10%-os különbség), amely nem szignifikáns ($p = 0,121$). Ezen minták mérése során is a szórás a metanolos előkészítés esetében magasabb volt, mint az integrált módszert alkalmazó méréseknél, mintegy 22%-kal kisebb értéket kaptam a szórásra.

Az acetonos kivonattal együttemésztett minták esetében a két különböző mintaelőkészítési módszer nem okozott szignifikáns különbséget a fehérjeemészthetőségben ($p = 0,151$). Az integrált előkészítés azonban jelentős előnyt mutatott a szórásban, amely több mint egyharmadára csökkent.

A vizes kivonatot tartalmazó minták esetében – az eddigi mintáktól eltérően – a metanolos előkészítésnél láthatunk alacsonyabb fehérjeemészthetőségi értéket. Az integrált módszert használva az IVPD értéke 24%-kal nagyobb eredményt adott, azonban ez az eltérés se mutatott szignifikáns különbséget. A fehérjeemészthetőség mellett a szórás értéke is növekedett, mintegy háromszorosára.

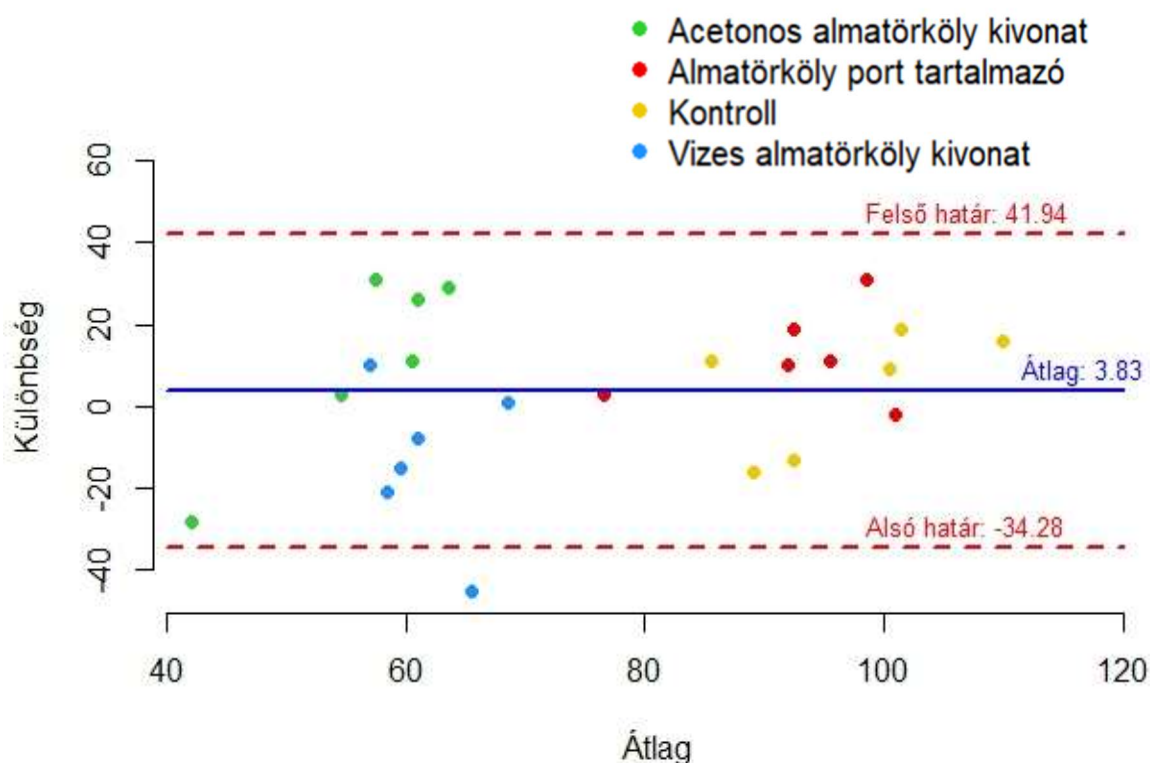
4. ábra: A metanolos és integrált mintaelőkészítési módszerek által kapott marhahús IVPD értékei (Forrás: saját munka)



A metanolos és integrált mintaelőkészítési módszerrel mért minták eredményeinek az összehasonlítására egy Bland-Altman grafikus ábrázolást is készítettem (5. ábra). Az összehasonlító vizsgálat során, a két különböző módszerrel kapott fehérjeemészthetőségi értékek átlagát és különbségét használtam fel, annak megállapítására, hogy mennyire feleltethető meg egymásnak a két módszer.

Az 5. ábrán a metanolos és integrált mintaelőkészítési módszerekkel mért fehérjeemészthetőségi átlagokat (x-tengely) ábrázoltam a két módszer értékei közötti különbségek (y-tengely) függvényében minden minta esetében. A torzítás 3,83%, ami a két mintaelőkészítési módszer átlagos különbségét adja, az ábrán középen húzódó kék vonalként jelenik meg. Ettől a vonaltól $\pm 1,96$ szórásnnyira találhatóak a megbízhatósági intervallumok határai, piros szaggatott vonallal jelölve. A megbízhatósági intervallum alsó határa -34,28%, felső határa pedig 41,94%. Ha a módszerek között nincs jelentős különbség, akkor a mérési eredmények ezen két vonal közé esnek. A vizes almatörköly kivonat esetében egy minta értéke a megbízhatósági intervallum alsó határán kívül esett, viszont a többi csoport esetében az összes minta értéke az intervallumon belül található.

5. ábra: A metanolos és az integrált mintaelőkészítés Bland-Altman ábrázolása (Forrás: saját munka)



A számértékek összehasonlítás és az 5. ábrán látható grafikus ábrázolás alapján is megállapítható, hogy a metanolos (standard) mintaelőkészítés és az alternatív (szelektív izolációs) mintaelőkészítési módszerek használata után mért eredmények felcserélhetők egymással, így mindkét módszer alkalmas a fehérjeemészthetőség meghatározására. Ebből kifolyólag olyan esetekben, ahol a minta tápérték összetétele alapján a hozzáadott bioaktívok hatása nem csak a cél tápanyagra lehet hatással, hanem más – jelentős mennyiségben jelenlévő – tápanyag esetén is, az integrált mintaelőkészítés használata előnyös lehet az interakciók vizsgálatára.

4.4 Almatörköly por proantocianidin tartalma

A proantocianidinok, vagy kondenzált tanninok képesek hozzákötődni a fehérjékhez, így az emésztéshez szükséges enzimekhez is, amelyek aktivitása ezáltal megváltozhat, ami végső soron befolyásolhatja az emészthetőséget. Emellett az emészteni kívánt fehérjékhez is kapcsolódhat, ami szintén változást okozhat a fehérjeemészthetőségben. Ezen okok miatt fontos mérni az almatörköly por és az abból készült kivonatok proantocianidin tartalmát annak meghatározására, hogy ez a vegyület befolyásolja-e a fehérjeemészthetőséget.

Az almatörköly por proantocianidin tartalma kimutatási határ alatt volt, vagyis vagy a módszer érzékenysége nem elégséges ennek kimutatására, vagy a sima metanolos oldás nem elegendő, hogy a porból direkt mérhető legyen a proantocianidin tartalom. Ennek ellenére az acetonos és vizes kivonatok proantocianidin tartalma meghatározható volt, és az értékek jelentősen különböztek egymástól, amint azt a 4. táblázat is mutatja. A vizes kivonatban a tannin tartalom $2,08 \pm 0,476$ mg/g, ami lényegesen alacsonyabb, mint az acetonos kivonaté, ahol ez az érték $17,88 \pm 0,509$ mg/g. Az eredmények alapján az acetonos kivonat tannintartalma több mint nyolcszor nagyobb, mint a vizes kivonaté. Ez a különbség t-próbával vizsgálva szignifikánsnak bizonyult ($p = 2,51 \cdot 10^{-6}$). Az acetonos kivonás esetében azért kaphattam jelentősen nagyobb értéket, mert a proantocianidinek kivonására 70%-os acetont szoktak alkalmazni, és ugyanezen oldószerrel készült az acetonos kivonat is.

Az eredmények azt mutatják, hogy bár az acetonos és vizes kivonatok proantocianidin tartalma jelentősen eltér, ez nem befolyásolta szignifikánsan a fehérjeemészthetőséget, mivel ezen két kivonatot tartalmazó minták fehérjeemészthetősége között szignifikáns eltérés nem mutatható ki.

4. táblázat: Az almatörkölyből készült kivonatok proantocianidin-tartalma (Forrás: saját munka)

	A kivonatban lévő almatörköly por tannin tartalma (mg/g por)	A kivonatban lévő almatörköly por tannin tartalma (%)	Student-féle t próba p értéke
Vizes kivonat	2,08±0,48	0,21±0,05	2,51*10 ⁻⁶
Acetonos kivonat	17,88±0,51	1,79±0,05	

5. Következtetések

A szakdolgozatomban a marhahús *in vitro* emésztési modelljén keresztül vizsgáltam, hogy az almatörköly különböző formái – por, acetonos és vizes kivonat – hogyan hatnak a fehérjeemészthetőségre. Ennek értékét kétféle mintaelőkészítési módszerrel határoztam meg, majd a kapott eredmények segítségével elemeztem ezen két módszer közötti különbségeket és megvizsgáltam, hogy helyettesíthető-e az egyik módszer a másikkal.

A marhahús almatörköly adagolásával történő *in vitro* emésztése során kapott fehérjeemészthetőségi adatok alapján az almatörköly por hozzáadása szignifikánsan nem befolyásolja a marhahús fehérjeemészthetőségét. Vagyis az almatörkölyben található rostok és bioaktív vegyületek a vizsgálatok alapján, úgy tűnik, hogy por formájában nem okoznak változást a fehérjék lebontásában. Ezzel szemben az almatörkölyből készült acetonos és vizes kivonatok hatása már szignifikáns változást, csökkenést eredményezett, vagyis ezen kivonatok rontják a marhahús fehérjeemészthetőségét. Ezek az eredmények hangsúlyozzák az almatörköly és annak különböző formáinak eltérő hatásait a marhahús emészthetőségére, és megmutatják, hogy a különböző előkészítési módszerek eredményei jelentősen eltérhetnek egymástól.

A proantocianidin tartalom az acetonos és vizes kivonatok között szignifikánsan eltérőnek bizonyult. Az acetonos kivonat rendelkezik magasabb proantocianidin tartalommal, ami azzal magyarázható, hogy a kivonat elkészítéséhez használt acetont, mint oldószer egy széles körben alkalmazott és hatékony anyag a proantocianidin kivonására. Ugyanakkor a fehérjeemészthetőség értéke a két kivonat esetében nem különbözött szignifikánsan, vagyis nincs befolyása a proantocianidin tartalomnak a fehérje emészthetőségére. Következésképpen a proantocianidin hatóanyagainak ilyen formában a fehérje lebontásában és felszívódásában nincs szerepük.

A két mintaelőkészítési módszer – a metanolos és az integrált módszerek – mérései alapján az eredmények között statisztikailag szignifikáns különbség nem mutatható ki. Ez azt jelenti, hogy az integrált mintaelőkészítési módszer a metanolos módszer helyettesítésére alkalmas, anélkül, hogy az eredmények megbízhatósága csökkenne. Az integrált módszer további előnye, hogy nemcsak a fehérjeemészthetőség vizsgálatára használható, hanem más tápanyagok, például a zsír és a zsírban oldódó vitaminok emésztésének vizsgálatára is. Így további emésztési szimulációk során, ahelyett, hogy különféle előkészítési módszereket kellene alkalmazni a különböző tápanyagcsoportok (például fehérjék, zsírok, vitaminok) vizsgálatára, az integrált módszer segítségével egyetlen lépésben képesek lehetünk előkészíteni az emésztmény mintát ahhoz, hogy ezek mindegyikének emésztését vizsgálni tudjuk. Ez a kutatók számára

időmegtakarítást jelent, valamint gazdasági előnyökkel is rendelkezik, mivel a kísérletekhez és a vizsgálatokhoz szükséges oldószerek és reagensek mennyisége csökkenthető az integrált módszer alkalmazásával, vagyis a laboratóriumi folyamatok hatékonyabbá tehetőek. Továbbá környezetvédelmi szempontból is előnyösebb a kevesebb vegyszer felhasználása miatt, ami hulladékok keletkezésének a csökkentését jelentheti.

6. Összegzés

Az almatörköly az almafeldolgozó ipar mellékterméke, ami például az almalé gyártása során keletkezik, amely gyümölcslemből évente több millió litert gyártanak. Emiatt rengeteg almatörköly keletkezik, aminek a felhasználása nem megoldott. Azonban számos ipari szektorban, például az élelmiszeriparban is alkalmazható lehet, köszönhetően a magas tápanyagtartalmának. A felhasználása történhet étrend kiegészítőként, funkcionális élelmiszer részeként, illetve élelmiszer adalékanyagként. Az almatörkölyben található komponensek, mint bioaktív anyagok jelentős szereppel bírnak az almatörkölyt tartalmazó élelmiszerek szervezetre gyakorolt hatásában. A fehérjék az emberi szervezet számára nélkülözhetetlenek, így megfelelő minőségű és mennyiségű fehérjék bevitele a szervezetben kiemelkedően fontos. Az almatörkölyvel dúsított élelmiszerek vagy ételek fehérjeminőségét befolyásolhatja az almatörkölyben található komponensek.

A szakdolgozatom elkészítése során a választott mátrixhoz, a sült marhahúshoz adagoltam az előzőlegesen liofilezett és őrölt almatörköly kivonatot, majd ezen mintákat *in vitro* emésztésszimuláció segítségével emésztettem. Az emésztett minták fehérjeemészthetőségét szabad amino-csoport-tartalom alapján OPA-módszerrel határoztam meg. A vizsgálat során különböző, almatörköly porból készült kivonatok is készítettem és megnéztem, hogy a szelektív kivonási módszerekkel létrehozott extraktumok hogyan befolyásolják a marhahús fehérjeemészthetőségét.

A kapott eredmények alapján almatörköly por hozzáadása a nem fejtet ki szignifikáns hatást marhahús fehérjeemészthetőségére. Ezzel szemben az almatörköly porból készült acetonos és vizes kivonatok jelentős csökkenést okoztak a fehérjeemészthetőségben. Ez arra utal, hogy az almatörköly különböző formái eltérő hatással vannak a sült marhahús fehérjeemészthetőségére, ami azzal magyarázható, hogy a kivonatok készítése olyan hatóanyagok mennyiségének növekedését eredményezte, amely már szignifikánsan befolyásolja, csökkenti a marhahús fehérjeemészthetőségét.

Munkám során továbbá vizsgáltam különböző mintaelőkészítési módszerek közti felcserélhetőséget. Azaz, hogy az emésztésszimulációt követően a mintákat Sousa et al., 2023 módszere alapján történő mintaelőkészítéssel mért minták fehérjeemészthetősége, milyen mértékben térnek el az úgynevezett integrált módszerrel történő méréstől. Az integrált mintaelőkészítési módszerrel a vizsgált mátrixnak nem csak a fehérjeemészthetősége mérhető, hanem a zsíremészthetősége is, vagy a zsírban oldódó vitaminok mennyisége is. Az így előkészített mintából ezáltal több tápanyag emészthetőségét lehet egyszerre elemezni, valamint

a komplex élelmiszer mátrixok esetén alternatíva lehet több tápanyag emészthetőségének hatékony meghatározására. Az eredmények alapján az integrált mintaelőkészítési módszer ugyanolyan megbízható, mint a metanolos módszer, vagyis helyettesíthető vele anélkül, hogy az eredmények pontossága és megbízhatósága csökkenne.

7. Irodalomjegyzék

Abelilla, J.J., Liu, Y. and Stein, H.H. (2018) 'Digestible indispensable amino acid score (DIAAS) and protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) in oat protein concentrate measured in 20- to 30-kilogram pigs', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), pp. 410–414. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8457>.

Alsedfy, M. *et al.* (2023) 'The impact of ascorbic acid (E 300) on digestion of different nutrients using In Vitro digestion model'. Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3108018/v1>.

Bland, J.M. and Altman, D.G. (1986) 'Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement'.

Bollineni, R.C. *et al.* (2015) 'A differential protein solubility approach for the depletion of highly abundant proteins in plasma using ammonium sulfate', *The Analyst*, 140(24), pp. 8109–8117. Available at: <https://doi.org/10.1039/C5AN01560J>.

Borah, P.K., Sarkar, A. and Duary, R.K. (2019) 'Water-soluble vitamins for controlling starch digestion: Conformational scrambling and inhibition mechanism of human pancreatic α -amylase by ascorbic acid and folic acid', *Food Chemistry*, 288, pp. 395–404. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.022>.

Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R. and Burlingame, B. (2012) 'Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method', *British Journal of Nutrition*, 108(S2), pp. S183–S211. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>.

Brodkorb, A. *et al.* (2019) 'INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature Protocols*, 14(4), pp. 991–1014. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.

Cirkovic Velickovic, T.D. and Stanic-Vucinic, D.J. (2018) 'The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), pp. 82–103. Available at: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12320>.

Craddock, J.C. *et al.* (2021) 'Limitations with the Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) with Special Attention to Plant-Based Diets: a Review', *Current Nutrition Reports*, 10(1), pp. 93–98. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00348-8>.

De Toledo, N.M.V. *et al.* (2013) 'Interaction and digestibility of phaseolin/polyphenol in the common bean', *Food Chemistry*, 138(2–3), pp. 776–780. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.079>.

Duong-Ly, K.C. and Gabelli, S.B. (2014) 'Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 85–94. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>.

Egger, L. *et al.* (2016) 'The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action', *Food Research International*, 88, pp. 217–225. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>.

Farouk, M.M. *et al.* (2019) 'Factors Affecting the Digestibility of Beef and Consequences for Designing Meat-Centric Meals', *Journal of Food Quality*, 2019, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/2590182>.

Gazalli, H. *et al.* (2014) 'Nutritional Value and Physiological Effect of Apple Pomace'.

Hodgkinson, S.M. *et al.* (2022) 'Comparison of True Ileal Amino Acid Digestibility between Adult Humans and Growing Pigs', *The Journal of Nutrition*, 152(7), pp. 1635–1646. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/nxac077>.

Huang, H. and Zhao, M. (2008) 'Changes of trypsin in activity and secondary structure induced by complex with trypsin inhibitors and tea polyphenol', *European Food Research and Technology*, 227(2), pp. 361–365. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0729-2>.

Joehnke, M. *et al.* (2018) 'Effect of Dietary Fibre Fractions on In Vitro Digestibility of Rapeseed Napin Proteins', *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(4), pp. 335–345. Available at: <https://doi.org/10.2478/pjfn-2018-0005>.

Kaspchak, E. *et al.* (2019) 'Effect of divalent cations on bovine serum albumin (BSA) and tannic acid interaction and its influence on turbidity and in vitro protein digestibility', *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, pp. 486–492. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.102>.

Kauser, S. *et al.* (2023) 'Apple pomace, a bioresource of functional and nutritional components with potential of utilization in different food formulations; a review', *Food Chemistry Advances*, p. 100598. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100598>.

Lamothe, S. *et al.* (2014) 'Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment', *Food Funct.*, 5(10), pp. 2621–2631. Available at: <https://doi.org/10.1039/C4FO00203B>.

López-Hortas, L. *et al.* (2018) 'Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review', *Food Research International*, 103, pp. 130–149. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.028>.

Martini, S., Conte, A. and Tagliazucchi, D. (2019) 'Comparative peptidomic profile and bioactivities of cooked beef, pork, chicken and turkey meat after in vitro gastro-intestinal digestion', *Journal of Proteomics*, 208, p. 103500. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103500>.

Mat, D.J.L. *et al.* (2016) 'In vitro digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids', *Food Research International*, 88, pp. 226–233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>.

Minekus, M. *et al.* (2014) 'A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus', *Food Funct.*, 5(6), pp. 1113–1124. Available at: <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>.

Moughan, P.J. *et al.* (2005) 'An Acute Ileal Amino Acid Digestibility Assay Is a Valid Procedure for Use in Human Ileostomates', *The Journal of Nutrition*, 135(3), pp. 404–409. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.404>.

Moughan, P.J. and Lim, W.X.J. (2024) ‘Digestible indispensable amino acid score (DIAAS): 10 years on’, *Frontiers in Nutrition*, 11, p. 1389719. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1389719>.

Nielsen, P.M., Petersen, D. and Damdbmann, C. (2001) ‘Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis’, *Journal of Food Science*, 66(5), pp. 642–646. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>.

Novák, P. and Havlíček, V. (2016) ‘Protein Extraction and Precipitation’, in *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 51–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00004-5>.

Porter, L.J., Hrstich, L.N. and Chan, B.G. (1985) ‘The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin’, *Phytochemistry*, 25(1), pp. 223–230. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3).

Santos-Hernández, M. *et al.* (2020) ‘Peptidomic data of egg white gastrointestinal digests prepared using the Infogest Harmonized Protocol’, *Data in Brief*, 31, p. 105932. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105932>.

Schaafsma, G. (2005) ‘The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)—A Concept for Describing Protein Quality in Foods and Food Ingredients: A Critical Review’, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 88(3), pp. 988–994. Available at: <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.988>.

Sharma, H. *et al.* (2018) ‘Pentacyclic triterpenes: New tools to fight metabolic syndrome’, *Phytomedicine*, 50, pp. 166–177. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.011>.

Skinner, R.C. *et al.* (2018) ‘A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace’, *Nutrition Reviews* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy033>.

Sousa, R. *et al.* (2023) ‘In vitro digestibility of dietary proteins and in vitro DIAAS analytical workflow based on the INFOGEST static protocol and its validation with in vivo data’, *Food Chemistry*, 404, p. 134720. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134720>.

Tagliazucchi, D. *et al.* (2018) ‘Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk’, *International Dairy Journal*, 81, pp. 19–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.014>.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E. and Conte, A. (2005) ‘Effect of Some Phenolic Compounds and Beverages on Pepsin Activity during Simulated Gastric Digestion’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), pp. 8706–8713. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf058074n>.

Tavano, O.L., Neves, V.A. and Da Silva Júnior, S.I. (2016) ‘In vitro versus in vivo protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions’, *Food Research International*, 89, pp. 756–763. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.005>.

Vaez, S. *et al.* (2023) ‘Evaluation of apple pomace biochemical transformation to biofuels and pectin through a sustainable biorefinery’, *Biomass and Bioenergy*, 172, p. 106757. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106757>.

Vertommen, A. *et al.* (2010) ‘Evaluation of chloroform/methanol extraction to facilitate the study of membrane proteins of non-model plants’, *Planta*, 231(5), pp. 1113–1125. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1121-1>.

Waldbauer, K., McKinnon, R. and Kopp, B. (2017) ‘Apple Pomace as Potential Source of Natural Active Compounds’, *Planta Medica*, 83(12/13), pp. 994–1010. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0043-111898>.

Wen, S. *et al.* (2015) ‘Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish’, *PROTEOMICS*, 15(21), pp. 3688–3698. Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.201500179>.

Xie, Y. *et al.* (2022) ‘Real meat and plant-based meat analogues have different in vitro protein digestibility properties’, *Food Chemistry*, 387, p. 132917. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132917>.

Zewdie, A.K. (2019) ‘The Different Methods of Measuring Feed Digestibility: A Review’.

Zhang, F. *et al.* (2021) ‘Apple pomace as a potential valuable resource for full-components utilization: A review’, *Journal of Cleaner Production*, 329, p. 129676. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129676>.

Zhang, Y., He, S. and Simpson, B.K. (2018) ‘Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques’, *Current Opinion in Food Science*, 19, pp. 30–35. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007>.

Zhou, H., Tan, Y. and McClements, D.J. (2023) ‘Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review’, *Annual Review of Food Science and Technology*, 14(1), pp. 135–156. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235>.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a konzulensemnek, Dr. Tormási Juditnak a szakdolgozatom megírásához nyújtott rengeteg segítséget és hogy bármilyen felmerülő kérdéssel bármikor kereshettem.

Emellett köszönettel tartozom az Élelmiszerkémiai és Analitikai Tanszék laborjában lévő munkatársaknak és László Csengének a mérések végrehajtása során nyújtott segítségért.

Táblázat- és ábrajegyzék:

1. táblázat: Az Infogest in vitro emésztésszimuláció során felhasznált szimuláns oldatok összetétel (Forrás: Brodkorb et al., 2019)	15
2. táblázat: Az emésztett minták összetevői (Forrás: saját munka)	17
3. táblázat: Az OPA méréshez szükséges kalibráló oldatsor összeállításának leírása (Forrás: Nielsen, Petersen and Dambrmann, 2001)	19
4. táblázat: Az almatörkölyből készült kivonatok proantocianidin-tartalma (Forrás: saját munka).....	28
1. ábra: A kontroll minták fehérjeemészthetősége a két eltérő mintaelőkészítést alkalmazva (Forrás: saját munka).....	21
2. ábra: A metanollal előkészített minták fehérjeemészthetőségének értékei (Forrás: saját munka).....	23
3. ábra: Az integrált módszerrel előkészített minták fehérjeemészthetőségének értékei (Forrás: saját munka)	24
4. ábra: A metanolos és integrált mintaelőkészítési módszerek által kapott marhahús IVPD értékei (Forrás: saját munka).....	25
5. ábra: A metanolos és az integrált mintaelőkészítés Bland-Altman ábrázolása (Forrás: saját munka).....	26