



**Élelmiszertudományi Kar**

Hűtő- és Állattermék Technológia Tanszék

# **Hús- és vérfehérjék nagy hidrosztatikus nyomáskezelés hatására bekövetkező változásainak vizsgálata**

**OTDK Dolgozat**

**CSEHI BARBARA**

MSc. II.évf



**Témavezetők:**

**Dr. Friedrich László**, egyetemi docens  
**Némethné Dr. Szerdahelyi Emőke**, tudományos  
főmunkatárs

TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005  
TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

**Budapest  
2014**

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| TARTALOMJEGYZÉK.....                                          | 1  |
| 1.BEVEZETÉS.....                                              | 3  |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....                                   | 4  |
| 2.1. A hús összetétele, húsfehérjék.....                      | 4  |
| 2.2. A vér összetétele és felhasználhatósága.....             | 7  |
| 2.3. Nagy hidrosztatikus nyomáskezelés.....                   | 9  |
| 2.4. Elektroforetikus módszerek.....                          | 10 |
| 2.5. Kapillár elektroforézis.....                             | 12 |
| 2.6. Fehérjedenaturációs vizsgálatok.....                     | 13 |
| 3. CÉLKITŰZÉSEK.....                                          | 14 |
| 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....                                  | 15 |
| 4.1. Kísérletek helye.....                                    | 15 |
| 4.2. Anyagok.....                                             | 15 |
| 4.3. Módszerek.....                                           | 15 |
| 4.3.1. HHP.....                                               | 15 |
| 4.3.2. Színmérés.....                                         | 16 |
| 4.3.3. A vér szeparálása.....                                 | 17 |
| 4.3.4. Miofibrilláris és szarkoplazma fehérjék izolálása..... | 17 |
| 4.3.5. Izoelektromos fókuszálás.....                          | 17 |
| 4.3.6. SDS poliakrilamid gélelektroforézis.....               | 19 |
| 4.3.7. Fehérjedenaturációs vizsgálatok.....                   | 21 |
| 4.3.8. A karnozin extrakciója.....                            | 22 |
| 4.3.9. Kiértékelés.....                                       | 23 |
| 5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK.....                 | 24 |
| 5.1. Színmérés eredményei.....                                | 24 |
| 5.2. Izoelektromos fókuszálás eredményei.....                 | 29 |
| 5.3. SDS-PAGE eredmények.....                                 | 31 |
| 5.4. DSC mérések eredményei.....                              | 37 |
| 5.5. Kapillár elektroforézis (karnozin) eredmények.....       | 38 |
| 5.6. Statisztikai kiértékelés.....                            | 41 |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS.....                                         | 44 |
| IRODALOMJEGYZÉK.....                                          | 46 |

## 1. BEVEZETÉS

Az élelmiszeripar az egyik legfontosabb iparág, egy olyan komplex rendszer, mely magában foglal számos iparágat, többek között a húsipart, tejipart, malomipart, édesipart és konzervipart. Legfőbb feladata, hogy az embereket megfelelő minőségű és mennyiségű élelmiszerrel lássa el, és ennek érdekében új módszereket, technológiai eljárásokat fejlesszen ki. A megtermelt élelmiszert tartósítási eljárásnak kell alávetni, annak érdekében, hogy megfelelő minőségben érjen a fogyasztóhoz. Számos tartósítási módszert dolgoztak ki. Ilyen például a hőkezelés, fagyasztás, tartósítószer adagolás, és különféle csomagolási módszerek stb., azonban ezek közül a többség jelentősen befolyásolja a friss élelmiszer fizikai vagy kémiai állapotát. Célunk, hogy az élelmiszereket a lehető legkevesebb behatásnak tegyük ki, de emellett élelmiszerbiztonságilag megfelelőek maradjanak, mivel napjainkban egyre nagyobb igény mutatkozik minimálisan feldolgozott, kiváló minőségű és mikrobiológiailag stabil élelmiszerek iránt. A nagy hidrosztatikus nyomáskezelés (HHP: High Hydrostatic Pressure) egy olyan ígéretes eljárás, mely ezeket a tulajdonságokat ötvözi. 1895-ben Roger által tett felfedezés - mely szerint a magas nyomás inaktiválja a baktériumokat - tette lehetővé technológia kifejlődését (Roger, 1895).

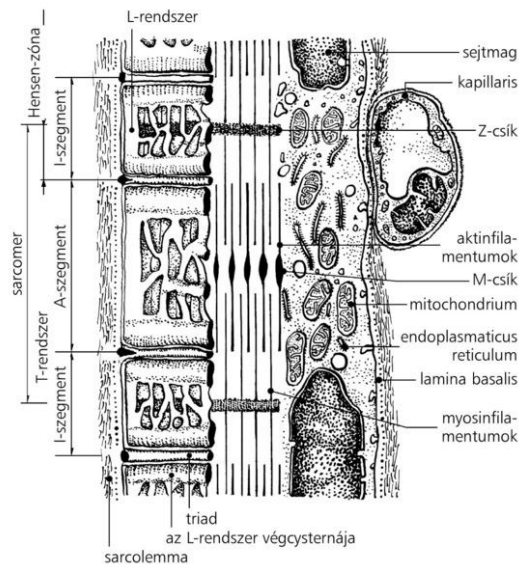
Kísérleteim során a nyomáskezelésnek a friss húsról és a vérre kifejtett hatásait vizsgáltam. A kutatás során főként fehérjeszerkezeti, fizikai és módszertani vizsgálatokat folytattam.

A vér egy olyan ipari melléktermék, melynek magas az ásványi anyag és fehérjetartalma. Az összetevők felhasználásához először a beérkező mellékterméket mikrobiológiailag biztonságossá kell tenni. A nyomáskezelés erre alkalmas lehet, azonban elengedhetetlen, hogy megvizsgáljuk, hogy a vér milyen fizikai és kémiai változásokon megy keresztül a nyomáskezelés hatására. Mivel ez a terület az élelmiszeripar egyik kevésbé kutatott területe, ezért dolgozatomban erre fektettem nagyobb hangsúlyt.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A HÚS ÖSSZETÉTELE, HÚSFEHÉRJÉK

Az emberi szervezet számára elengedhetetlenül fontosak a fehérjék. A folyamatos sejtmegújulás végett táplálékunknak jelentős mennyiségben kell tartalmaznia fehérjéket, aminosavakat. Az állati eredetű táplálékok, mint például a tojás és a hús a teljes értékű, ún. komplett fehérjékhez tartoznak, az emberi szervezet számára optimális aminosav tartalmuk alapján. (Kosáry, 2014) Kimondhatjuk tehát, hogy az állati eredetű élelmiszerek táplálkozástani szempontból meghatározó szerepet töltenek be. Az élelmiszeripar számtalan eljárást fejlesztett ki a húsok és hústermékek előállítására, feldolgozására. Az ipar számára az állati szövetek közül a legfontosabbak az izomszövetek, kötő- és támasztószövetek, hámszövetek, idegszövetek és a vérszövet. (Gasztonyi és Lásztity, 1993) Az élelmiszeriparban hús alatt az izomszövetet értjük, azonban tisztában kell lennünk azzal, hogy a hús tartalmaz ezenkívül zsírszövetet, ínszövetet, kötőszövetet, és egyes esetekben csontszövetet is. (Kosáry, 2014) Az izomszövet jelentős részét adják a harántcsíkolt izmok, melyek izomkötegekből állnak. Az izomkötegeket felépítő izomnyalábok pedig izomrostokból épülnek fel. A harántcsíkolt izomsejt vázlatát láthatjuk az 1. ábrán, ahol megfigyelhetjük az izomrostot felépítő ismétlődő alegységeket a szarkomereket.



**1. ábra.** Harántcsíkolt izomsejt vázlatosan (Fehér, 2000)

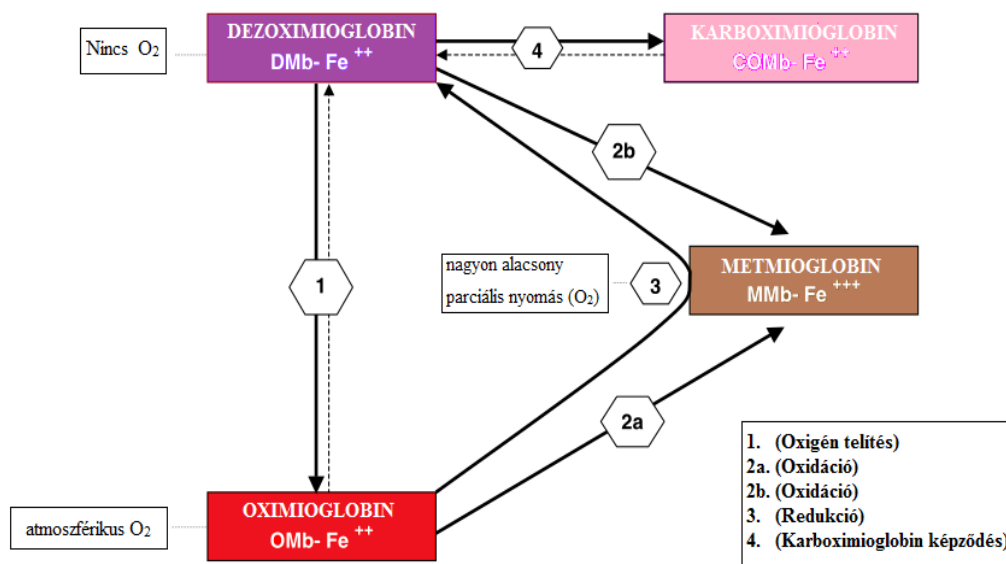
A vágóállatok izomszövetének átlagos összetételét százalékban az 1-es táblázatban látható.

**1. táblázat.** Vágóállatok izomszövetének átlagos összetétele (Gasztonyi és Lásztity, 1993)

| Összetevők                                          | %                                             | %     |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|
| VÍZ                                                 |                                               | 75,50 |
| FEHÉRJE                                             |                                               | 18,00 |
| Miofibrillumok                                      | miozin, tropomiozin,<br>troponin, és –aktinin |       |
|                                                     | M-fehérje                                     | 7,50  |
|                                                     | aktin                                         | 2,50  |
| Szarkoplazma                                        | miogén, globulinok                            | 5,60  |
|                                                     | mioglobin                                     | 0,36  |
|                                                     | hemoglobin                                    | 0,04  |
| Szarkolemma                                         | citokróm C                                    | 0,002 |
| Kötőszövet és egyéb                                 | elasztin, kollagén és egyéb,<br>nem oldódó    | 2,00  |
| ZSÍR                                                |                                               | 3,00  |
| NEM FEHÉRJE, NITROGÉNTARTALMÚ VEGYÜLETEK            |                                               | 1,57  |
| Kreatin                                             |                                               | 0,55  |
| Inozin monofoszfát                                  |                                               | 0,30  |
| Di- és trifoszfo piridin<br>nukleotid               |                                               | 0,07  |
| Szabad aminosav                                     |                                               | 0,35  |
| Karnozin és anszerin                                |                                               | 0,30  |
| SZÉNHIDRÁT                                          |                                               | 0,28  |
| Glikogén                                            |                                               | 0,10  |
| Glükóz-6-foszfát                                    |                                               | 0,17  |
| Glükóz                                              |                                               | 0,01  |
| VITAMINOK, SZERVES SAVAK,<br>EGYÉB SZERVES VEGYÜLET |                                               | 1,00  |
| Tejsav                                              |                                               | 0,90  |
| Vitaminok, egyéb<br>intermediedek                   |                                               | 0,10  |
| SZERVETLEN ALKOTÓRÉSZEK                             |                                               | 0,65  |
| Foszfor                                             |                                               | 0,20  |
| Kálium                                              |                                               | 0,35  |
| Nátrium                                             |                                               | 0,05  |
| Magnézium                                           |                                               | 0,02  |
| Egyéb szervetlen                                    |                                               | 0,03  |

A húsfehérjék három legnagyobb csoportját adják a miofibrilláris, szarkoplazma és a szarkolemma fehérjék. A miofibrillumok, mint például a miozin, troponin, aktin, M-fehérje a húsfehérjék több mint 50%-át adják, és csak magas só koncentrációjú oldatban oldódnak. A szarkoplazma fehérjék vízben és híg sóoldatban oldódnak, és számos kiemelten fontos fehérje tartozik hozzájuk. Ilyen a mioglobin, és a hemoglobin.

A mioglobin adja a hús színét, ezért élelmiszeripari szempontból lényeges. A mioglobin a hús összes pigmentjeinek 90%-át teszi ki, míg a hemoglobin a 10%-át (Gasztonyi és Lásztity, 1993). A mioglobin olyan globuláris fehérje, amely képes megkötni és elengedni az oxigén molekuláját. Vas(II)-t tartalmazó hem csoportból és egy polipeptidláncból áll. A mioglobin oxigénaffinitása jelentősen nagyobb, mint a hemoglobiné (Patkós, 2007). A mioglobin gyakran megtalálható három különböző formában, ilyen a dezoximioglobin, oximioglobin és a metmioglobin. A friss hús színét a három pigment relatív aránya és eloszlása határozza meg. A három pigment átalakulására hatással lehetnek a környezeti tényezők, mint például a hőmérséklet, relatív nedvességtartalom és a fény (Gao et al., 2014). Kutatások bizonyították a mioglobin és a lipidoxiáció közötti kapcsolatot is (Faustman et al., 2010). A hús felszínén végbemenő mioglobin átalakulásokat mutatja be a 2. ábra (redox rendszerek).



**2. ábra.** Mioglobin átalakulása (Mancini és Hunt, 2005)

A hús színét a mioglobin mellett a hemoglobin is befolyásolja. A hemoglobin a gerincesekben, a vörösvértestekben (eritrocitákban) található, és főként az oxigén szállításáért felelős (Patkós, 2007). A hemoglobin négy hemje - amely vas(II)-t tartalmaz - képes megkötni

egy-egy oxigén molekulát, és így kialakul az oxihemoglobin. Abban az esetben, amikor a vas kötőhely betöltetlen marad, dezoxihemoglobinnal beszélünk (Richards et al., 2002). Táplálkozásbiológiai szempontból elmondható, hogy a hem vas könnyebben szívódik fel, mint a nem hem forma, melyek főleg növényi forrásokból származnak (In et al., 2002). Az állati eredetű termékek fogyasztása elősegíti a szervezet optimális vasháztartásának kialakulását.

A hús színének kialakulásában és változásaiban több tényező is szerepet játszik. A fehérjéken kívül a húsban különböző biológiailag aktív komponensek is találhatók, melyek egyrészt az egészség megőrző táplálkozás szempontjából, másrészt a hús minősége szempontjából is fontosak. Ezek közé tartoznak az imidazol dipeptidek, mint például a karnozin és az anszerin (Szerdahelyi, 2000).

A karnozinnak több előnyös tulajdonsága is ismert. Bizonyítottan segít a húsok színváltozásának megelőzésében például: darált sertéshúsnál (Kansci et al., 1997). A karnozin egy olyan dipeptid, amely antioxidáns tulajdonságokkal bír, és számos eljárásnak jól ellenáll. Kísérletek bizonyítják, hogy a fagyasztás, hőkezelés és fagyasztva szárítás sem okoz jelentős változást a mérhető koncentrációjában (Szerdahelyi, 2013). Marhahús pogácsák vizsgálata során megfigyelték, hogy 1% karnozin tartalom gátolta a metmioglobin kialakulását (Bekhit et al., 2004). Ezen adatok ismeretében méréseink során indokoltnak tartottuk a karnozintartalom mérését, annak érdekében, hogy megfigyeljük a vegyület viselkedését a nyomáskezelés során.

## 2.2 A VÉR ÖSSZETÉTELE ÉS FELHASZNÁLHATÓSÁGA

A vér olyan folyékony állapotú sajátos kötőszövet, mely plazmából és benne szuszpendált alakos elemekből áll (Gasztonyi és Lásztity, 1993). Funkciói között találjuk a víz, oxigén és a tápanyagok szállítását azok felhasználási helyeire, valamint részt vesz a kiválasztási, védekezési és kommunikációs feladatok ellátásában. Ha a plazmából eltávolítjuk a fibrinogént megkaphatjuk a folyékony állapotú, halványsárga vérsavót, más néven szérumot. A plazmában lévő vörösvérsejt, fehérvérsejt és vérlemezkék részt vesznek a szervezet homeosztázisának fenntartásában. A marhavér összetételét a 2. táblázatban láthatjuk.

**2. táblázat.** Szarvasmarhavér összetétele (Gasztonyi és Lásztity, 1993)

| Összetételi jellemző<br>(%) | Szarvasmarha |        |                |
|-----------------------------|--------------|--------|----------------|
|                             | Vér          | Szérum | Vörösvérsejtek |
| Nedvesség                   | 80,90        | 91,40  | 59,20          |
| Szárazanyag                 | 19,10        | 8,60   | 40,80          |
| Össz. Fehérje               | 17,30        | 7,30   | 38,00          |
| Hemoglobin                  | 10,30        | -      | 31,60          |
| Cukor                       | 0,07         | 0,10   | -              |
| Nátrium                     | 0,37         | 0,43   | 0,22           |
| Kálium                      | 0,04         | 0,03   | 0,07           |
| Vas                         | 0,035        | -      | 0,120          |
| Kalcium                     | 0,006        | 0,012  | -              |
| Magnézium                   | 0,003        | 0,004  | 0,002          |
| Klór                        | 0,31         | 0,37   | 0,18           |
| Foszfor                     | 0,04         | 0,03   | 0,07           |
| Koleszterin                 | 0,19         | 0,13   | 0,34           |
| Lecitin                     | 0,24         | 0,17   | 0,37           |

A húsiparban jelentős mennyiségű vér keletkezik, mint melléktermék. A vérfehérjék egy részét a húsipar használja fel, mint élelmiszer összetevőt úgymint természetes színezőanyag, emulgálószer vagy zsírhelyettesítő. Mégis a melléktermék feldolgozásban a vér jelentős része, és a vérben lévő körülbelül 18% fehérjének nagy része jelenleg kihasználatlan (In et al.,2002). Számos országban a vért környezeti veszélyek csökkentése végett energiaigényes és költséges eljárásokkal semmisítik meg, elesve ezzel az értékes fehérjeforrástól. Továbbá a vérben lévő hem fehérje a hemoglobin, alkalmas lenne a vashiány kialakulásának megelőzésére, jó felszívódása végett. A celluláris vörösvérsejt frakciója képezi a sertésvér 40%-át. A hemoglobin alkotja a vörösvérsejt frakciójának 95%-át (száraz tömegre vetítve), ami jó táplálkozási és funkcionális tulajdonságokkal bír (Toldrá et al., 2008).

A vér feldolgozása a húsipar egy fontos problémájára is részben megoldást nyújthat. Ez nem más, mint nitrit kiváltása. A húsipar számára az egyik legnehezebb problémát az jelenti, hogy a nitrit kiváltására egy életképes alternatívát találjon. A nitrit pozitívan befolyásolja a hús textúráját, színét, ízét és antimikrobás tulajdonságokkal is bír. Kiváltására csak olyan összetett elegyek lehetnek képesek, melyek rendelkeznek a nitrit tulajdonságaival. Az elegy egyik javasolt színezőanyaga a CCMP (cooked cured meat pigment), melyet szarvasmarha és/vagy sertés vörösvérsejtekből állítanak elő. Hasonló színező erővel bír, mint a nitrit, viszont nincs mutagén hatása (Ofori és Hsieh, 2012).

A vágóhidakról érkező vér mikrobiológiai minőségét javítani kell, mielőtt azt használják, mint élelmiszer összetevőt (Toldrá et al., 2004). A vért, amely az összes frakcióját tartalmazza, csak korlátozott mennyiségben adagolhatjuk élelmiszerekhez. A végtermék érzékszervi tulajdonságainak veszélyeztetése nélkül a vér körülbelül 0,5%-2,0%-ig adagolható. Ennek értelmében a vért a további felhasználhatóság végett frakcióira kell bontani. Számos eljárás van ennek a problémának a megoldására, azonban egyes kezelések nem költséghatékonyak vagy a létrejött terméknek sós és/vagy keserű ízt kölcsönöznek. Ismeretes olyan sikeres eljárás, melynek során a vérben lévő globint elkülönítik, és termékként egy fehér színű, szinte íztelen anyagot kapnak (papain és nátrium-hipoklorit felhasználásával) (Ofori és Hsieh, 2012). A sikeres eljárás dacára a vérben lévő fehérjék kihasználatlanok. Törekedni kell olyan eljárások, kezelések kifejlesztésére, melyet mind az ipar mind pedig a fogyasztók elfogadnak.

## 2.3 NAGY HIDROSZTATIKUS NYOMÁSKEZELÉS

A nagy hidrosztatikus nyomáskezelés egy olyan kíméletes eljárás, melynek hatására az élelmiszerben lévő mikroorganizmusok részben vagy teljesen inaktiválódnak. A kezelés során a termék organoleptikus tulajdonságai csak kis mértékben változnak (Campus, 2010). A hatásmechanizmus során a mikrobákban lévő fehérjék denaturálódnak (kovalens kötések felbomlanak) és bekövetkezik a sejthalál (Morales et al., 2008). A vegetatív patogéneknek 2-4 log egység csökkenést figyeltek meg különböző húskészítményeknél, melynek következtében biztonságosabb élelmiszereket, valamint fokozott eltarthatóságot kaphatunk (Bajovic et al., 2012).

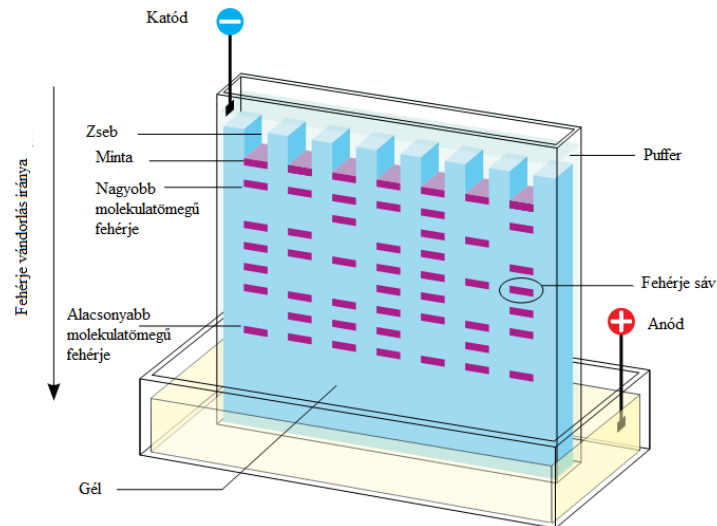
A fogyasztói preferenciákat a hús színe szignifikánsan befolyásolja, és ebből kifolyólag annak a valószínűségét, hogy a húst meg fogják vásárolni (Claus és Du, 2013). Ezért fontos, hogy a nyomáskezelés paramétereit optimálisan állítsuk be, annak érdekében, hogy a termék a lehető legkevesebb színváltozáson menjen keresztül. Tanulmányok kimutatták, hogy a hús elszíntelenedése szorosan kapcsolódik a mioglobinnal történő spontán változásához (Berkhit et al., 2003). A kezelés hatására a friss húsokban lévő mioglobinnal történő konformációs változások mennek végbe, mint például a globin denaturációja vagy a vasion oxidációja, mely a hús elszíntelenedéséhez vezet (Toldrá et al., 2008). Megfigyelték, hogy a HHP kezelés magas nyomásértékeknél lipidoxidációt okoz friss húsok esetében, amely a minőség és az eltarthatóság csökkenéséhez vezet, azonban a lipidoxidációt különböző antioxidánsok

hozzáadásával meg lehet előzni (Bolumar et al., 2014). A marhahús esetében a lipidoxidáció mértéke alacsonyabb a HHP kezelés hatására (200 MPa-on) mint a csirke vagy sertés esetében (Medina-Meza et al., 2013).

A vér nyomáskezelése és annak felhasználása egy kevésbé kutatott téma. Kimutatták, hogy a vér 400 MPa-on való 15 perces kezelése jelentős javulást okozott a mikrobiológiai minőségben, és nem befolyásolta hátrányosan a színt vagy a fehérjék oldhatóságát (Toldrá et al., 2004). A fehérje és víz rendszereknél, mint amilyen a vér, a HHP kezelés hatására gélképződés léphet fel. A hemoglobin esetében megfigyelték, hogy a kezelési idő befolyásolja a gélstruktúrát (Dumoulin és Hayashi, 1998). A 400 MPa feletti nyomás csökkenti a sertésvér stabilitását, emulgeáló tulajdonságát valamint pH-ját (Parés és Ledward, 2001).

## 2.4 ELEKTROFORETIKUS MÓDSZEREK

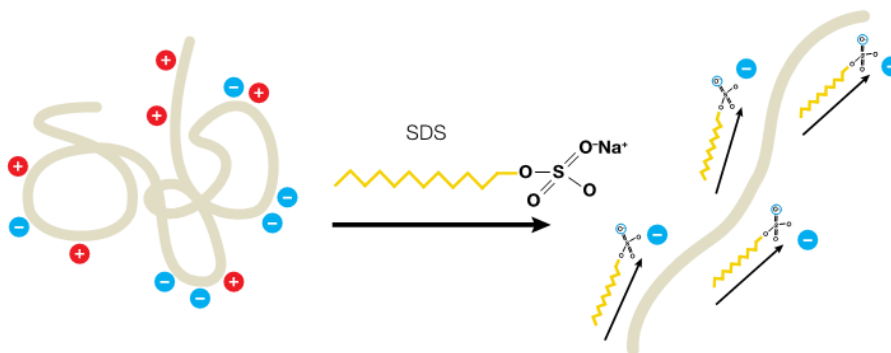
A növényi és állati fehérjék és peptidek vizsgálatában, izolálásában, azonosításában és jellemzésében az elektroforetikus módszerek kiemelkedő jelentőségűek (Szerdahelyi et al., 1995). Az elektroforézis alapja, hogy az elektromos töltéssel rendelkező oldott anyagok árammal létrehozott elektromos mező hatására elmozdulnak. A minta részecskéi lehetnek elektrolitok vagy makromolekulák is. A részecskék sebességét befolyásolja a részecske tulajdonsága, az elektromos tér, a részecske környezetében lévő anyag és a hordozó tulajdonsága (Hajós és Idei, 2001). A molekulák ionizáltsági állapota a futtató puffer pH-jától függ (Ludányi, 2012). A hordozó tulajdonsága alapján többfajta elektroforetikus módszer létezik, ennek egyik fajtája a poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE), melyet a vizsgálataim során is alkalmaztam. A peptidek és fehérjék gélelektroforézissel való elválasztása során a molekulák mérete és töltése egyaránt számít. A folyamat sematikus ábráját láthatjuk a 3. ábrán.



**3. ábra.** A fehérjék elektroforetikus elválasztásának sematikus ábrája poliakrilamid gélen

Forrás: (www.bio-rad.com)

Az SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfát tartalmú gél, másnéven Laemmli-féle SDS-gél) egy olyan elektroforézis módszer, melynek során a fehérjéket molekulatömeg szerint választjuk szét. Ez azért lehetséges, mert a fehérjemolekulákat az SDS negatív töltéssel vonja be, így elvesztik eredeti töltésüket, és elsődlegesen csak molekulatömegük szerint vándorolnak. Az SDS hatását figyelhetjük meg a 4. ábrán.



**4. ábra.** Az SDS hatása a fehérje konformációjára és töltésére

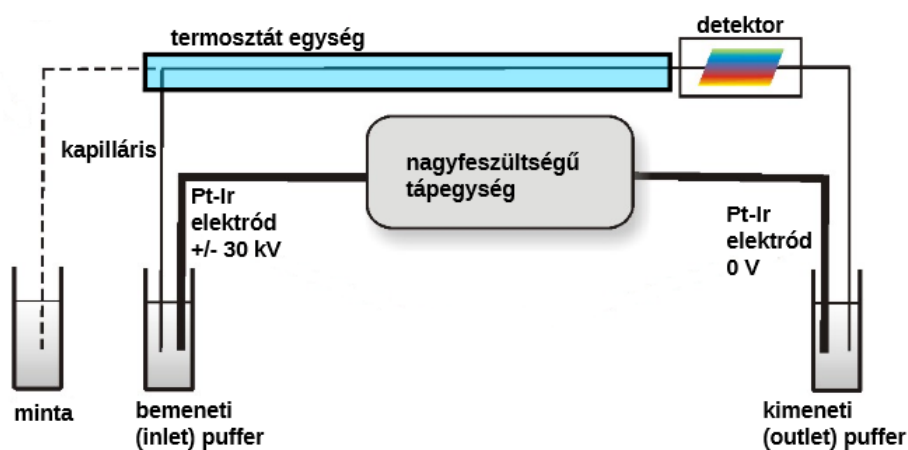
Forrás: (www.bio-rad.com)

Az izoelektromos fókuszálás (IEF) során - mely szintén az elektroforetikus módszerekhez tartozik - a fehérjék izoelektromos pontjuk alapján válnak el, tehát ennél az elválasztásnál pH gradiensben lejátszódó elektroforézisről beszélünk. A technika nem függ az elválasztás idejétől, megbízható és jó felbontású eredményt ad (Jánosi, 2006). Az elektroforetikus

módszereket a húskutatásban elsősorban idegen fehérjék kimutatására, valamint az állatfajok azonosítására használják. Ezenkívül az izomfehérjéknek az egyes ipari technológiák hatására bekövetkező, és a húsminőséggel összefüggő változásainak kimutatására és nyomonkövetésénél is sikerrel alkalmazzák (Szerdahelyi, 2000). A különböző típusú fehérjékhez eltérő festési módszert alkalmazhatunk. Összfehérjefestésnél kékfestést vagy ezüsfestést, specifikus festésnél pedig mioglobinfestést vagy vas-festést alkalmazhatunk. A mioglobinfestés a hem fehérjékre specifikus, míg a vas-festés a nem hem eredetű fehérjékre.

## 2.5 KAPILLÁR ELEKTROFORÉZIS

Biológiai mintáknál előnyös a kapillár elektroforézis használata, mert magas az elválasztási hatékonysága, reprodukálható, nagy szelektivitással bír, kevés minta elegendő, valamint a beinjektálás előtt minimális a minta előkészítése (Zinellu et al., 2011). Az eljárás lényege, hogy a pufferrel töltött kapillárisban a minta komponensei a tömeg/töltés arány különbségből adódó, látszólagos mozgékonyaságukban mutakozó különbség alapján válnak el. A minták heterogenitásából adódó különbségek miatt a részecskék más sebességgel vándorolnak, így vándorlási idejük eltérő, és így elkülönülve érnek a detektorhoz (Idei és Hajós, 2001). A kapillár elektroforézisben sokféle detektálási módszert alkalmaznak, ilyen például a látható (VIS)-, ultraibolya (UV)-, fluoreszcens vagy lézer fluoreszcens stb. A legtöbbet alkalmazott és legelterjedtebb az UV detektálás (Hajós, 1993). A rendszer hőmérséklete automatikusan szabályozott. A kapillár elektroforézis rendszer sematikus ábráját az 5. ábrán láthatjuk.



5. ábra. Kapillár elektroforézis rendszer sematikus ábrája

(Forrás: <http://gytk.sote.hu>)

## 2.6 FEHÉRJEDENATURÁCIÓS VIZSGÁLATOK

A fehérjedenaturációs (DSC) vizsgálatok során a minta és a referencia közötti hőáram-különbséget regisztráljuk. A mérési jel az elnyelt vagy a megjelent energia milliwattban (mW). A vizsgálat képes az exoterm és endoterm folyamatok meghatározására, valamint közvetlenül tudja követni a fehérjedenaturációs folyamatokat (Dergez et al., 2006). A DSC rendszer stabil, mely azonos beállítási paraméterek mellett a biomolekuláknál egyedi mintázatot eredményez. Humán gyógyászatban onkológiai célokra egyre gyakrabban alkalmazzák, mivel fehérjékben a termodinamikai fázisátalakulások jól követhetőek (Zapf et al., 2011). A DSC görbék kiértékelésekor a csúcsok alakja és hőmérséklete az anyagok azonosítására, míg a görbe alatti terület a mennyiségi értékelésre használható fel.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Táplálkozástani szempontból az egyik legfontosabb élelmiszer összetevők a fehérjék, azonban a technológiai folyamatok befolyásolhatják szerkezetüket és tulajdonságaikat. Kísérleteim során célomul tűztem ki, hogy megismerjem a nagy hidrosztatikus nyomáskezelés hatásait a hús- és vérfehérjékre. A nagy hidrosztatikus nyomáskezelés alkalmas lehet az élelmiszerek eltarthatóságának növelésére, azonban tisztában kell lennünk a kezelés hatására bekövetkező változásokkal, valamint azzal, hogy oxidáció vagy denaturáció játszódik-e le a folyamat során. Ezen változások megismerése céljából az alábbi feladatokat tűztem ki célul:

- Marhahús és különböző vérminták nagy hidrosztatikus nyomáskezelése, és a kezelés hatására bekövetkező színváltozás nyomon követése.
- A hús- és vérfehérjék változásainak megfigyelése poliakrilamid gélelektroforézis valamint izoelektromos fókuszálás segítségével.
- Vérfehérjék termodinamikai fázis átalakulásainak nyomon követése fehérjedenaturációs vizsgálatok elvégzésével.
- A hús színét és minőségét befolyásoló imidazol dipeptidek tartalmának (karnozin és anszerin) a nyomáskezelés hatására bekövetkező mennyiségi változásainak követése kapillár elektroforézis vizsgálattal.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 KÍSÉRLETEK HELYE

A kísérleteket a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Karának Hűtő- és Állattermék Technológia Tanszékének laboratóriumában, valamint a NAIK Élelmiszertudományi Kutatóintézetének Biológia Osztályán végeztem.

### 4.2 ANYAGOK

A mérésekhez használt húst (marhahátszín), a nyomáskezelés napján frissen kereskedelmi forgalomból szereztem be. A húst a mérés helyszínére hűtőlánc megszakítása nélkül hűtőtáskában lett szállítottam, majd a mérésekhez szükséges adagokra osztottam.

A vérmintákat a családi gazdaságunk szarvasmarhaállományából, személyesen vettem le. A pontosabb eredmények elérése érdekében a vérminták egy állatból származnak. A tehén fajtája magyartarka, kora 6 év. A nyomáskezelés hatásainak elemzése valamint az összehasonlíthatóság érdekében különböző módszereket és alvadásgátlókat használtunk. Az alvadásgátlók között szerepelt EDTA (etilén-diamin-tetra-ecetsav) tartalmú valamint lítium-heparin tartalmú is. Ezen felül méréseket végeztünk alvadt vérrel, és sertés vérrel is.

### 4.3 MÓDSZEREK

#### 4.3.1 HHP

Nyomáskezeléseink során a Hűtő- és Állattermék Technológia Tanszék laboratóriumában lévő Resato FPU-100-2010 típusú berendezést használtam. Az eljárással szilárd és folyékony halmazállapotú ételek tartósíthatóak, melyek víztartalommal rendelkeznek és légbuboréktól mentesek. A kezelés során előnyt jelent, ha az élelmiszer nagy savtartalommal rendelkezik.

A berendezés lelke a nyomástartó edény, melybe nyomásközvetítő folyadékot töltenek. Ez lehet víz vagy valamilyen más közvetítő közeg, amely az egészségre nem ártalmas. A termék, melyet kezelni kívánunk általában már végső csomagolásában kerül a tartályba. A csomagolásnak légmentesnek kell lennie, valamint ellen kell állnia a nyomás hatására a

termékben bekövetkező térfogatváltozásnak. A minta behelyezése után a zárószervezet segítségével biztosítjuk a tökéletes tömítést. A berendezés a nyomásemelő szivattyú segítségével növeli a nyomást. A nyomás az irányítópanel segítségével a kívánt értékre állítható. A nyomástartomány függ a berendezés paramétereitől. A kezelés időtartamát beállíthatjuk, valamint nyomon követhetjük a berendezés belsejében mért hőmérsékletet is. A minták a gépbe való behelyezés előtt vákuum csomagolva és fóliázva lettek. A mintákat egységesen 5 perces nyomáskezelésnek vettem alá, úgy hogy a nyomásnagyságot 100 MPa-tól 100 MPa-onként 600 MPa-ig növeltem. A Resato FPU-100-2010 típusú berendezést a 6. ábrán láthatjuk.



**6. ábra.** Resato FPU-100-2010

#### 4.3.2 SZÍNMRÉS

Színmérésemhez MINOLTA CR-400 típusú tristimulusos színmérő készüléket használtam. A készülék által megadott három adat  $L^*$ ,  $a^*$  és  $b^*$  segítségével lehet következtetni a mintáim színváltozására. Az  $L^*$  a világossági tényező, mely 0 és 100 közötti értéket vehet fel.  $a^*$  értékei pozitív értéknél a vörös, negatív értéknél pedig a zöld színezet jellemzői, míg  $b^*$  pozitív értéknél a sárga, negatív értéknél pedig kék színezet jellemzői. A húsmintáknál az egyes húsok a HHP kezelés előtt és után is le lettek mérve, hogy a statisztikai kiértékelésnél pontosabb eredményt kaphassak. Mivel a vérminták homogének voltak ezért ott külön kontroll mintákhoz viszonyítottam a változást.

#### 4.3.3 A VÉR SZEPARÁLÁSA

A vér vérszérumba és alakos elemekre (vörösvértestekre) való szétválasztását az alábbi receptura alapján végeztem: 10µl vérhez 40µl 0,1 M-os NaCl oldatot adagoltam, melyet rövid, pár másodperces vortexezés követett. Ezt követően 3 percig 6500 fordulaton centrifugáltam. A keletkező felülúszó alkotta a vérszérumot. A csapadékhoz 40µl 0,065 M-os KCl oldatot adagoltam. 5 percig vortexeltem, majd 5 percre 13 000 fordulaton centrifugáltam. A keletkező felülúszó alkotta az alakos elemeket (Hamilton és Kickler, 2007).

#### 4.3.4 MIOFIBRILLÁRIS ÉS SZARKOPLAZMA FEHÉRJÉK IZOLÁLÁSA

A kontroll és a nyomáskezelt húsmintákat első lépésben kutter segítségével aprítottam. A kellően homogénezett mintákból bemértem 1g mintát műanyag mintatartókba. A mintákhoz 2 ml 0,05 M-os NaCl oldatot adtam, és 3x1 percig fél perces szünetekkel homogenizáltam (Ultra-Turrax T25) 13 500 fordulatszámra (jeges hűtés mellett). A keletkezett homogén szuszpenziót 15 percig 10 000-es fordulatszámra centrifugáltam (Beckman, J2-21). A létrejött felülúszó tartalmazza a szarkoplazma fehérjéket, melyet a további vizsgálatok elkezdéséig fagyasztószekrényben tároltam.

A miofibrilláris fehérjék kinyeréséhez a csapadékot kétszer 0,05 M-os NaCl oldattal kimostam és 15 percig 10 000 fordulatszámra centrifugáltam. A centrifugálás után visszamaradt felülúszót eltávolítottam, és a csapadékhoz 0,7 M-os NaCl oldatot adagoltam és 2x0,5 percig homogenizáltam az Ultra-Turrax segítségével. A homogenizálást követően 15 percig centrifugáltam, és a keletkezett felülúszót leszedtem, amely a miofibrilláris fehérjéket tartalmazta. A további vizsgálatok elkezdéséig fagyasztószekrényben tároltam az oldatokat.

#### 4.3.5 IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS

Vékonyréteg izoelektromos fókuszálás során első lépésként elkészítettem az agaróz gél. A gél 12 x 12 cm nagyságú. Elkészítéséhez az alábbi összetevők szükségesek:

- 1,69 g D(-) szorbit
- 0,14 g agaróz
- 17ml desztillált víz

Az előállított keveréket 30 percig lefedve vízfürdőn forraltam, majd hozzáadtam 834 µl 5-8 pH tartományú amfolitot (Servalit). A kész keveréket a gel-bond film hidrofil oldalára öntöttem, és hagytam megszilárdulni. A mintákat műanyag felvivőcsík segítségével juttattam a géltre. A húsmintákból desztillált vizes kinyerést készítettem, melyeket hígítás nélkül vittem fel. Standard-nek ló mioglobint tartalmazó oldatot alkalmaztam. A vérmintákból a már előzőleg ismertetett szeparálási eljárásból kinyert vészérumot és az alakos elemekből álló oldatot szintén hígítás nélkül vittem fel. A gél két szélére anód és katód oldattal átitatott szűrőpapír csíkot helyeztem. Az anód (+) oldat 1%-os H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldat, (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%-os) a katód (-) oldat 2%-os etilén-diamin oldat. A minta felvitele után a berendezés tetejét rögzítettem, és beállítottam a fókuszálás paramétereit. A feszültség paramétereinek változtatását a 3. táblázat mutatja.

### 3. táblázat. Feszültség paraméterek

| Feszültség<br>(V) | Idő<br>(perc) |
|-------------------|---------------|
| 50                | 20            |
| 100               | 10            |
| 200               | 20            |
| 400               | 30            |
| 600               | 20            |
| 800               | 30            |
| 1000              | 20            |

A mérés leteltével a gél un. pszeudoperoxidáz vagy másnéven mioglobinfestésnek vagy vetettem alá. A folyamat során a pI-juk alapján elvándorolt fehérjék barnás-vörös színezetet vesznek fel. A festéshez használt oldatot az alábbi receptura alapján én állítottam össze:

- 9 ml O-dianizidin oldat (33 mg O-dianizidin 10 ml etanol oldatban)
- 21 ml frissen készített foszfát puffer (2,02 g citromsav 1 hidrát; 7,16 g di-nátrium-hidrogén-foszfát 12 hidrát, 100ml-re desztillált vízzel töltve, pH 5,0)
- 600µl 30%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Miután a gél kellően megfestődött átraktam desztillált vízbe, megakadályozva a kiszáradását. A berendezésről a 7. ábrán láthatunk képet.



**7. ábra.** Pharmacia ECPS 3000/150 készülék

#### 4.3.6 SDS POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS

Az SDS-PAGE gélek a fehérjék molekulatömeg szerinti szétválasztására alkalmasak. Az elválasztást a Bio-Rad készülékén végeztem el (MINI PROTEAN II). A gélek főgélből és gyűjtőgélből állnak. A főgél 15%-os míg a gyűjtőgél 6%-os akrilamid gél volt.

A 15%-os főgél összetétele:

- 4 ml 30 %-os akril-amid (30,0g akrilamid és 1g N,N-bisz-akrilamid 100ml re hígítva desztillál vízzel)
- 1,8 ml 2 M-os TRIS (trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán) puffer, /pH 8,8/ a pH beállítását 0,1 M-os sósavval végeztem el.
- 50 µl SDS (10%-os nátrium-dodecil-szulfát oldat)
- 2,06 ml desztillált víz
- 6µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin)
- 50µl perszulfát (frissen készítve, 100 mg ammónium-peroxi-diszulfát és 1ml desztillált víz)

A 6%-os gyűjtőgél összetétele:

- 1,0 ml akrilamid oldat
- 55µl 10%-os SDS

- 660µl 0,5 M-os TRIS puffer, (pH 6,8 ami 0,1 M-os sósav oldattal lett beállítva)
- 3,23 ml desztillált víz
- 6µl TEMED
- 50µl perszulfát

Futtató puffer összetétele szerint 3,03 g TRIS, 14,4 g glicin és 1g SDS. Az összetevők bemérése után 1000 ml-re desztillált vízzel jelre töltöttem. A futtatáshoz használt jelölő festék a futtató pufferből és brómfenolkékből állt.

A minta oldószer 25 ml-re készítve az alábbi összetevőkből állt:

- 0,189g TRIS
- 0,5g SDS
- 21,2 ml desztillált víz
- 2,5 ml glicerin
- 2,5 ml β-merkapto-etanol

A mintát és a mintaoldószert a felvitel előtt 2 percig forraltam, majd a lehűtött mintát vittem fel a géltre. A futtatást átlagosan 60 percig konstans 200V-on végeztem, 45mA-en és 12W-on. A futtatás végeztével fixálás, mosás, festés és újbóli mosás következett. A fixálás 20%-os TCA (tiklór-esetsav) oldatban végeztem 20 percig. Ezt követte a PAGE gélmosó, mely 850 ml desztillált vízből 50 ml ecetsavból és 100 ml etanolból állt. A PAGE gélmosó 15 percig volt a gélen. A mosási fázist követte a gyors kékfestés. A festék 0,2%-os comassie kék (B.B.R-250), mely az alábbi összetevőkből állt:

- 0,2g comassie kék
- 50 ml desztillált víz
- 10 ml ecetsav
- 50 ml etanol

A festés időtartama 15 percet. A felesleges festéket 10%-os ecetsavval mostam ki.

Az eredmények a Gel Doc 2000 valamint a Gel Doc XR berendezéssel dokumentáltam. A Bio-Rad MINI PROTEAN II. készülékről a 8. ábrán látható felvétel.



**8. ábra.** Bio-Rad MINI PROTEAN II

#### 4.3.7 FEHÉRJEDENATURÁCIÓS VIZSGÁLATOK

A kontroll és HHP kezelt vérminták fehérjedenaturációs vizsgálata során a MicroDSC III típusú mikrokalorimétert (9. ábra) használtam. A mintákból megközelítőleg 0,7814 g-ot mértem be a hermetikusan zárt rozsdamentes mintatartókba (a pontos bemért tömeget minden esetben feljegyeztem). A referenciamintának desztillált vizet használtam. Szakirodalmi adatok szerint használt felfűtési sebesség vérmintáknál 2 °C/ perc (Furlán et al.,2011) vagy 3 °C/ perc (Dávila et al., 2007). A méréseim során a pontos eredmények elérése végett 1,5 °C/ perc felfűtési sebesség mellett 5-95 °C közötti hőmérséklet tartományban mértem.



**9. ábra.** MicroDSC III mikrokaloriméter

#### 4.3.8 A KARNOZIN EXTRAKCIÓJA

A karnozin kinyerése a nyers kontroll és HHP kezelt húsmintákból történt. A húsmintákat alaposan kuttereztem, majd 5g húsmintát kimértem. A mintához 10 ml CE tisztaságú vizet adagoltam. Ezt követően a mintákat 2x2 percig jégűtés mellett homogenizáltam (Ultra-Turrax T25) segítségével. A homogén szuszpenziót 10 000-es fordulatszámon 30 percig centrifugáltam 4 °C-on (Beckman, J2-21). A kapott felülúszó részt szűrőpapír segítségével leszűrtem és a szűrletet vízfürdőn (100 °C-on) 10 percig forraltam. A forralás végeztével az oldatot jeges vízfürdőn hűtöttem le. A szobahőmérsékletűre lehűlt oldatot 10 percig 5000 fordulatszámon centrifugáltam és a centrifugálás után visszamaradt felülúszót szűrőpapír segítségével leszűrtem. A kapott szűrlet mennyiségét a további számítások végett feljegyeztem.

A karnozin mennyiségének meghatározását a Bio Focus 2000 típusú kapillár elektroforézis berendezésen (10. ábra) végeztem. Az előzőleg kivont húskivonatból 20µl-t kimértem, és hozzáadtam 80µl puffert (2,5 pH; 100mM sodium phosphate). A berendezésben a beállított hőmérsékletnek minden esetben 38°C-nak kellett lennie. Minden mintát mosási program előzött meg, mely 0,1 M-os NaOH oldat. A zavartalan működéshez a mintáknak buborékmentesnek kellett lenniük. A mérés pontos időtartama 10 perc, ez alatt az idő alatt a berendezés felvette az elektroforetogramokat, melyeket a későbbiek során kiértékeltem.



**10. ábra.** Bio-Rad Bio Focus 2000

#### 4.3.9 KIÉRTÉKELÉS

Az adatok kiértékeléséhez minden esetben az adott eljáráshoz kifejlesztett programot használtam. Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis, denzitométeres kiértékelését a Bio-Rad programjaival a Quantity One 4.3.0 verziójával, valamint az Image Lab 5.1 verziójával végeztem el. A fehérjedenaturációs (DSC) vizsgálatok eredményeinek kiértékelésében a Calisto Processing program 1.08 verzióját használtam.

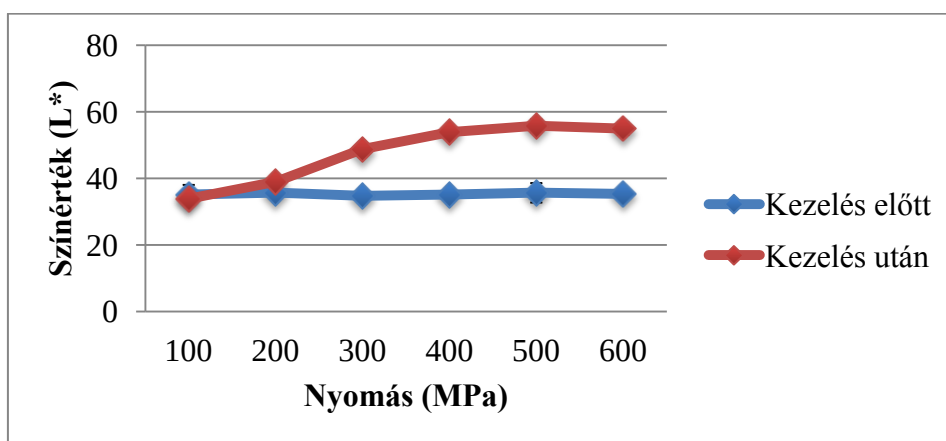
A kapillár elektroforézis adatainak a elemzéséhez a Bio Focus Integrator nevű programot használtam, mely a Bio Focus 2000-es gép saját kiértékelő programja.

Az adatok statisztikai kiértékelését az IBM SPSS Statistics 20. verziójával végeztem.

## 5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

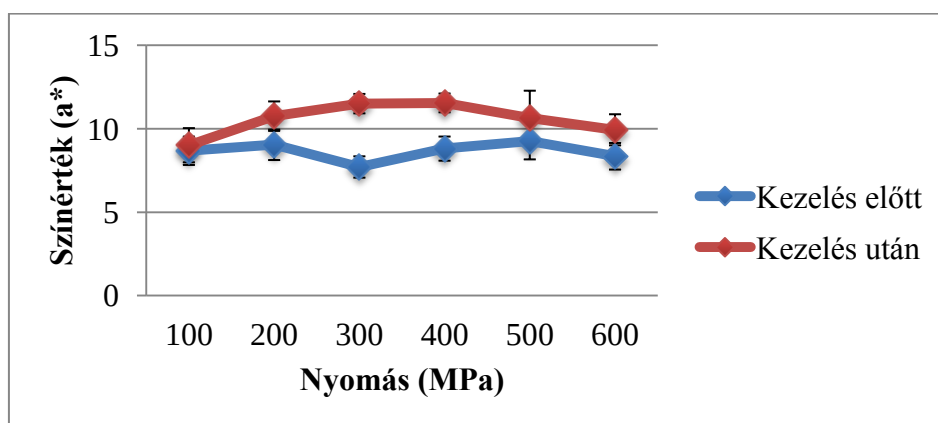
### 5.1 SZÍNMRÉRÉS EREDMÉNYEI

A húsminták a nyomáskezelés hatására kifakultak, szignifikáns változáson mentek keresztül. Ezen megfigyelések alátámasztása végett színméréseket végeztem el. A kezelt és a kezeletlen húsmintáknak az  $L^*$  értékeit az alábbi grafikonokon ábrázoltam.



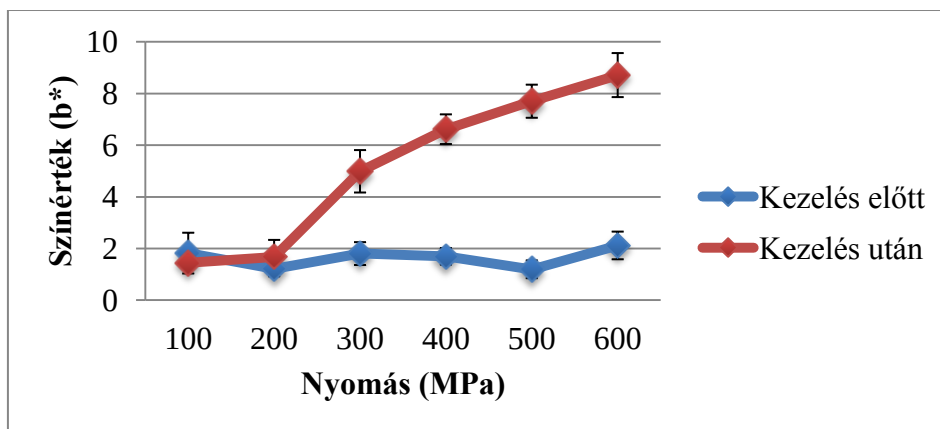
11. ábra.  $L^*$  értékeinek ábrázolása a nyomás függvényében

Megállapítható, hogy az  $L^*$  értékek a kontroll mintákhoz képest emelkedtek, tehát világosodott a húsminta. A grafikonon az is megfigyelhető, hogy 300MPa-os nyomás egyfajta küszöbértékként viselkedett. Az ennél alacsonyabb nyomásnál csak kis változást lehetett észrevenni, míg az ennél magasabbnál még erőteljesebb kivilágosodás észlelhető.



12. ábra.  $a^*$  értékeinek ábrázolása a nyomás függvényében

A 12. ábrán - az előzőhöz teljesen hasonlóan – az  $a^*$  értékek láthatóak. A legfontosabb észrevétel, hogy az  $a^*$  értékek ebben az esetben is a 300 MPa-os kezelésnél nőttek meg a legjobban, viszont az  $L^*$  értékektől eltérően a 400MPa-os nyomás után a színérték csökkenésnek indult.



**13. ábra.**  $b^*$  értékeinek ábrázolása a nyomás függvényében

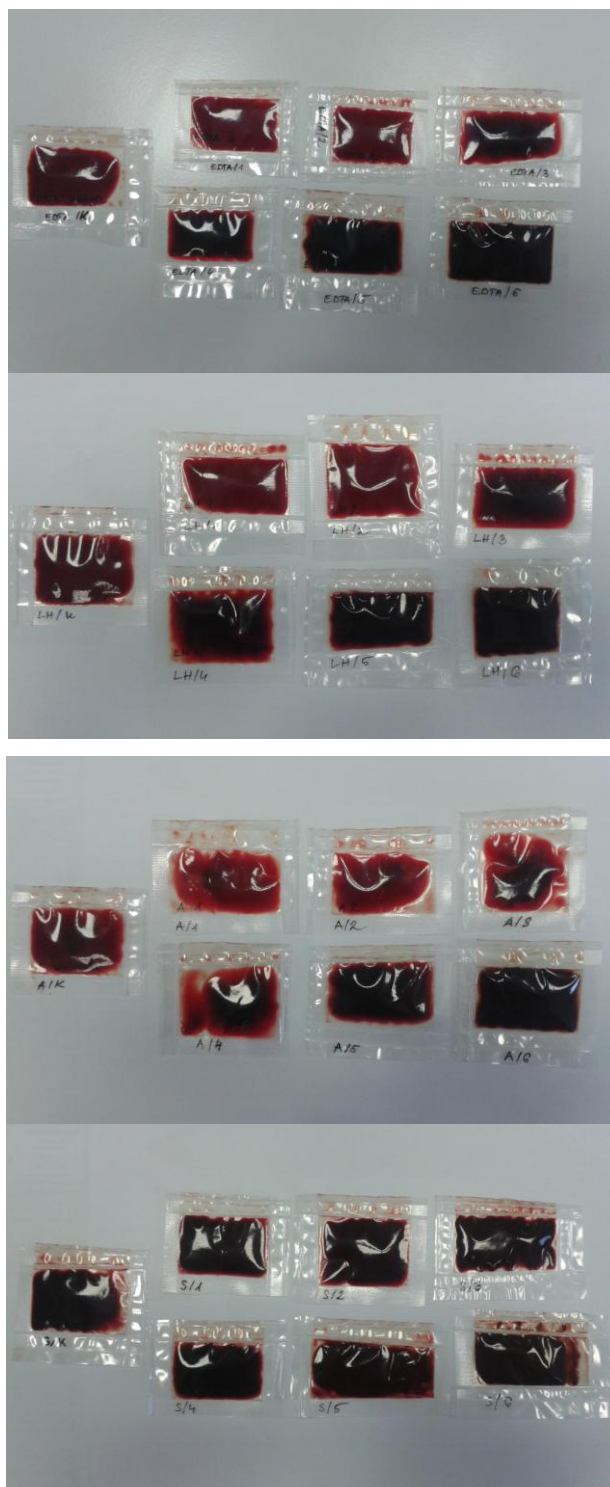
A  $b^*$  színértékeknél megfigyelhető (13. ábra), hogy a változás mértéke nagy, viszont ebben az esetben a 200 MPa-os nyomásérték után egyenletesebb növekedés figyelhető meg.

A változás szemléltetése végett az 14. ábrán láthatóak a kontroll és nyomáskezelt minták.



**14. ábra.** A marhahús minták a nyomáskezelés után

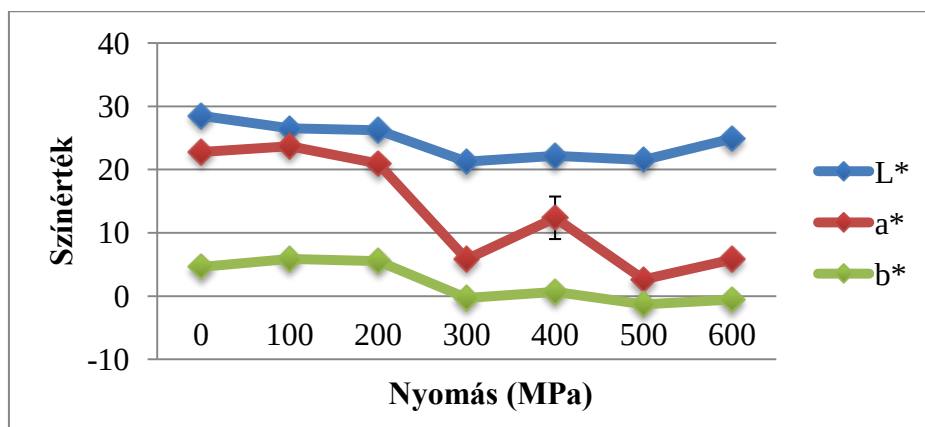
A vér vizsgálata során négy különböző vérminta típussal dolgoztam. A mintáim EDTA és lítium-heparin tartalmú marhavér, valamint marha alvadtvér és sertésvér (kikevert) voltak. Szemléltetés céljából az 15-18. ábrákon láthatóak a nyomáskezelt vérminták fényképei.



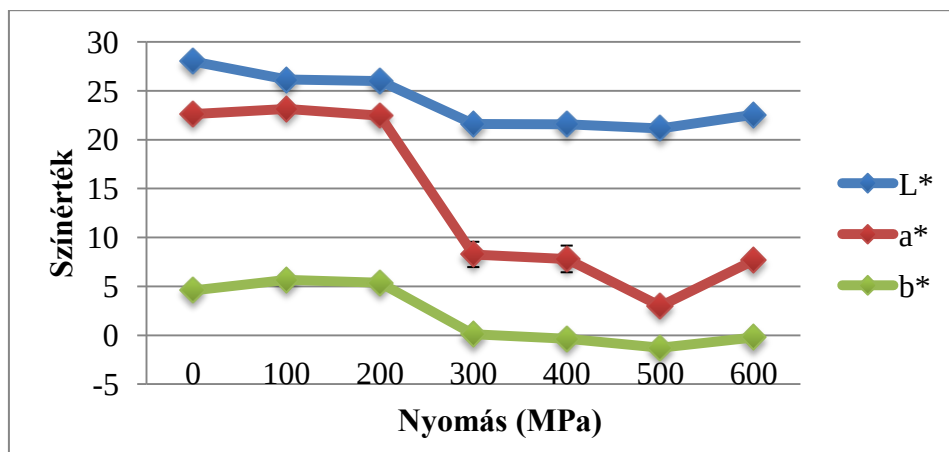
**15-18. ábra.** Nyomáskezelt vérminták (EDTA és lítium-heparin tartalmú marhavér, marha alvadt vér, kikevert sertésvér)

A színeredmények vizsgálata során megfigyelhető, hogy az EDTA, alvadtvér és lítium-heparinos minták szinte teljesen egyformán viselkednek. A kikevert (fibrinszáltól mentes)

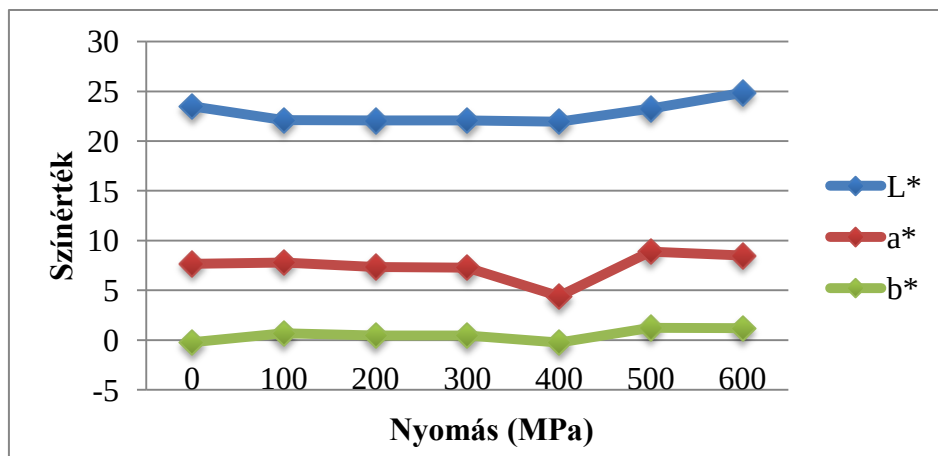
sertésvér ettől teljesen eltérő viselkedést mutatott a kezelés során. Ezekél a mintáknál elmondható, hogy a változás egyenletes volt, a nyomáskezelés nagysága nem befolyásolta nagyban a színértékeket. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a fibrinszálakat eltávolítottuk a mintából. Az EDTA, a lítium-heparinos és alvadt vér minták esetében ugyanazok a változások voltak megfigyelhetőek. A 100 MPa-on valamint a 200 MPa-on végzett kezelés mindhárom mintánál csak minimális színváltozást okozott ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), viszont 300 MPa-on mindegyik színérték nagy mértékben csökkent. A nagy nyomásértékeknél (400MPa, 500MPa és 600MPa) a minták már a 300 MPa-on kezelt mintával voltak szinte megegyezők. Ezeket a megfigyeléseket a következő ábrák illusztrálják.



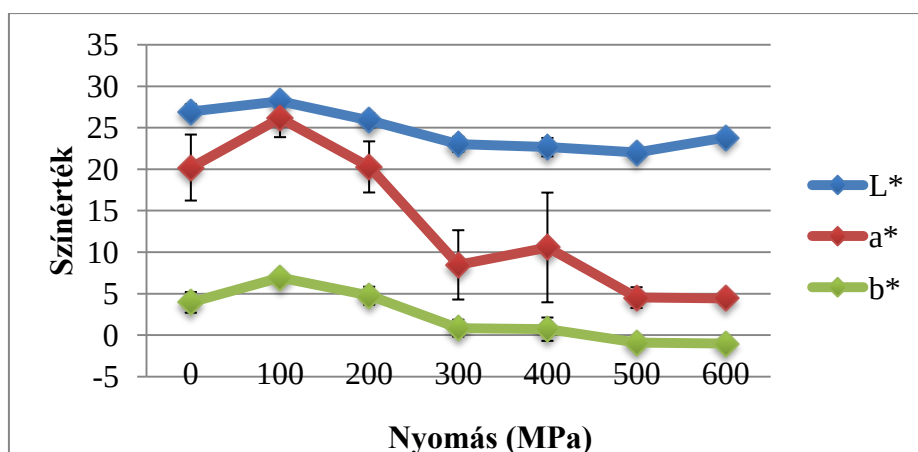
**19. ábra.** EDTA tartalmú vérminta  $L^*$ ,  $a^*$  és  $b^*$  értékeinek ábrázolása a nyomás függvényében



**20. ábra.** Lítium-heparin tartalmú vérminta  $L^*$ ,  $a^*$  és  $b^*$  értékeinek ábrázolása a nyomás függvényében



**21. ábra.** A kikevert sertésvér L\*, a\* és b\* értékeinek ábrázolása a nyomás függvényében

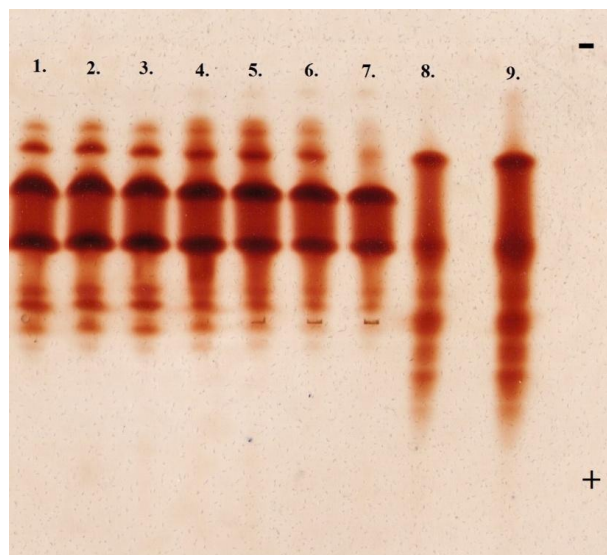


**22. ábra.** A marha alvadt vér L\*, a\* és b\* értékeinek ábrázolása a nyomás függvényében

A színvizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy a vérminták teljesen más metodikát követnek, mint a húsminták. Míg a húsmintáknál világosodást tapasztaltunk, addig a vérminták a HHP kezelés hatására sötétedtek. A kezelés során a vérminták egy jellegzetes barnás-vörös színt vettek fel. A változás azzal magyarázható, hogy a vérben lévő hemoglobin ( $\text{Fe}^{2+}$  tartalmú) oxidáció következtében a HHP kezelés hatására methemoglobinná ( $\text{Fe}^{3+}$ ) alakul. A szakirodalomban tapasztalt oxidációs sötétedéssel megegyeznek az eredményeim (Toldrá et al., 2004). A színeredmények bővebb statisztikai értékelése az 5.6. fejezetben olvasható.

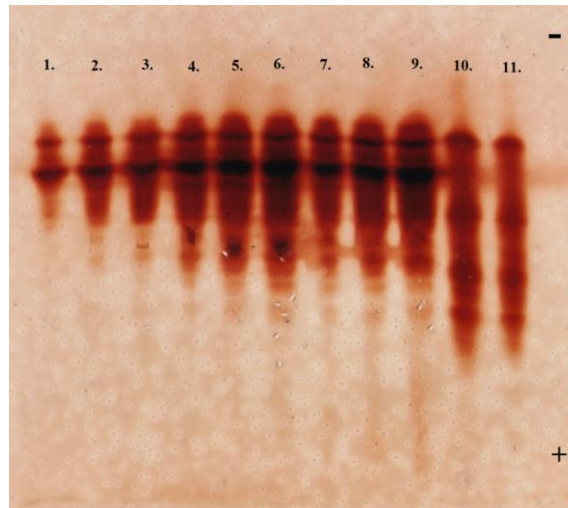
## 5.2 IZOELEKTROMOS FÓKUSZÁLÁS EREDMÉNYEI

Izoelektromos fókuszálás során a gélben pH gradienst alakítunk ki az amfolittal, és ennek értelmében a fehérjék a saját izoelektromos pontjuknak megfelelő helyen állnak meg. Vizsgálataim során megállapítható, hogy mind a húsmintáknál mind pedig a vérmintáknál a hemfehérjék – a marhahústra és vére jellemző – izoelektromos pontoknál mutattam ki a specifikus mioglobinfestéssel (Hoffmann és Blüchel, 1986). A szarvasmarhára jellemző fő mioglobinsávok 7,2; 6,8 és 6,4 izoelektromos pontnál voltak. A gélben a fehérjék pH 5-től pH 8-ig vándoroltak. Vizsgálataim során ló mioglobint tartalmazó standardot alkalmaztam. A 23. ábrán látható a nyomáskezelt hús izoelektromos fókuszálás eredményei.



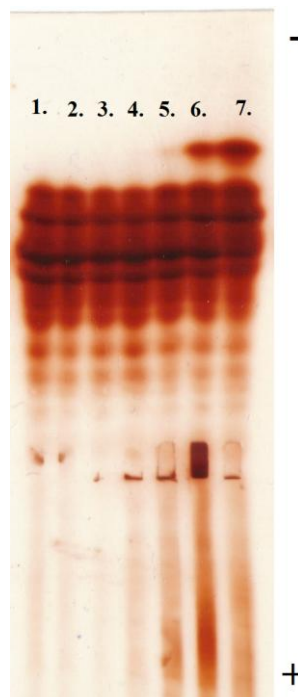
**23. ábra.** A nyomáskezelt húsminták izoelektromos fókuszálás eredményei  
(1. kontroll, 2. 100MPa, 3. 200MPa, 4. 300MPa, 5. 400MPa, 6. 500MPa, 7. 600MPa, 8-9. ló  
mioglobin standard)

Amint az ábrán is látható a nyomáskezelés hatására a sávok intenzitása kismértékben csökkent, ami arra utal, hogy a mioglobinfehérjék a HHP kezelés hatására kismértékben denaturlódtak. Ez onnan tudható, hogy a denaturlódott mioglobint nem lehet a specifikus (mioglobin) festéssel festeni, mivel már elvesztette aktivitását. A 24. ábrán a kontroll vérminták izoelektromos fókuszálás eredményei láthatóak.



**24. ábra.** Kontroll vérminták izoelektromos fókuszálás eredményei  
(**1-3.** Vércsérum, **4-6.** Alakos elemek, **7-9.** Négyszeresen hígított vér, **10-11.** ló mioglobinszstandard)

Az ábrán látható a kontroll vér izoelektromos fókuszálással végzett elválasztása. Látható, hogy a szeparálási eljárás (4.3.3 fejezet) sikeres volt, mivel a hemoglobin a második felülúszó (alakos elemek) frakcióban jobban dúsult, valamint izoelektromos pontjának (6,9) megfelelő helyen volt.

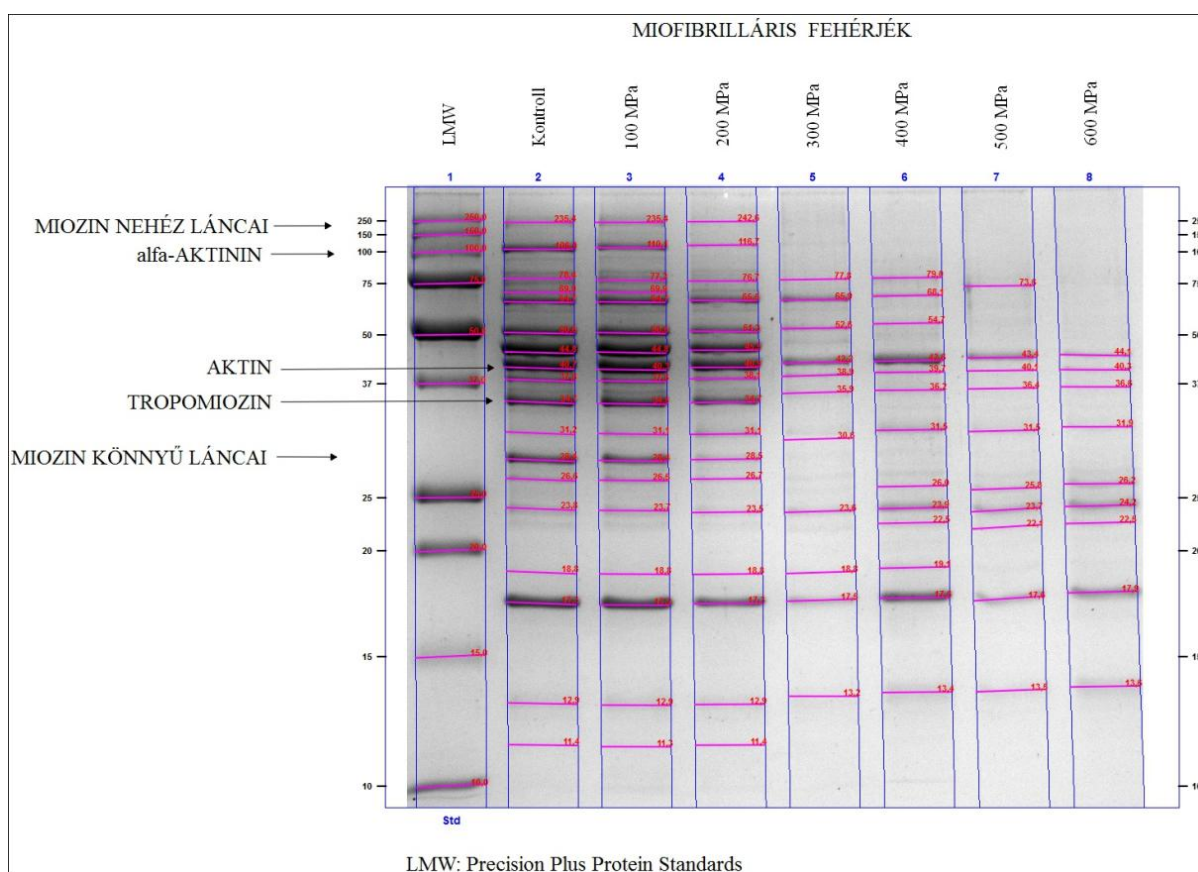


**25. ábra.** A nyomáskezelt vérminták (EDTA) izoelektromos fókuszálás eredményei  
(**1.** kontroll, **2.** 100MPa, **3.** 200MPa, **4.** 300MPa, **5.** 400MPa, **6.** 500MPa, **7.** 600MPa)

A 25. ábrán láthatóak a nyomáskezelt vér izoelektromos fókuszálás eredményei. Megállapítható, hogy míg egyes sávok intenzitása csökkent, addig megjelentek új sávok is. A sávok intenzitásának csökkenése – ami a denaturáció jele – a HHP kezelés hatására kismértékű. Elmondható, hogy csak a nagy nyomáson kezelt, a 400 MPa, 500 MPa és a 600 MPa-on kezelt mintáknál jelentek meg új sávok. Az új sávok jelenléte a bomlástermékek megjelenésére, valamint átalakulásra utal.

### 5.3 SDS-PAGE EREDMÉNYEK

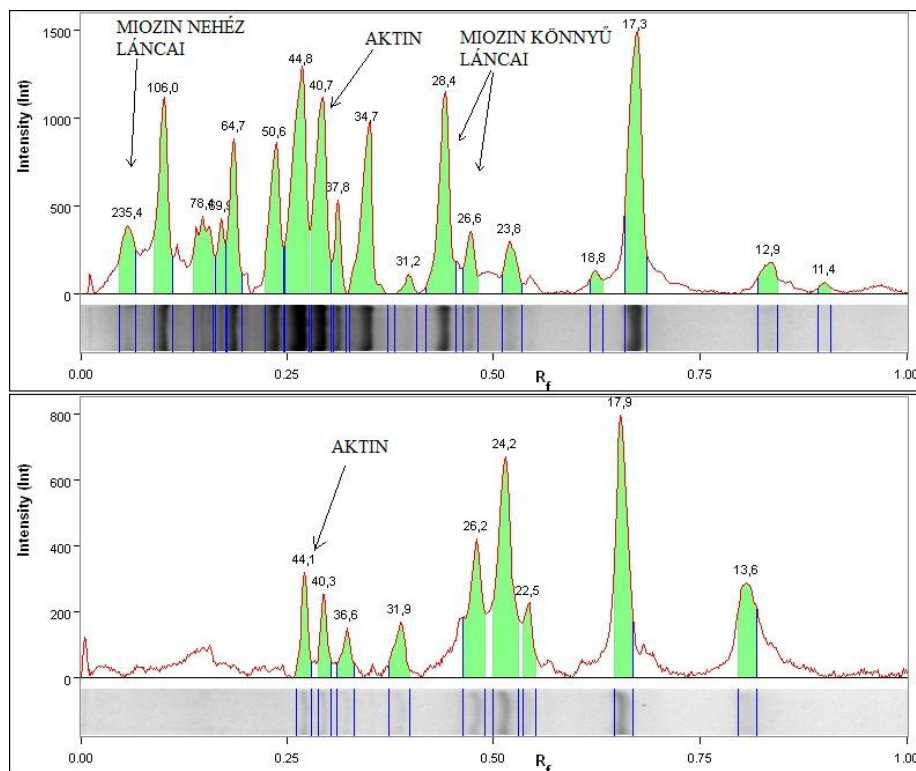
A húsmintáknál és a vérmintáknál különböző kinyeréseket készítettem annak érdekében, hogy a fehérjék jól elkülönüljenek. A 26. ábrán a miofibrilláris fehérjék SDS poliakrilamid gélelektroforézis eredménye látható.



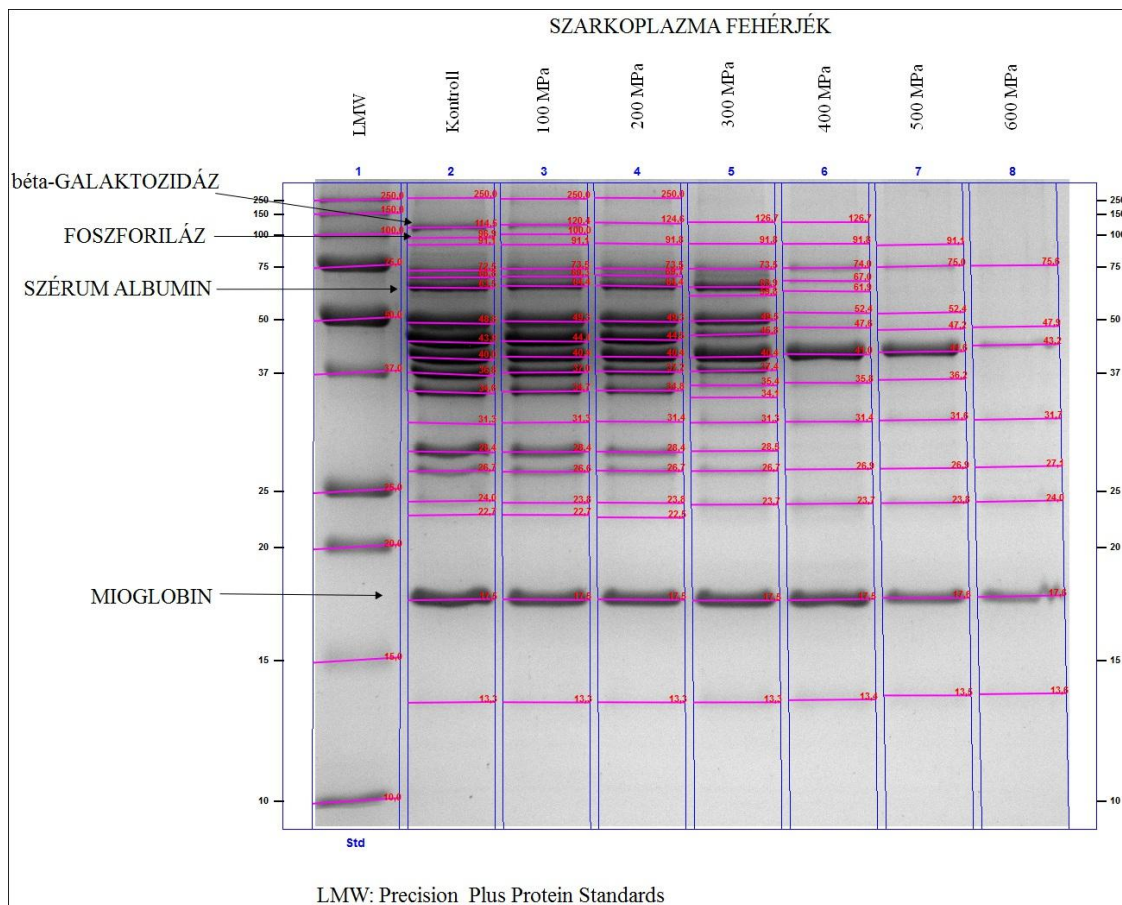
**26. ábra.** A miofibrilláris fehérjék SDS poliakrilamid gélelektroforézis elválasztási képe

A miofibrillumot legnagyobb mennyiségében (54%) alkotó fehérjéje a miozin. Két nehézlánc és három könnyűlánc van (Gasztonyi és Lásztity, 1993). Az ábrán látható, hogy a nyomáskezelés hatására a gél sávjain jelentős intenzitáscsökkenés tapasztalható. Az intenzitáscsökkenés a HHP kezelés hatására bekövetkező aggregáció és denaturáció eredménye. A denaturálódott fehérjék oldhatósága csökken, ezért nem tudjuk őket bevinni a gélbe. Megállapítható, hogy a fehérjesávok intenzitásának jelentős csökkenése a 300 MPa feletti nyomásértékeknél következik be. A miozin nehéz és könnyű láncainak sávjai a nyomáskezelés hatására 300 MPa és afeletti nyomásértékeknél eltűnnek, tehát kijelenthető, hogy ezen fehérjék érzékenyek a HHP kezelésre. Azonban amint a képen is látható a 42 kDa molekulatömeggel rendelkező aktin sávja ugyan intenzitásban csökkent, de végig a 600 MPa-os nyomásértékeknél is kimutatható. Ennek tudatában megállapítható, hogy az aktin a nyomáskezelésnek viszonylag jól ellenálló.

A sávok intenzitásának (mennyiségének) csökkenését szemlélteti a következő ábra (27. ábra). A felső képen látható a kontroll minta sávjai, míg az alsón a 600 MPa-on kezelt húsminta sávjai. Szemmel látható, hogy jelentős a változás. A sávok főként a nagyobb molekulatömeggel rendelkező fehérjéknél tűntek el.



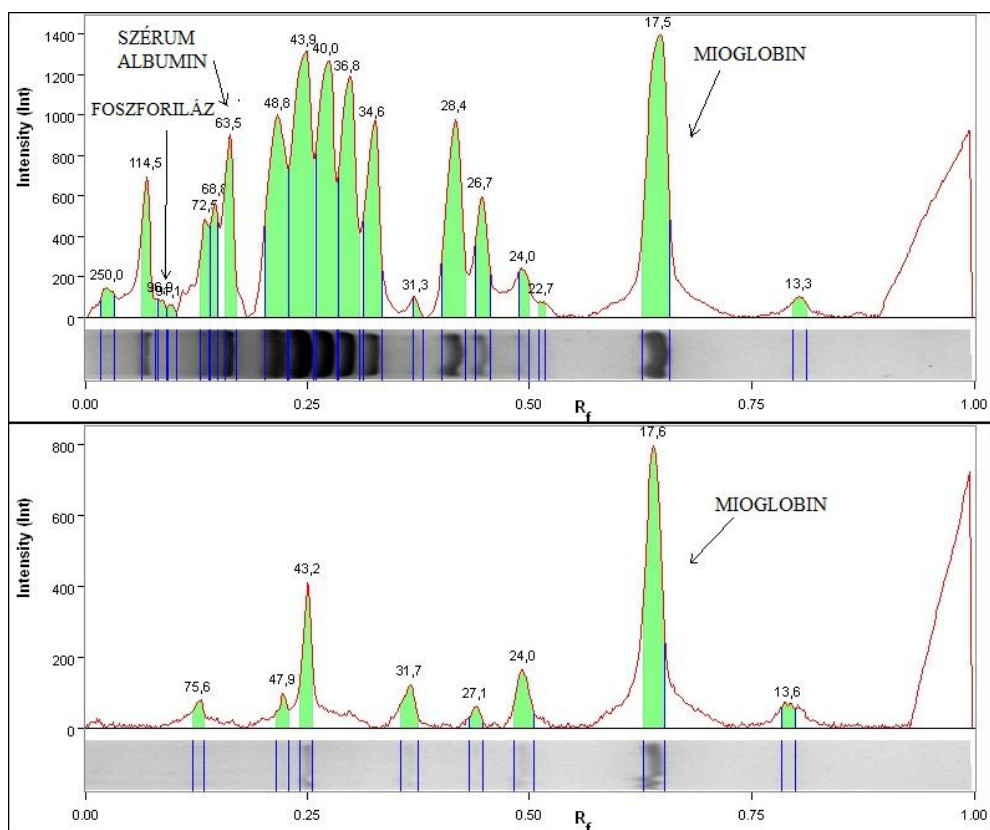
**27. ábra.** Miofibrilláris fehérje sávjainak csökkenése (kontroll, 600MPa)



**28. ábra.** Szarkoplazma fehérjék SDS poliakrilamid gélelektroforézis elválasztási képe

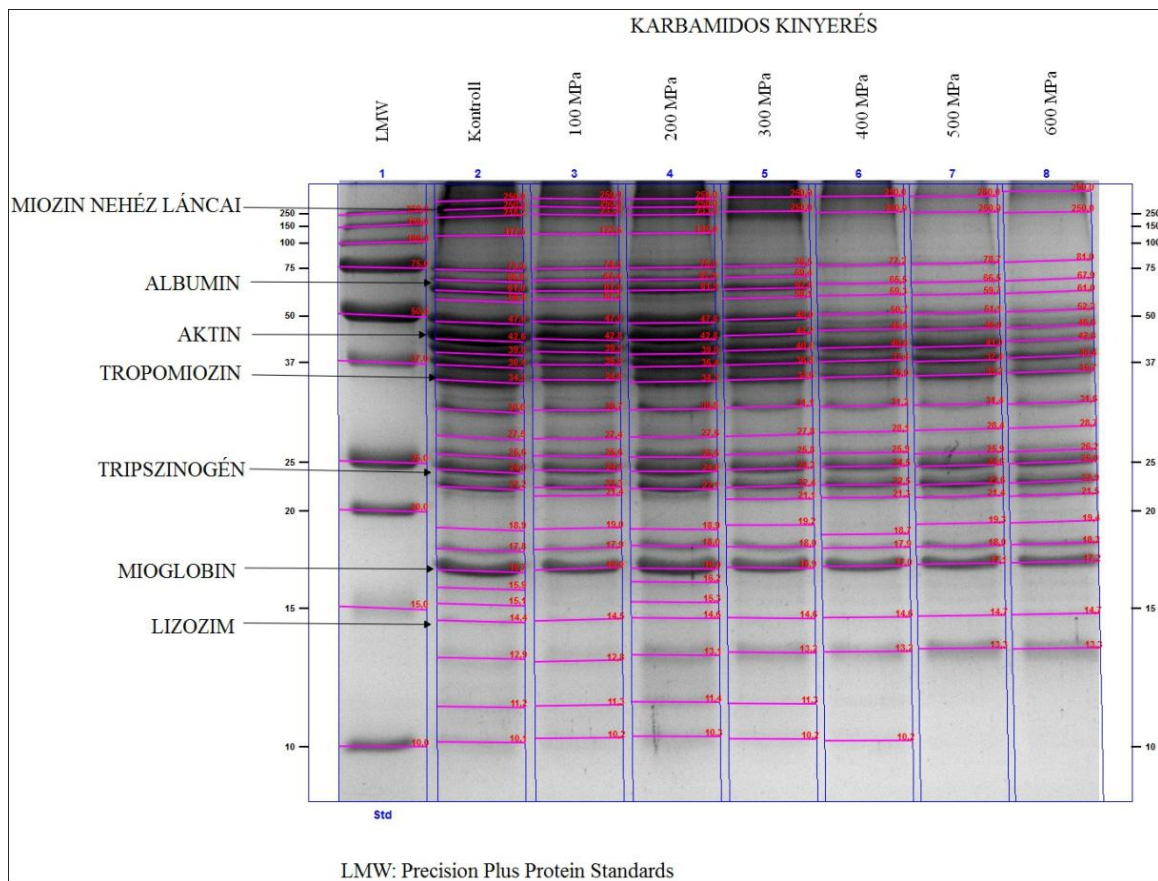
A 28. ábrán a szarkoplazma fehérjék SDS poliakrilamid gélelektroforézis eredménye látható. A szarkoplazma oldható fehérjei a sejt fehérjeinek nagy hányadát képezik. A szarkoplazma fehérjék nagy része enzim, melyek energiatermelő folyamatokat katalizálnak. A szarkoplazma fehérjék egyik legjelentősebb fehérjéje a mioglobin, mely a húsok színét adja, így élelmiszeripari szempontból kiemelten fontos. Amint az ábrán látható a fehérjesávok intenzitása jelentősen csökkent a nyomáskezelés hatására a nyomás növelésével. A 60-70 kDa molekulatömegek között találjuk az albuminokat. Látható, hogy a nyomáskezelés hatására az albuminok sávjainak jelentős része eltűnik 400 MPa-nál valamint annál nagyobb nyomásértékeknél. 30 kDa és 60 kDa között találjuk a többek között a glükózlebontás és az energiatermelés fontos enzimeit, melyeknek intenzitása jelentősen csökken. Megállapítható, hogy a 16,9 kDa molekulatömegnél található mioglobin intenzitása csupán kismértékben csökkent, tehát stabil, jól ellenáll a nyomáskezelésnek. Az eredmények teljes mértékben megegyeznek az izoelektromos fókuszálás során tapasztaltakkal.

A 29. ábrán láthatjuk a kontroll és a 600 MPa-nál kezelt minták (szarkoplazma fehérjéinek) intenzitás csökkenését.



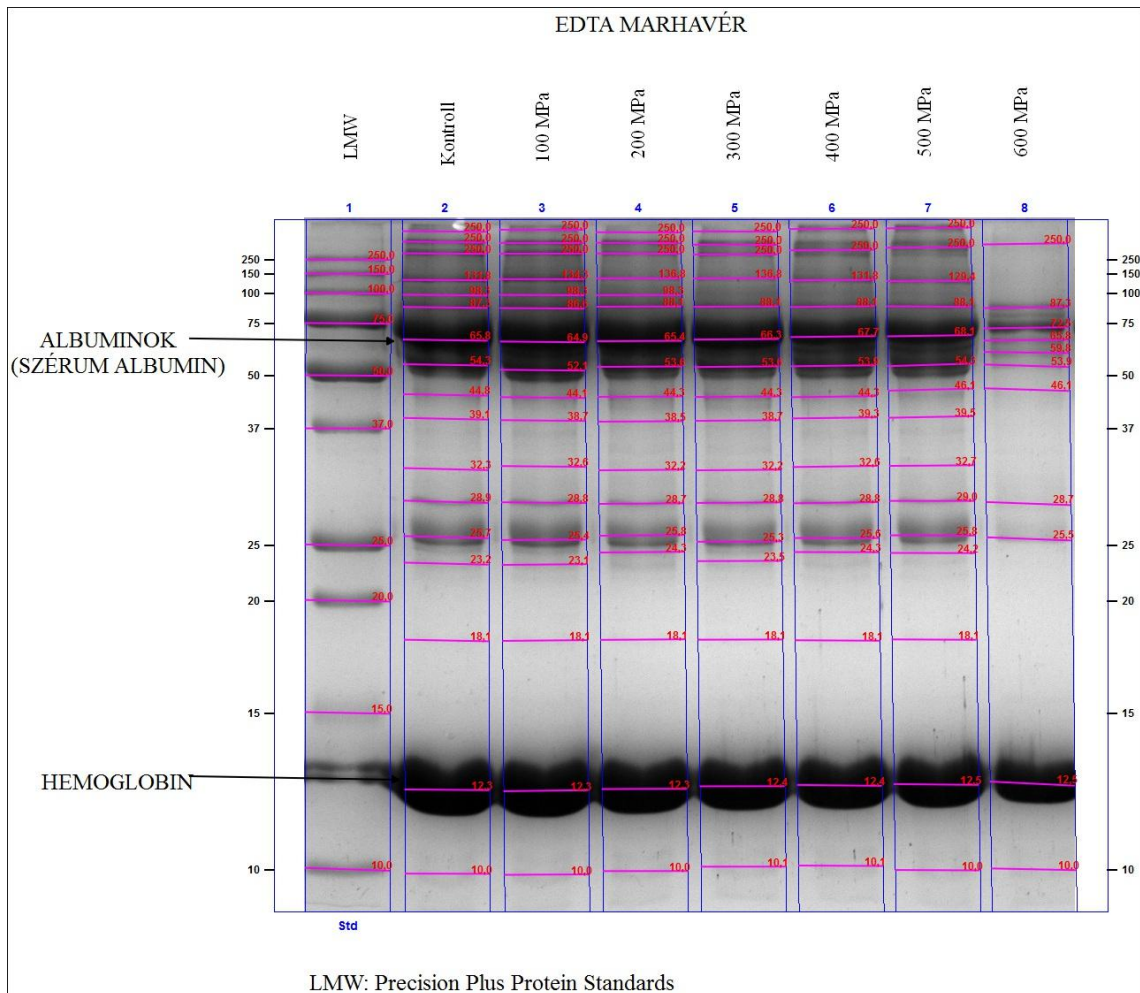
**29. ábra.** Szarkoplazma fehérjéinek intenzitás csökkenése (kontroll, 600MPa)

Az ábrákon látható, a nagy nyomásértékeknél a szarkoplazma fehérjék jelentősen denaturálódnak és aggregálódnak.



**30. ábra.** A nyomáskezelt húsfehérjék karbamidos kivonatának SDS-PAGE elválasztási képe

A 30. ábrán látható a húsfehérjék karbamidos kivonatának SDS-PAGE elválasztási képe. A karbamidos kivonás során a húsból lévő összes fehérje kivonható, melynek eredményeként azonosításuk, változásuk könnyebben nyomonkövethetőek. Megfigyelhető, hogy a HHP kezelés hatására a sávok intenzitása csökken. Azonban látható, hogy az előző miofibrilláris és szarkoplazma gélekhez képest sokkal kisebb a sávok csökkenése. Ez a jelenség arra utal, hogy a HHP kezelés hatására aggregációs folyamatok mentek végbe, amely a karbamidos kinyeréssel visszaalakíthatók.

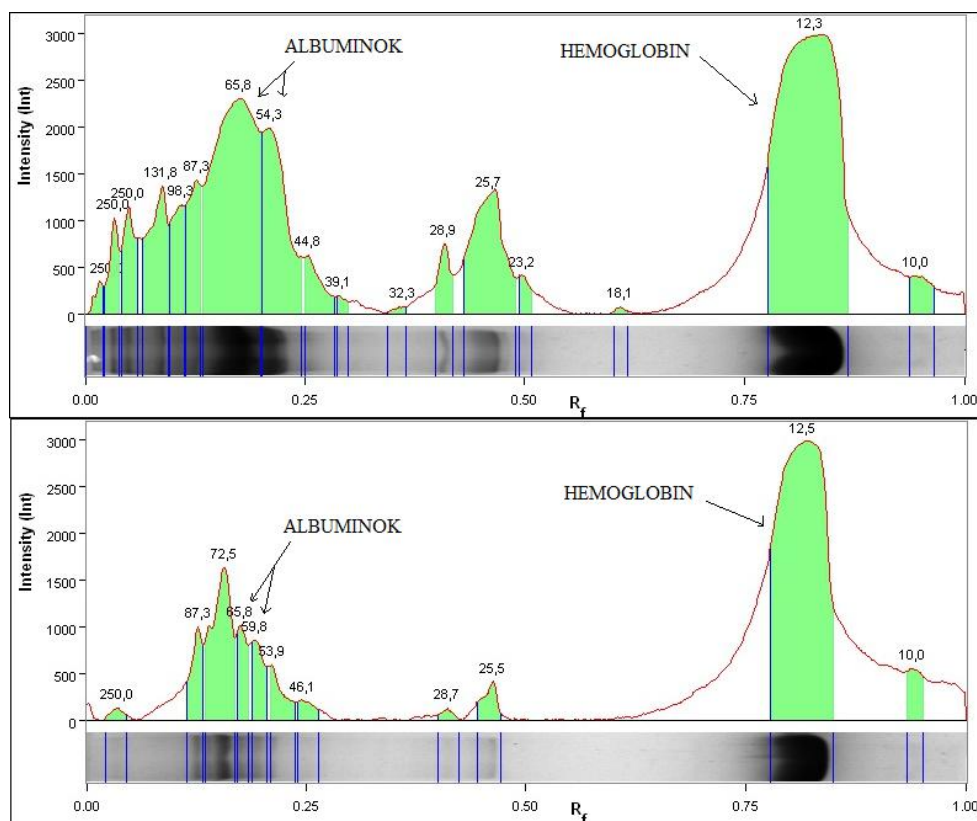


**31. ábra.** EDTA tartalmú vérminták SDS-PAGE elválasztási képe

Az 31. ábrán láthatjuk az EDTA tartalmú vérminták SDS-PAGE elválasztási képe. Megfigyelhető, hogy a húsmintákkal szemben itt nem volt olyan nagy mértékű a fehérjék sávjainak csökkenése. A legnagyobb nyomásértéken a 600 MPa-on tapasztalható a nagyobb mértékű denaturáció és aggregáció. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy a vérfehérjék jobban ellenállnak a nyomáskezelésnek mint a húsfehérjék. A vérfehérjék legfontosabb fehérjéi a hemoglobin és a plazmafehérjék. Az ábrán látható, hogy a 16 kDa molekulatömegű fehérje, a hemoglobin a legnagyobb nyomásértékeken sem szenvedett számottevő denaturációt. A nagyobb molekulatömegű fehérjéknél azonban megfigyelhető, hogy egyes sávok eltűnnek 300 MPa és annál nagyobb nyomásértékeknél.

Kísérleteim során lítium-heparin tartalmú, alvadtvér és sertésvér mintákkal is végeztem SDS poliakrilamid gélelektroforézis vizsgálatokat. Az eredmények nagyban hasonlítottak az EDTA tartalmú vérminta eredményeire.

Az eredmények szemléltetése végett az 32. ábrán láthatjuk az EDTA tartalmú vérminta sávjainak intenzitás csökkenését.

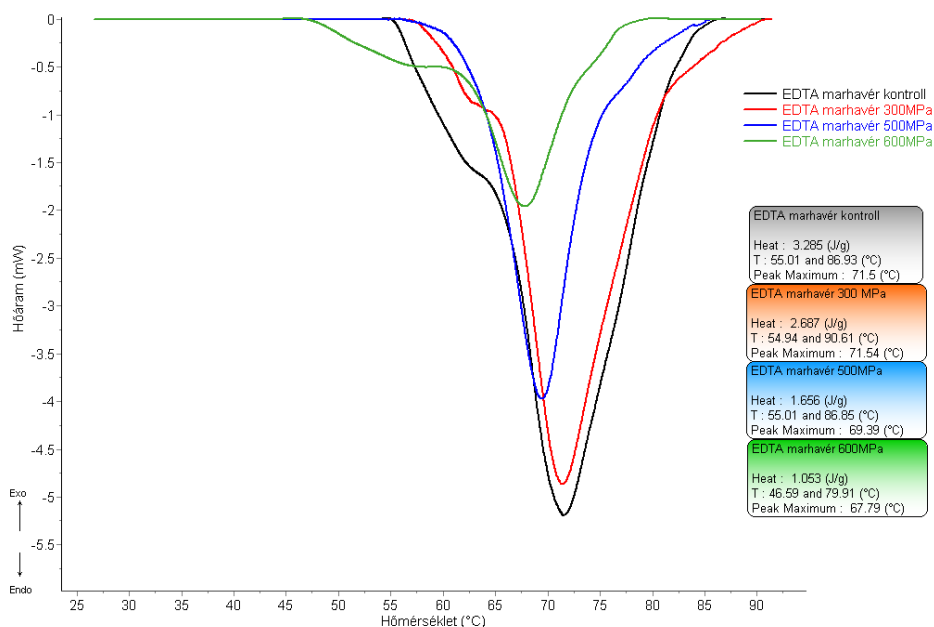


**32. ábra.** EDTA tartalmú vérminta sávjainak intenzitás csökkenése (kontroll, 600MPa)

Amint a két görbén láthatjuk a vérminták esetében, a sávok csökkenése sokkal kisebb mértékű, még a 600 MPa-on kezeltnél is, mint a húsmintáknál.

## 5.4 DSC MÉRÉSEK EREDMÉNYEI

A marhavér fehérjedenaturációs vizsgálata során főként a 60°C és a 80°C közötti hőmérséklet tartományban figyelhető meg változás. Az eredmények az 33. ábrán láthatóak.



**33. ábra.** Fehérjedenaturációs vizsgálatok eredménye

Megállapítható, hogy a nyomáskezelés során a DSC vizsgálatoknál az alacsony nyomásértékeken (100 MPa, 200MPa és 300 MPa) végzett kezelés nem okozott jelentős különbségeket, ezért az ábrán ezen értékek közül csak a 300 MPa-on kezelt mintát tüntettem fel. Azonban amint az ábrán is látható, az 500MPa és a 600 MPa-nál jelentős ugrás figyelhető meg. A szakirodalmi adatokból (Dávilla et al., 2007) arra lehet következtetni, hogy a detektált csúcsunk a plazmafehérjék csoportjába tartozó globulin fehérjéknek felelnek meg (68°C). Ez azért is jelentős, mert a vérben a tartalmuk jelentős. A görbéből megállapítható, hogy a HHP kezelés a nagyobb hőmérsékleten denaturálódó fehérjékre hat jobban, mivel a nyomásértékek növelésével azok mennyisége csökken.

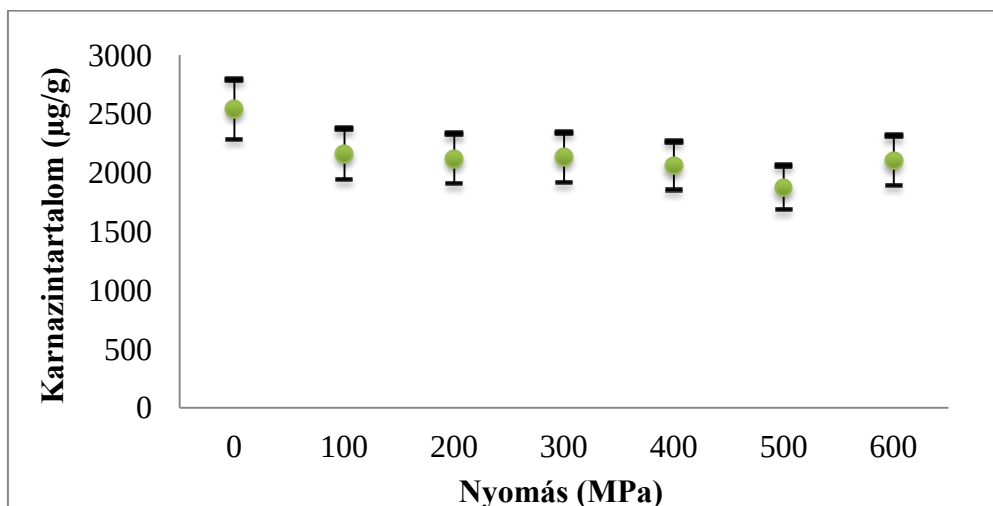
## 5.5 KAPILLÁR ELEKTROFORÉZIS (KARNOZIN) EREDMÉNYEK

A kapott elektroforetogramokon a karnozin és anszerin jól felismerhető, mivel a vizsgált mintáink nagy mennyiségben tartalmazták a két dipeptidet, valamint az elektromigrációs idő jól reprodukálható. A kiértékeléséhez, a már korábban felvett kalibráció adatait használtam. A kapott egyenlettel, valamint a görbe alatti területek segítségével kiszámoltam a karnozin és anszerin tartalmat. A számoláshoz használt egyenlet karnozinra és anszerinre a következő:

$$x_k = \frac{7,97 * \text{karnozin csúcsterület} - 101171,18}{11139}$$

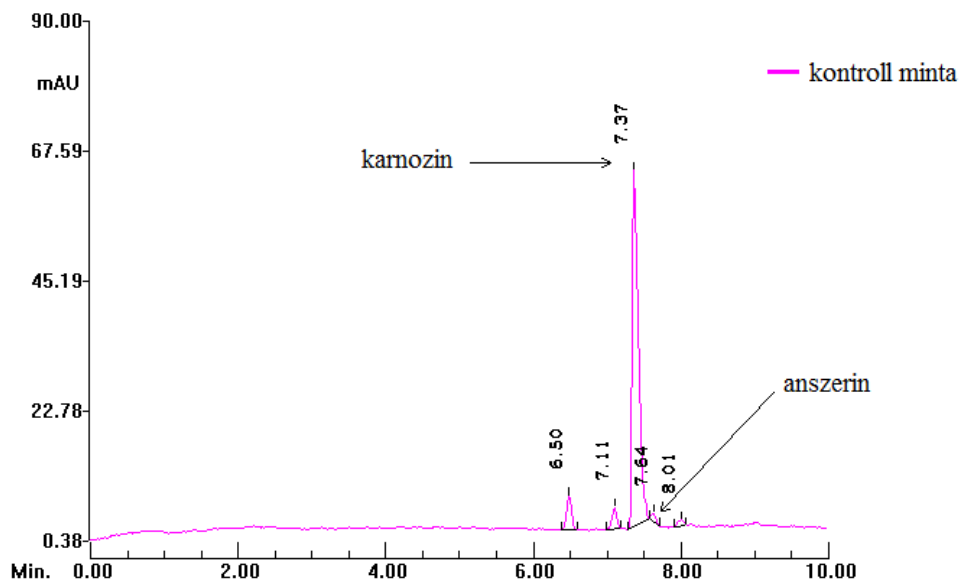
$$x_a = \frac{7,97 * \text{anszerin csúcsterület} - 59097,55}{12649,2}$$

Az adatok ábrázolása látható a 34. ábrán.



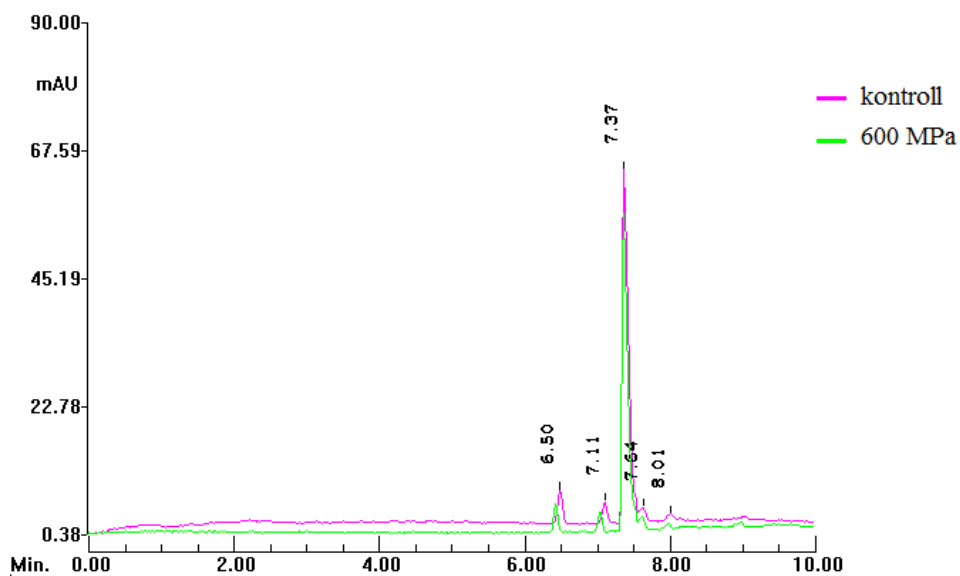
**34. ábra.** Karnozintartalom változása a nyomás függvényében

Amint a grafikonon is látható, a karnozintartalom csak kismértékben csökkent a HHP kezelés hatására. Ezen adatok értelmében a karnozin ellenáll nemcsak a fagyasztásnak, hőkezelésnek és fagyasztva szárításnak, hanem a nyomáskezelésnek is. A kezelések nem okoznak jelentős változást a mérhető koncentrációban (Szerdahelyi, 2013). Mért eredményeimet alátámasztja Suzuki és munkatársai (1994) eredményei, ahol a karnozintartalom meghatározást a HHP kezelést követően HPLC berendezésen végezték el. A másik vizsgált dipeptid az anszerin, mely sokkal kisebb mennyiségben van a szarvasmarha húsmintáinkban, mint a karnozin. A HHP kezelés hatására nem tapasztalható jelentős változás az anszerin tartalomban. A húsminták átlagos anszerin tartalma 36,74 µg/g volt. A 35. ábrán láthatjuk kontroll minta elektroforetogramját, ahol megfigyelhető a karnozin és az anszerin csúcs.



**35. ábra.** Kontrollminta elektroforetogrammjá

A nyomáskezelés hatására bekövetkező kismértékű változást szemlélteti az 36. ábra, melyen rózsaszínnel láthatjuk a kontroll mintát, zöld színnel pedig a 600 MPa-on kezelt húsminta karnozin és anszerin tartalmát. Megállapítható, hogy a kezelés csak kismértékű csökkenést okozott a kimutatható karnozin és anszerin tartalomban.



**36. ábra.** Kontroll és a 600MPa-on kezelt húsminta elektroforetogrammjá

## 5.6 STATISZTIKAI KIÉRTÉKELÉS

A nyomáskezelések szemmel láthatóan befolyásolták a vérminták színét. Ezenkívül az is megfigyelhető volt, hogy az EDTA-s, lítium-heparinos és az alvadt vér hasonlóan reagált a kezelésre, viszont a sertésvér teljesen máshogy viselkedett. Erre a megfigyelésre szerettem volna statisztikai bizonyítékot adni lineáris regresszió segítségével. A vizsgálatot úgy végeztem, hogy az egyes nyomásokon mért színértékeket átlagoltam, majd ezen átlagoknak a lineáris kapcsolatát mutattam ki. Az EDTA-s és lítium-heparinos vérminták összehasonlítása a következő eredményeket adta:

**4. táblázat.** A regresszió  $R^2$  értékei

**Model Summary**

| R    | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|------|----------|-------------------|----------------------------|
| ,955 | ,913     | ,895              | ,914                       |

A 4. táblázatból leolvasható, hogy a vizsgált minták között nagyon erős lineáris kapcsolat van. Ezt a magas  $R^2$  érték (0,913) bizonyítja.

**5. táblázat.** ANOVA táblázat

**ANOVA**

|            | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Regression | 43,644         | 1  | 43,644      | 52,233 | ,001 |
| Residual   | 4,178          | 5  | ,836        |        |      |
| Total      | 47,822         | 6  |             |        |      |

Az 5. táblázatból azt olvashatjuk le, hogy a regressziós egyenes a modell varianciájából mennyit magyaráz meg. Esetünkben ez az érték 43,644. Ez alapján kiszámolható, hogy az egyenes a teljes variancia 91,26%-át fedi le. Ezenfelül az is leolvasható, hogy az F-próba szignifikanciája 0,001. Ez az érték azt igazolja, hogy a regresszió elvégzésének van értelme.

## 6. táblázat. Regressziós együtthatók

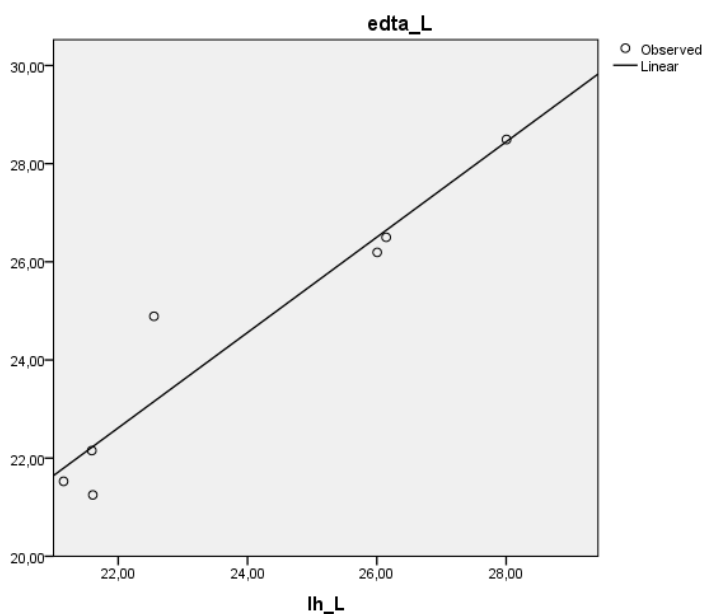
**Coefficients**

|            | Unstandardized Coefficients |            | Standardized Coefficients | t     | Sig. |
|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|-------|------|
|            | B                           | Std. Error | Beta                      |       |      |
| LH_L*      | ,971                        | ,134       | ,955                      | 7,227 | ,001 |
| (Constant) | 1,245                       | 3,226      |                           | ,386  | ,716 |

A 6. táblázatból látható, a keresett lineáris függvény együtthatói. Esetünkben a következő kapcsolat írható fel:

$$L_{EDTA}^* = 0,971 * L_{LH}^* + 1,245$$

Az egyenletből arra lehet következtetni, hogy az  $L^*$  értékek szinte azonosak lesznek az EDTA-s és lítium-heparinos mintáknál a nyomáskezelés során, mivel az egyenes meredeksége közel 1, valamint a konstans értéke 1,245. Tehát az EDTA és a lítium-heparinos minták a kezelés hatására hasonlóan reagálnak.



**37. ábra.** A regressziós egyenes

A 37. ábrán láthatjuk a kiszámított egyenest, valamint az egyes nyomáskezeléseknél mért  $L^*$  színértékeket (x tengely: lítium-heparin, y tengely: EDTA).

A vizsgálatot elvégeztem az EDTA-s és a sertésvér között is és a következő eredmények születtek:

**7. táblázat.** A regresszió  $R^2$  értékei

**Model Summary**

| R    | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|------|----------|-------------------|----------------------------|
| ,210 | ,044     | -,147             | 3,024                      |

**8. táblázat.** ANOVA táblázat:

**ANOVA**

|            | Sum of Squares | df | Mean Square | F    | Sig. |
|------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Regression | 2,101          | 1  | 2,101       | ,230 | ,652 |
| Residual   | 45,721         | 5  | 9,144       |      |      |
| Total      | 47,822         | 6  |             |      |      |

Ebben az esetben a 7. és a 8. táblázat is azt mutatja, hogy az RDA tartalmú marhavér és a kikevert sertésvér között lineáris kapcsolatot nem lehet feltételezni, mivel az  $R^2$  értéke csupán 0,44 és az F-próba szignifikancia szintje 0,652, tehát a nyomáskezelés hatására teljesen máshogy viselkednek.

A többi vizsgálatot elvégezve az tapasztalható, hogy az EDTA-s, lítium-heparinos és alvadtvér minták mindhárom paraméter esetében ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) erős lineáris kapcsolatot mutatnak ( $R^2 > 0,9$ ), valamint nem csak lineáris az összefüggés, hanem a színértékek szinte teljesen megegyezőek. Ez annak a következménye, hogy mindegyik regressziónál az egyenesek meredeksége közel 1, valamint a konstans értéke közel 0. Ezekről a mintáktól teljesen eltérő volt a sertésvér viselkedése. Semmilyen lineáris kapcsolatot nem lehetett találni a sertésvér és a másik három vérminta között, tehát azt a végső következtetést lehet levonni, hogy míg az EDTA-s, lítium-heparinos és alvadtvér közel azonos módon reagált a nyomáskezelésre színértékeket tekintve, addig a sertésvér teljesen különbözött ezektől.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteim során arra törekedtem, hogy olyan területeket vizsgáljak és fejtssek ki, melyek még kevésbé kutatottak, de kiemelt fontosságúak lehetnek az élelmiszeripar szempontjából. Vizsgálataim során a nagy hidrosztatikus nyomáskezelés hatásaira bekövetkező változásokat vizsgáltam marhahús, marhavér és sertésvér esetében. A kísérleteimben különböző eljárásokat használtam. A nyomáskezelés hatására bekövetkező színváltozások nyomonkövetésére színméréseket végeztem. A fehérjékben végbemenő változások megismerése végett fehérjedenaturációs, SDS poliakrilamid gélelektroforézis és izoelektromos fókuszálást végeztem. A hús színével és minőségével összefüggő dipeptidek (karnozin és anszerin) a HHP kezelés hatására történő változásainak felderítése végett kapillár elektroforézis vizsgálatokat folytattam.

Kutatásaim során a következő eredményekre jutottam:

- A színmérés eredményeiből elmondható, hogy a hús nyomáskezelés hatására jelentősen kivilágosodott, míg a vérminták ezzel ellentétesen sötétedtek. A regressziós vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a vizsgált EDTA, lítium-heparin tartalmú és alvadtvér minták a kezelés hatására egyformán változtak, valamint mindegyik mintáknál a 300 MPa-nál ugrás volt tapasztalható az adatokban. A kikevert sertésvér a nyomáskezelés hatására ettől teljesen eltért, melynek valószínűsíthető oka a fibrinszálak hiánya.
- Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis vizsgálatai kimutatták, hogy a húsfehérjék – a nyomáskezelés hatására – sokkal nagyobb mértékben denaturálódtak és aggregálódtak mint a vérfehérjék. A miofibrilláris fehérjéknél megállapítható volt, hogy a miozin könnyű és nehéz láncai a nyomáskezelésre érzékenyek, míg az aktin a kezelésnek jobban ellenáll. A szarkoplazmafehérjék egyik legfontosabb fehérjéje a mioglobin, mely a hús színét is adja a HHP kezelés hatására csak kis mértékben denaturálódott.
- A vérfehérjék a HHP kezelés hatásainak sokkal jobban ellenálltak, mint a húsfehérjék. A vérfehérjék legfontosabb fehérjéje a hemoglobin, még a kezelés során használt legnagyobb nyomásértékeknek a 600 MPa-nak is ellenállt. Ezen eredményeket támasztotta alá az izoelektromos fókuszálás is.

- A fehérjedenaturációs vizsgálatok során a 60°C és a 70°C közötti tartományban jelentős csúcsot detektáltam. A csúcs a plazmafehérjék csoportját, és azon belül a globulinokat foglalja magában. Megállapítható, hogy a 300 MPa - 600 MPa nyomáskezelés a magasabb hőmérsékleti tartományon denaturálódó fehérjékre hatott.
- A kapillár elektroforézis vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a kezelés hatására az imidazol dipeptidek csoportjába tartozó karnozin és anszerin mennyisége jelentősen nem változott. Tehát ennek fényében elmondható, hogy a karnozin és az anszerin ellenáll a kezelésnél használt legnagyobb 600 MPa nyomásnak is.

A dolgozatban elért eredmények fényében az a következtetés vonható le, hogy érdemes tovább foglalkozni a témával és további kutatásokat végezni annak érdekében, hogy a friss húsban és vérben fellépő oxidációs folyamatokat is megvizsgáljuk.

## **IRODALOMJEGYZÉK**

Bajovic, B., Bolumar, T., Heinz, V. (2012): Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science* 92 (3), 280-289.

Bekhit, A. E. D., Geesink, G. H., Ilian, M. A., Morton, J. D., Sedcole, R., Bickerstaffe, R. (2003): Particulate metmyoglobin reducing activity and its relationship with meat color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (20), 6026-6035.

Berkhit, A. E. D., Geesink, G. H., Ilian, M. A., Morton, J. D., Sedcole, R., Bickerstaffe, R. (2004): Pro-oxidant activities of carnosine, rutin and quercetin in a beef model system and their effects on the metmyoglobin-reducing activity. *Eur Food Res Technol*, 218 (6), 507-514.

Bolumar, T., Andersen, M. L., Orlie, V. (2014): Mechanisms of radical formation in beef and chicken meat during high pressure processing evaluated by electron spin resonance detection and the addition of antioxidants. *Food Chemistry* 150, 422-428.

Campus, M. (2010): High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. *Food Engineering Reviews*. 2 (4), 256-273.

Claus, J. R., Du, C. (2013): Nitrite-embedded packaging film effects on fresh and frozen beef color development and stability as influenced by meat age and muscle type. *Meat Science* 95 (3), 526-535.

Csapó, J., Csapóné, K. Zs. (2002): Tej és tejtermékek a táplálkozásban. *Mezőgazda Kiadó*, Budapest, 253-265.

Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., Relkin, P. (2007): Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76 (2), 216-225.

Dergez, T., Könczöl, F., Kiss, M., Farkas, N. (2006): DSC study on the motor protein myosin in fibre system. *Thermochimica Acta*, 445 (2), 205-209.

Dumoulin, M., Hayashi, R. (1998): High pressure, a unique tool for food texturization. *Food Science and Technology International*, 4 (2), 99-113.

Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., Suman, S. P. (2010): Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86 (1), 86-94.

Fehér, Gy. (2000): A háziállatok funkcionális anatómiája. *Mezőgazda Kiadó*, Budapest, 133-237.

Furlán, L.T.R., Lecot, J., Padilla, A.P., Campderrós, M.E., Zaritzky, N. (2011): Effect of saccharides on glass transition temperatures of frozen and freeze dried bovine plasma protein. *Journal of Food Engineering*, 106 (1), 74-79.

Gao, X., Wang, Z., Miao, J., Xie, L., Dai, Y., Li, X., Chen, Y., Luo, H., Dai, R. (2014): Influence of different production strategies on the stability of color, oxygen consumption and metmyoglobin reducing activity of meat from Ningxia Tan sheep. *Meat Science*, 96 (2 Pt A), 769-774.

Gasztonyi, K., Lásztity, R. (1993): *Élelmiszer-kémia 2*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 5-12.

Hajós, Gy. (1993): Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában. *élelmiszervizsgálati Közlemények*, 39 (1), 6-23.

Hajós, Gy., Idei, M., (2001): Elektroforetikus és elektrokromatográfias módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I., *Magyar Kémikusok lapja*, 56 (10), 364-368.

Hamilton, R. G., Kickler, T. S. (2007): Bovine hemoglobin (glutamer-250, Hemopure)-specific immunoglobulin G antibody cross-reacts with human hemoglobin but does not lyse red blood cells in vitro. *Transfusion*, 4 (47), 723-728.

Hoffmann, K., Blüchel, E. (1986): Bestimmung der Tierart von rohem Muskelfleisch anhand der Myoglobin-muster im pH-Gradienten-Gel. *Fleischwirtschaft*, 66, 916-921.

Idei, M., Hajós, Gy. (2001): Elektroforetikus és elektrokromatográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei II. *Magyar Kémikusok Lapja*, 56 (11), 398-402.

In, M. J., Chae, H. J., Oh, N. S. (2002): Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of haemoglobin. *Bioresource Technology*, 84 (1), 63-68.

Jánosi, A. (2006): Fajspecifikus húszonosság polimeráz láncreakción alapuló technikákkal. Ph. D. értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola.

Kansci, G., Genot, C., Meynier, A., Gandemer, G. (1997): The antioxidant activity of carnosine and its consequences on the volatile profiles of liposomes during iron/ascorbate induced phospholipid oxidation, *Food Chemistry*. 60 (2), 165-175.

Kosáry J. (2014): A táplálkozás biokémiája egyetemi jegyzet. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar.

Kosáry J. (2014): A táplálkozás biokémiája (Élelmiszer-biokémia) egyetemi jegyzet. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar.

Mancini, R. A., Hunt, M. C. (2005): Current research in meat color. *Meat Science*, 71 (1), 100-121.

Medina-Meza, I. G., Barnaba, C., Barbosa-Cánovas, G. V. (2013): Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 1-10.

Morales, P., Calzada, J., Avila, M., Nunez, M. (2008): Inactivation of Escherichia coli O157: H7 in ground beef by single-cycle and multiple-cycle high-pressure treatments. *Journal of Food Protection*, 71 (4), 811-815.

Ofori, J. A., Hsieh, Y-H. P. (2012): The Use of Blood and Derived Products as Food Additives. In Y. A. El-Shamragy (ed.), *Food additive*. InTech, Rijeka, 229-256.

Parés, D., Ledward, D. A. (2001): Emulsifying and gelling properties of porcine blood plasma as influenced by high-pressure processing. *Food Chemistry*, 74 (2), 139-145.

Patkós, A. (2007): *Biológiai kislexikon*, Typotex Elektronikus Kiadó Kft. Internet: <http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/oxford-typotex-biologiai/ch01s13.html>

Richards, M. P., Modra, M. A., Li, R. (2002): Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Science*, 62 (2), 157-163.

Roger, H. (1895): Action des Hautes Pressions sur quelques bactéries. *Arch Physiol Norm Pathol*, 7, 12-17.

Suzuki, A., Homma, N., Fukuda, A., Hirao, K., Uryu, T., Ikcuchi, Y. (1994): Effects of High Pressure Treatment on the Flavour-related Components in Meat. *Meat Science*, 37 (3), 369-379.

Szerdahelyi, E. (2000): *Húsok és hústermékek fehérjéinek és biogén aminosavainak változásai*. Ph.D. értekezés, Központi Élelmiszerkutató Intézet, Biológia Osztály.

Szerdahelyi, E., Hajós, Gy., Molnár, P. E. (1995): Tehéntej meghatározása hazai sajtokban izoelektromos fókuszálással. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 41 (3), 225-231.

Szerdahelyi, E., Korompai, E., Nagy, A., Alarcon-Rojo, A. D., Janacua-Vidales, H., Marcolini, E., Gelencsér, É. (2013): Biologically active dipeptides in raw and processed meat samples. 2<sup>nd</sup> International Conference on Food Digestion. Madrid, Abstract Book: p 66.

Toldra, M., Dávila, E., Saguer, E., Fort, N., Salvador, P., Parés, D., Carretero, C. (2008): Functional and quality characteristics of the red blood cell fraction from biopreserved porcine blood as influenced by high pressure processing. *Meat Science* 80 (2), 380-388.

Toldrá, M., Elias, A., Parés, D., Saguer, E., Carretero, C. (2004): Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 88 (3), 461-468.

Zapf, I., Fekecs, T., Ferencz, A., Tizedes, Gy., Pavlovics, G., Kálmán, E., Lőrinczy, D. (2011): DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochimica Acta*, 524 (1) 88-91.

Zinellu, A., Sotgia, S., Campesi, I., Franconi, F., Deiana, L., Carru, C. (2011): Measurement of carnosine, homocarnosine and anserine by FASI capillary electrophoresis UV detection: Applications on biological samples, *Talanta*, 84 (3), 931-935.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Némethné Dr. Szerdahelyi Emőkének és Dr. Friedrich Lászlónak szakmai útmutatásukért és támogatásukért.

Szeretném kifejezni köszönetemet Háderné Sólyom Katalin részére a poliakrilamid gélelektroforézis vizsgálatokban nyújtott segítségéért, valamint hasznos tanácsaiért.

Köszönöm Jónás Gábornak a nyomáskezelésben valamint Zeke Ildikónak a DSC vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak és Bóka Dávidnak a rengeteg segítséget és támogatást, nélkülük a dolgozatom nem készülhetett volna el.

Lezárás dátuma: 2014.08.01.