

ÉLELMISZERVIZSGÁLATI

K Ö Z L E M É N Y E K

JOURNAL OF FOOD INVESTIGATION

T U D O M Á N Y - É L E T - M I N Ő S É G - B I Z T O N S Á G

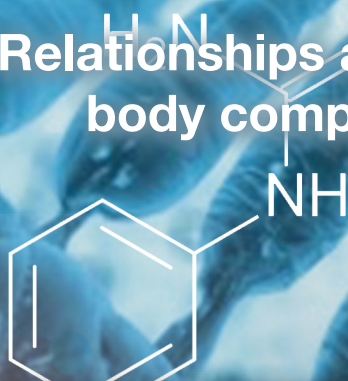
LXVIII. ÉVFOLYAM 2. SZÁM
VOL. 68, 2022 NO. 2

SCIENCE – LIFE – QUALITY – SAFETY

2022. JÚNIUS 30.
30 JUNE 2022

A feniltiokarbamid érzékenység összefüggései a testösszetétellel, valamint a kávé- és tea fogyasztással

Relationships amongst phenyltiocarbamide sensitivity, body composition, coffee and tea consumption



Kisüzemi gyümölcsös sörök technológiája

Egysejt-fehérjék előállítása élelmiszer célokra

In vitro tesztrendszer probiotikumok vizsgálatára

Biológiai tartósító szerek hatásának vizsgálata

*Technology of small-scale fruit beers
• Production of unicellular proteins for food purposes • In vitro test system for investigations of probiotics • Investigation of the effect of bio-preservatives*



www.eviko.hu

TARTALOM – CONTENTS

A feniltiokarbamid érzékenység összefüggései a testösszetétellel, valamint a kávé- és teafogyasztással (Biró Barbara, Koren Dániel, Lichthammer Adrienn, Veresné Bálint Márta, Gere Attila, Kókai Zoltán) <i>Relationships amongst phenyltiocarbamide sensitivity, body composition, coffee and tea consumption</i> <i>(Barbara Biró, Dániel Koren, Adrienn Lichthammer, Márta Veresné Bálint, Attila Gere, Zoltán Kókai)</i>	3844 3855
Kisüzemi gyümölcsös sör termékfejlesztésének kezdeti mikrobiológiai tapasztalatai (Jakucs Levente, Óré-Sütő Berta Vanda) <i>Initial microbiological experience in small-scale fruit beer product development</i> <i>(Levente Jakucs, Vanda Óré-Sütő Berta)</i>	3866 3877
Egysejt-fehérje előállítása állati takarmányozáshoz fermentációs biotechnológiával (Molnár Judit, Vasas David, Kalocsai Renátó, Szakál Tamás, and Mukhtar H. Ahmed) <i>Production of Single Cell Protein by the fermentation biotechnology for Animal Feeding</i> <i>(Judit Molnár, David Vasas, Renátó Kalocsai, Tamás Szakál, and Mukhtar H. Ahmed)</i>	3888 3896
In vitro tesztrendszer alkalmazása probiotikus baktériumtörzsek szelektálására (Süle Judit, Varga László, Hatvan Zoltán, Kerényi Zoltán) <i>Application of an in vitro test system for the selection of probiotic bacterial strains</i> <i>(Judit Süle, László Varga, Zoltán Hatvan, Zoltán Kerényi)</i>	3904 3916
Összetett bio-tartósítószer hatása a friss sertéskaraj mikrobiológiai mutatóira és eltarthatóságára (Aleksandr Lukin, Olga Babina, Sergey Pirozhinsky) <i>Effect of a compound bio-preservative on microbiological indicators and shelf life of fresh pork chops</i> <i>(Aleksandr Lukin, Olga Babina, Sergey Pirozhinsky)</i>	3928 3937
MTA Élelmiszeralitika és Minőség Munkabizottsága hírei 2022 június (Tömösközi Sándor szerk., Bugyi Zsuzsanna szerk.) <i>News of the Food Analysis and Quality Working Committee of the Hungarian Academy of Science June 2022</i> <i>(Sándor Tömösközi ed., Zsuzsanna Bugyi ed.)</i>	3946 3949
Nemzeti szabványosítási hírek (Szalay Anna) <i>Review of national standardization</i> <i>(Anna Szalay)</i>	3952 3953

ISSN 0422-9576

OPEN



ACCESS

Tudományos folyóiratunk tartalma 2021-től szabadon hozzáférhető a www.eviko.hu honlapon.

The content of our scientific journal will be freely available on the website www.eviko.hu from 2021.



Kedves Olvasóink!

Aggasztó és szegyenletes, hogy *Keleten* a helyzet még mindig változatlan.

„Testvér, itt rációt, s kegyelmet ne keress, / A régi fát az új szelek / Kitépik, hiába gyökeres / Az ősi földben, s / Emlékeiben még tetemes / Tudás és Tapasztalás adja / Felsőbbrendű és nemes / Esméknek honát, / Az emberek nem értik szavát, / Mígnem mindannyian / Meg nem járjuk a Golgotát¹.”

Úgy vélem, minden békeszerető ember várja az értelmetlen és szörnyű háború végét. Jómagunk szerény eszközeivel úgy járulunk hozzá a megbékéléshez, hogy hasábjainkon az emberi élet fenttartásához egyik legszükségesebb pillér, az élelmiszerek vizsgálatáról szóló cikkeket teszünk közzé.

Vezető anyagunk szerzői, **Bíró Barbara és munkatársai** egy, az élelmiszerek érzékszervi vizsgálatával kapcsolatos, genetikai alapokon megközelíthető élettani jelenség tudományos háttérét tárgyalják. Munkájuk lényege az, hogy a TAS2R38 jelzésű keserű íz érzékeléséért felelős receptor

gén polimorfizmusai kétféle módon működő receptort alakítanak ki az emberi populációban. Kísérleteikben kimutatták, hogy a vizsgált két keserű ízű vegyülethez köthető érzékelési képesség és az emberi test összetétele statisztikus összefüggést mutat.

Jakucs Levente és Óré-Sütő Berta Vanda egy ősi ital, a sör termékfejlesztéséről számolnak be kisüzemi – kézműves–technológiai környezetben. Dolgozatukban elemzik a sör minőségét rontani képes veszélyforrásokat és vázolják egy sör-előállító berendezés műszaki hiányosságainak kiküszöbölési lehetőségeit is, amelyek révén számottevően javulhat a berendezés használatával előállított kézműves sör minősége.

Molnár Judit és munkatársai Kéziratukban a növekvő létszámú emberiség egyik globális problémája, a kielégítő minőségű és mennyiségű élelmiszertermelés egyik megoldási lehetőségét vázolják. Cikkükben az egysejt-fehérjék élelmezési és takarmányozási célra való előállításával kapcsolatos szakirodalmi összefoglalóval szolgálnak. Ipari méretekben, irányított fermentációs technikával számos mikroorganizmussal (baktériumokkal algákkal, gombákkal) lehet élelmiszer- és takarmány-alapanyként szolgáló, tápláló fehérjét előállítani.

Süle Judit és munkacsoportja olyan, in vitro tesztrendszer kidolgozásán fáradozott, amelynek segítségével hatékonyan lehet probiotikus - hasznos élőanyag gyanánt szolgáló - baktériumtörzseket szelektálni. Kísérleti munkájuk során értékes, antibiotikum- és egyéb antimikrobiális hatásokra rezisztens törzseket izoláltak. Eredményeik alapján bővíthet az emberi egészségre jótékony hatással rendelkező probiotikus termékek előállításának lehetősége, amelyekben az élő mikroorganizmusok képesek ellenálni a felső béltraktus savas hatásának, így hatékonyan tudnak hozzájárulni az egészséges bélflóra fenntartásához.

Aleksandr Lukin és munkatársai tartósító szereket tartalmazó adalékanyag-keverékek vizsgálatának témájában küldték be dolgozatukat. Munkájuk során céljuk arra törekedtek, hogy több hatékony módszert találjanak az élelmiszerek mikrobiológiai károsítókkal szembeni megóvására. Kutatásuk fő célja a tartósítószerkeverékben lévő élelmiszer-adalékanyagok vegyületeinek hatásvizsgálata volt friss sertéshús mikrobiológiai romlással szembeni ellenálló képességére a hús tárolása során. Kísérleteiket mikrobiológiai indikátorok segítségével végezték.

Dr. Szigeti Tamás János
főszerkesztő

¹ Szigeti T.: *Keleten a helyzet változatlan*



Dear Readers,

It is worrying and shameful that All Quiet on the *Eastern Front* is still unchanged.

“Here, Man, seek not ration, nor mercy, / Old tree plucked up by new winds, / rooted in vain in their ancient earth, / and memory, still great Knowledge and Experience give home to superior and noble Ideas. / No one will understand his word / till all have passed through Calvary.”¹

I believe all peace-loving people are waiting for the end of the senseless and terrible war. With our own modest means, we are contributing to reconciliation by publishing articles in our columns on food testing, one of the most necessary pillars for sustaining human life.

The authors of the leading material, **Barbara Bíró and her colleagues**, discuss the scientific background of a genetically accessible physiological phenomenon related to the sensory examination of food. The essence of

their work is that the polymorphisms of the TAS2R38 receptor gene, which is responsible for the perception of bitter taste, forms bimodal effect in the human population. In their experiments, they highlighted, there is a statistically significant relationship between the sensitivity of the two bitter-tasting compounds tested and the composition of the human body.

Levente Jakucs and Berta Vanda Óré-Sütő report the product development of an ancient beverage, the beer, in a small-scale – artisanal – technological environment. Their work analyzes the sources of risks that can mess up the quality of beer and outlines the possibilities of eliminating the technical shortcomings of a beer production equipment, which can significantly improve the quality of artisanal beer produced using the equipment.

In their manuscript, **Judit Molnár and her colleagues** outline one of the solutions to one of the global problems of an increasing number of human beings, the production of food of satisfactory quality and quantity. In their article, they provide a review of the literature on the production of unicellular proteins for food and feed purposes. With the fermentation technique controlled by industrial devices, plenty of microorganisms (bacteria, algae, fungi) can be used to produce valuable nutritious protein as a raw material of food and feed products.

Judit Süle and her scientific research team have been working to develop an in vitro test system that can be used to efficiently select probiotic bacterial strains as useful living microbe materials. In their experimental work, they isolated valuable resistant strains to antibiotics and other antimicrobial effects. Based on their results, there is a possibility to producing probiotic products with have beneficial effects on human health, in which living microorganisms can resist the acidic action of the upper intestinal tract, can thus effectively contribute to the maintenance of a healthy intestinal flora.

Aleksandr Lukin et al. sent us an article on the topic of investigation of bio-preservative agent containing additive material mixture. They strived to find several methods to preserve the food products against the microbiological damage agents. The main goal of the paper is investigating the effect of the compounds of food additives in the preservative mixture on the resistance of fresh pork to microbiological spoilage during storage. They work based on the usage of microbiological indicators.

Dr. Tamás János Szigeti
editor-in-chief

¹ T. Szigeti T.: *All Quiet on the Eastern Front* (translation: Blanka Daniella Szilvássy)

BIRÓ Barbara^{1*}, KOREN Dániel², LICHTHAMMER Adrienn³,
VERESNÉ BÁLINT Márta³, GERE Attila¹, KÓKAI Zoltán¹

DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2022/2-1-HUN>

Érkezett: 2022. január – Elfogadva: 2022. március

A feniltiokarbamid érzékenység összefüggései a testösszetétellel, valamint a kávé- és teafogyasztással

Kulcsszavak: ízérzékelés, egy pontos nukleotid polimorfizmus, bioelektromos impedancia, testtömegindex, étel-miszer preferenciák

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A TAS2R38 keserű íz érzékeléséért felelős receptor-gén polimorfizmusai bimodális receptor választ váltanak ki a populációban a feniltiokarbamid, illetve a 6-n-propiltiouracil érzékelése során. A feniltiokarbamid és a 6-n-propiltiouracillal szembeni érzékenység genetikai eltérései irodalmi adatok alapján befolyásolhatják a testösszetételt, az étel-miszer preferenciákat és az étel-miszerek fogyasztási gyakoriságát. Hazánkban eddig ezeknek a faktoroknak az együttes vizsgálatával kapcsolatban még nem született publikáció.

Jelen kutatás célja összefüggések keresése a feniltiokarbamid taster státusz és a testösszetétel, valamint a különböző keserű ízű étel-miszerek fogyasztási gyakorisága között.

A vizsgálat során elvégeztük a résztvevők taster státusz felmérését (n = 170), bioelektromos impedancia alapú testösszetétel-meghatározását (n = 96). A résztvevők ezen túlmenően kitöltöttek egy keserű étel-miszerekre vonatkozó fogyasztási gyakorisági kérdőívet (n = 170). Az adatelemzéshez leíró statisztikai módszereket, keresztábra-elemzést, többszörös korrespondencia-analízist (Multiple Correspondence Analysis), valamint Mann-Whitney próbát használtunk, 5%-os szignifikanciaszinten.

A taster és non-taster kategóriák arányai megegyeznek a nemzetközi szakirodalomban közölt adatokkal (rendre 70%/30%). A taster státusz és a többi vizsgált paraméter között nem adódott szignifikáns összefüggés, azonban a többszörös korrespondencia analízis alapján a nemzetközi szakirodalommal egybevágó tendenciák figyelhetők meg. A nemek és a testösszetétel, valamint az étel-miszerpreferenciák egyes változói között szignifikáns összefüggés mutatható ki.

A szakirodalmi adatok, és saját eredményeink alapján nem zárható ki, hogy összefüggés áll fenn a genotípus és a testösszetétel, valamint az étel-miszerválasztás között. További, nagymintás, reprezentatív kutatások eredményei szükségesek a feltételezések igazolásához.

¹ Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

² Pécsi Sörfőzde Zrt.

³ Dietetikai és Táplálkozástudományi Tanszék, Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar

BIRÓ Barbara
KOREN Dániel
LICHTHAMMER Adrienn
VERESNÉ BÁLINT Márta
GERE Attila
KÓKAI Zoltán

barbarabirophd@gmail.com
danikoren3@gmail.com
lichthammera@se-etk.hu
veresne@se-etk.hu
gere.attila@uni-mate.hu
kokai.zoltan@uni-mate.hu

<https://orcid.org/0000-0001-5042-8169>
<https://orcid.org/0000-0002-3663-5636>
<https://orcid.org/0000-0003-4619-4907>
<https://orcid.org/0000-0001-7356-8156>
<https://orcid.org/0000-0003-3075-1561>
<https://orcid.org/0000-0002-1158-721X>

Rövidítések: PROP: propiltiouracil; PTC: feniltiokarbamid; SNP: Single Nucleotid Polymorphism (egy pontos nukleotid polimorfizmus); GPCR: G Protein Coupled Receptor (G-protein kapcsolt receptor); PAV: Prolin-Alanin-Valin; AVI: Alanin-Valin-Izoleucin; AAI: Alanin-Alanin- Izoleucin; PAI: Prolin-Alanin-Izoleucin; PVI: Prolin-Valin-Izoleucin; AAV: Alanin-Alanin- Valin; FFQ: Food Frequency Questionnaire (élelmiszerfogyasztási gyakorisági kérdőív); BIA: bioelektromos impedancia; BMI: Body Mass Index (testtömegindex); PBF: Percent Body Fat (testzsírszázalék); VFA: Visceral Fat Area (viszcerális zsír kiterjedése); MCA: Multiple Correspondence Analysis (többszörös korrespondencia analízis)

2. Bevezetés

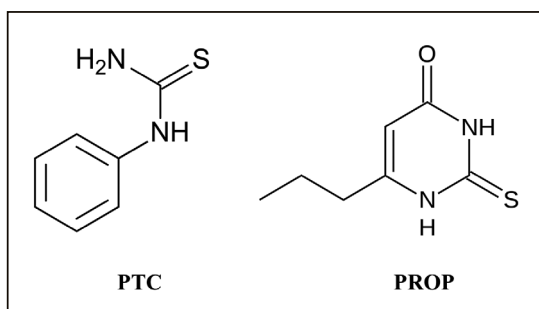
A körülöttünk lévő világot, illetve abban önmagunkat érzékszerveinken és érzékeinken keresztül észleljük. Az emberek esetében öt alap érzéket különböztetünk meg: a látást, a hallást, a tapintást, a szaglást és az ízlést. Ezekon kívül más érzékeket is ismerünk, ide tartozik pl. az egyensúly, az éhség, a szomjúság, a fájdalom vagy a rossz közérzet [1]. Az ízek érzékelése – a szaglással és az általános (trigeminális) kemoszenzoros rendszerrel együtt – a szájhoz és az orrhoz kötődik, és az ún. kémiai érzőfolyamatok közé tartozik, melyek feladata a környezetünkben található vegyületek érzékelése. Az ízek érzékeléséért felelős receptorok az elfogyasztott vegyületeket detektálják, melyeket ízanyagoknak nevezünk. Ezek többnyire vízben oldódó molekulák, melyek a táplálék minőségéről és biztonságosságáról szolgáltatnak információkat [2].

Az ízérezékelés közvetlen kontaktfolyamat, melynek kizárólagos helye a szájüreg. Az érzékelésért felelős receptorok a nyelv felszínén, a garatban, a lágy szájpadon és a nyelöcső felső részén, az ún. ízlélszemölcsőkön elhelyezkedő ízlélszimbókön találhatóak meg. Az ezek által közvetített információ a VII; IX. és X. agyidegeken, majd az agytörzsi és agyalapi magvakon keresztül a frontális operculum és az insula ízlélszimbóéba érkezik. Ezek a kérgi területek, valamint az agytörzsből a tractus solitarius magvai összeköttetésben állnak a hypothalamussal és az amygdalával, melyek valószínűleg befolyásolják az éhséget és a jóllakottságot (telítettséget), az étkezéssel kapcsolatos egyéb homeosztatiszikus válaszokat, valamint az étkezéssel kapcsolatos érzelmi reakciókat [2, 3].

A keserű íz gyakran elutasítást vált ki, mely egy veleszületett emberi reakció. Ez az averzív válasz annak köszönhető, hogy számos keserű ízű vegyület (szekunder növényi metabolitok, pl. alkaloidák, egyes szerves és szintetikus vegyületek, élelmiszerek esetében pl. az avas zsírok) toxikus, ezek elfogyasztása egészségkárosító, vagy akár életet veszélyeztető is lehet [4]. Ugyanakkor, megannyi olyan keserű ízű vegyület is ismert, mely gyógyszerészeti és táplálkozástudományi szempontból előnyös. Ilyen vegyületek pl. a Brassicaceae családba tartozó káposzta, brokkoli, vagy bimbós kel glükoszínolátjai, és ezek bomlástermékei, az izocianátok; a kávé, a tea és a kakaó metilált xantinszármazékai, a koffein, a teofillin és a teobromin; vagy a sörök keserűségét adó komló-eredetű alfa-savak. Míg a zöldségfélék esetében általában elutasítást váltanak ki ezek a vegyületek, az utóbb említett élvezeti termékek esetében a keserű íz kívánt tulajdonság [5, 6, 7].

Az ízek érzékelése során öt alapíz különböztetünk meg: az édeset, a sósat, a savanyút, a keserűt és az umamit. Utóbbi az érzékeléséért felelős receptor felfedezése után, 2002-ben került hivatalosan az alapízek közé [8]. Az öt alapíz közül a keserű íz detektálása a legkomplexebb, ennek szabályozásért a TAS2R géncsalád felelős, mely 25 funkcionális génből áll. Ezek a gének kódolják a TAS2Rs receptorokat, melyek strukturálisan kötődnek egyes keserű ízt kiváltó vegyületekhez (ligandok), azonban számos receptor ligandját még nem sikerült azonosítani [7].

A feniltiokarbamid (PTC, más néven 1-fenil-2-tiourea), illetve a 6-n-propiltiouracil (PROP) szintelen vagy fehér színű, kristályos, keserű ízű szerves vegyületek: mindkettő kéntartalmú (SCN) funkciós csoportot tartalmaz. Kémiai szerkezetüket az 1. ábra mutatja be. Felhasználásuk eltérő: a feniltiokarbamidot ipari adalékanyagként, színezékanyagként használják, míg propiltiouracilt antitireoid ágensként alkalmazzák pajzsmirigy-túlműködésben [9, 10].



1. ábra. A 1-fenil-2-tiourea (PTC) és a 6-n-propiltiouracil (PROP) szerkezete

A két vegyület különlegessége, hogy az emberekben ún. bimodális választ váltanak ki: a populáció egy része képes érzékelni ezek keserű ízét, egy része pedig nem. Ennek felfedezése Arthur Fox vegyész nevéhez fűződik. 1931-ben a DuPont vegyipari vállalat laboratóriumában dolgozó Fox véletlenül a laboratórium légtérébe engedett kis mennyiségű finom kristályos PTC-t, mire egy kollégája panaszkodni kezdett annak keserű ízére. Fox ezt annak ellenére nem érezte, hogy közvetlenül érintkezett a porfelhővel. Ez után családját és barátait is tesztelte, mely során „taster” (érző) és „non-taster” (nem érző) státuszba sorolta az egyéneket. Eredményeit még ugyanazon évben alátámasztotta Laurence Hasbrouck Snyder genetikus, aki megállapította, hogy a non-taster státusz a Mendeli genetika szerint egy recesszív jelleg [11].

A kutatáshoz használt PTC lecserélése a rokon vegyületre, a PROP-ra az 1960-as években merült fel először, a PTC erős kénes illata miatt. Az 1980-as években azonban toxikológiai szempontból is kérdésessé vált a PTC, így a kutatók a két vegyület hatásainak összehasonlítása, és a PROP küszöbkoncentrációjának megállapítása után a PROP-ot is használatba vették [12].

Bartoshuk és munkatársai 1991-ben felfedezték, hogy a non-tasterek viszonylag homogén válaszreakciókat adtak, viszont a tasterek reakciói különbözőbbek voltak, egy alcsoportjuk pedig kifejezetten intenzívebbnek érezte a PROP keserű ízét. Az alcsoportba tartozókat „supertastereknek” nevezték el. A supertaster státuszt nem befolyásolja a taster státuszért felelős genotípus, azonban ez a felfedezés magával vonzotta az új klasszifikációs szint, a „medium taster” kifejezés használatát [13].

A taster státuszt a genetikai állomány bizonyos változatai, ebben az esetben egy pontos nukleotid polimorfizmusok (Single Nucleotid Polymorphism, SNP) határozzák meg. Az SNP-k a genom egy nukleotidját érintő DNS szekvencia variációk, ugyanahhoz a fajhoz tartozó két egyed genetikai állománya között egyetlen bázis eltérései, ugyanabban a pozícióban. Minden ember genomja egyedi SNP mintázattal rendelkezik, azonban az ilyen változások akkor nevezhetők SNP-nek, ha a populáció legalább 1%-ban megjelennek. Az SNP-k általában a DNS osztódásakor (replikáció) bekövetkező hiba vagy DNS károsodás révén jöhetnek létre. Elhelyezkedhetnek génekben (kódoló és nem kódoló szakaszokban egyaránt), valamint gének között (intergenikusan) is, így okozhatnak szerkezet- és funkcióváltozást is [14].

Az SNP-eket gyűjtő dbSNP adatbázist az amerikai National Center for Biotechnology Information, és a National Human Genome Research Institute közösen hozta létre 1999-ben. A teljes emberi genomot 2003-ban sikeresen feltérképező Human Genome Project ugrásszerűen megnövelte a felfedezett SNP-k számát, mai napig több mint 650 millió egy pontos nukleotid variációt térképeztek fel és gyűjtöttek össze az adatbázisban (weblap: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) [15].

A PTC- és PROP-érzékenység esetében a TAS2R38 keserű íz detektálásáért felelős gén SNP-i határozzák meg, hogy az egyén képes-e a vegyület keserű ízének érzékelésére. A gén egy, hét transzmembrán doménnel rendelkező (heptahelikális) G-protein kapcsolt (Gene Protein Connected Receptor, GPCR) keserűíz-érzékelő receptort kódol, amely a vegyületek N-C=S csoportjához kötődik. Ebben az esetben 1002 nukleotidból álló gén 3 funkcionális missense-coding SNP-t tartalmaz, melyek nem szinonim változásokat eredményeznek, tehát megváltoztatják a kódolt fehérje szerkezetét. A kérdéses fehérje esetében az aminosav-sorrend az **1. táblázatban** bemutatottak szerint alakulhat.

1. táblázat. A TAS2R38 gén polimorfizmusai, és a kódolt fehérje aminosavai [16, 17] alapján

A nukleotid pozíciója	SNP allél	Aminosav pozíciója	A kódolt aminosav
145	rs713598 – Citozin	49	Prolin
	rs713598 – Guanin		Alanin
785	rs1726866 – Citozin	262	Alanin
	rs1726866 – Timin		Valin
886	rs10246939 – Guanin	296	Valin
	rs10246939 – Adenin		Izoleucin

A két leggyakoribb haplotípus a PAV, valamint az AVI. A domináns PAV/PAV, vagy PAV/AVI diplotípussal rendelkezők általában taster státuszúak, míg a recesszív AVI/AVI diplotípusúak non-tasterek. Kis gyakorisággal (1-5%), de egyes etnikumok és kisebb populációk esetében előfordulnak AAI, PAI, PVI és AAV haplotípust hordozók is, utóbbi esetében a két státusz nagyjából egyenlő eloszlást mutat. Az eddigi vizsgálatok alapján összességében elmondható, hogy a taster státusz gyakorisága nagyobb, a vizsgált populációtól függően 55-85% [16, 17, 18].

Magyarországon taster státuszt felmérő kutatást 1967-ben, 7-15 éves budapesti gyermekeken végzett Dr. Forrai György gyermekgyógyász és Bánkóvi György matematikus. Munkájuk során Harris és Kalmus módszere alapján, PTC oldatokkal meghatározták az ízküszöbértéket az egyes gyermekek esetében, majd ebből következtettek a taster státuszra. Eredményeik alapján a gyermekek 67,8%-a taster státuszú volt, azonban a nem és a státusz között nem találtak szignifikáns összefüggést. Munkájukat az Orvosi Hetilapban publikálták [19].

Anatómiai szempontból a polimorfizmus az ízlelőbimbók számával van összefüggésben: a tasterek több fungiform papillával és ízlelőpórussal rendelkeznek [12].

A PTC és PROP érzékenység más faktorokra gyakorolt hatásának kutatását az 1960-as években kezdték el. A magyarországi születésű pszichofarmakológus-kutató, Roland Fischer volt az első, aki úgy gondolta, összefüggés állhat fenn az ízek érzékelése és az élelmiszerek kedveltsége között [20]. A mai napig számos kutató foglalkozik a taster státusz (és az azt meghatározó haplo- és diplotípusok) és a testtömegindex [17, 21], egyes élelmiszerek kedveltsége és fogyasztási gyakorisága (pl. alkoholos italok [22, 23], zöldségek – különösen a keresztesvirágúak [24, 25], kávé, tea [26], édesítőszer [27]), valamint egyes megbetegedések (pl. Parkinson kór, gasztrointesztinális daganatok, krónikus rhinosinusitis) és azok tünetei közötti összefüggések felderítésével [28, 29, 30].

3. Célkitűzés

Jelen kutatás célja összefüggések keresése a taster státusz és a testösszetétel, és a különböző keserű ízű élelmiszerek fogyasztási gyakorisága között. Ehhez PTC taster-státusz felmérést, bioimpedancia alapú testösszetétel-meghatározást, valamint egy keserű élelmiszerekre vonatkozó fogyasztási gyakorisági kérdőívet használtunk.

4. Módszer

Az adatfelvételt 2019 februárjában és márciusában végeztük el. A résztvevők a Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Karának, valamint a Semmelweis Egyetem Egészségtudományi Karának magyarországi hallgatói és munkatársai voltak, összesen 170 fő. A taster státusz meghatározásában 170 fő, az testösszetétel-vizsgálatban 96 fő vett részt, az az élelmiszerválasztás gyakorisági kérdőívet (Food Frequency Questionnaire, FFQ) 170 fő töltötte ki. Az adatszolgáltatás minden vizsgálat esetében anonim módon történt. Az egyes adatok összekapcsolásához a résztvevőket kódszámokkal láttuk el. A résztvevőket az általános adatvédelmi rendelet (2016/679 EU rendelet) szerint tájékoztattuk a felvett adatok kezeléséről.

A taster státuszt PTC-vel átitatott papírcsíkokkal határoztuk meg (Precision Europe, Northampton, Egyesült Királyság). A PTC mennyisége csíkonként 20 µg volt. A résztvevőket a papírcsíkok ízlelése után taster és non-taster kategóriákba soroltuk.

A testösszetétel-meghatározást bioelektromos impedancia (BIA) alapú módszerrel, InBody 770 (InBody USA, Cerritos, California) készüléssel végeztük. A módszer az emberi test elektromos tulajdonságain, a különböző szövettypusok vezetőképességén alapul. Egyszerű, noninvasív műszeres módszer, mely igen pontos adatokkal szolgál több antropometriai paraméter, pl. a testzsír százalékos aránya, illetve annak eloszlása esetében is [31]. A felvett adatok közül a testtömegindexet (BMI, kg/m²), a testzsír százalékot (PBF, %), valamint a vizcerális zsír kiterjedését (VFA, cm²) használtuk fel az elemzésekhez [32, 33, 34].

Az FFQ tartalmaz egy specifikus élelmiszerekből vagy élelmiszertípusokból összeállított listát, melyek esetében a kitöltőknek meg kell jelölniük, milyen gyakran fogyasztják az adott élelmiszert, vagy élelmiszertípust [35]. A kérdőívet keserű ízű élelmiszereket is tartalmazó élelmiszercsoportokból állítottuk össze, a fogyasztási gyakoriságot kategóriákkal jelöltük. A kérdőívet Google Űrlapok segítségével hoztuk létre, az adatfelvétel online történt. A felvett adatok közül a kávé- és a teafogyasztás adatait közöljük, melyek esetében nem csak a fogyasztási gyakoriságot, hanem fajtát, illetve a leggyakrabban alkalmazott ízesítési módot is meg kellett adniuk a kitöltőknek. Az eredmények átláthatósága érdekében az FFQ gyakorisági kategóriáit három fő kategóriába vontuk össze, melyet a **2. táblázat** szemléltet.

2. táblázat. A fogyasztási gyakorisági kérdőív kategóriáinak csoportosítása

Kategóriák	Az elemzések során használt csoportosítás
Naponta többször fogyasztom	Gyakran
Naponta fogyasztom	
Heti 1-3 alkalommal fogyasztom	
Havi 1-3 alkalommal fogyasztom	Nem jellemző
1 hónapnál ritkábban fogyasztom	
Nem fogyasztom	Soha

5. Statisztikai elemzések

A résztvevők adatainak elemzéséhez leíró statisztikai módszereket (átlag, szórás, százalék), valamint a felvett adatok kategóriaváltozókká való átalakítását követően kereszttábla-elemzést, többszörös korrespondencia-analízist (Multiple Correspondence Analysis, MCA), valamint Mann-Whitney próbát használtunk, 5%-os szignifikanciaszinten [36]. Az elemzésekhez XLSTAT 2020.1.3; Microsoft® Office Excel® 2016 szoftvereket használtunk.

6. Eredmények

6.1. Demográfiai adatok

A kutatásban 55 férfi és 115 nő vett részt, így a nemek megoszlása 32,35 % férfi és 67,65 % nő. Az adatfelvételkor legfiatalabb résztvevő 19, a legidősebb 40 éves, az átlagéletkor pedig $23,85 \pm 3,05$ év volt. Állandó lakhely szerint 44,70 % budapesti, 55,30 % vidéki lakos. A vidékiek 24,46 %-a pest megyei, ez az összes résztvevő 13,53 %-át teszi ki. Zala és Csongrád-Csanád megyét egy résztvevő sem jelölte meg állandó lakhelyként.

6.1.1. Taster státusz

A taster státusz megoszlása (3. táblázat) szerint a résztvevők 72,94 %-a taster, míg 27,06 %-a non-taster. A non-tasterek aránya a férfiak között 23,63 %, míg a nők között 28,69 % volt. A kereszttábla-elemzés alapján nincs szignifikáns összefüggés a nem és a taster státusz között ($\chi^2(1, n=170)=0,483, p=0,48$).

3. táblázat. A taster státusz felmérés eredménye nemek szerint és összesen (fő, n = 170)

Nem	Taster	Non-taster
Férfi	42	13
Nő	82	33
Összesen	124	46

6.1.1.1. A testösszetétel-meghatározás eredményei, és annak összefüggései a taster státusszal

A testösszetétel-meghatározást 23 férfi és 73 nő, összesen 96 fő esetében végeztük el. Az elemzéshez használt adatok átlagait a 4. táblázat tartalmazza.

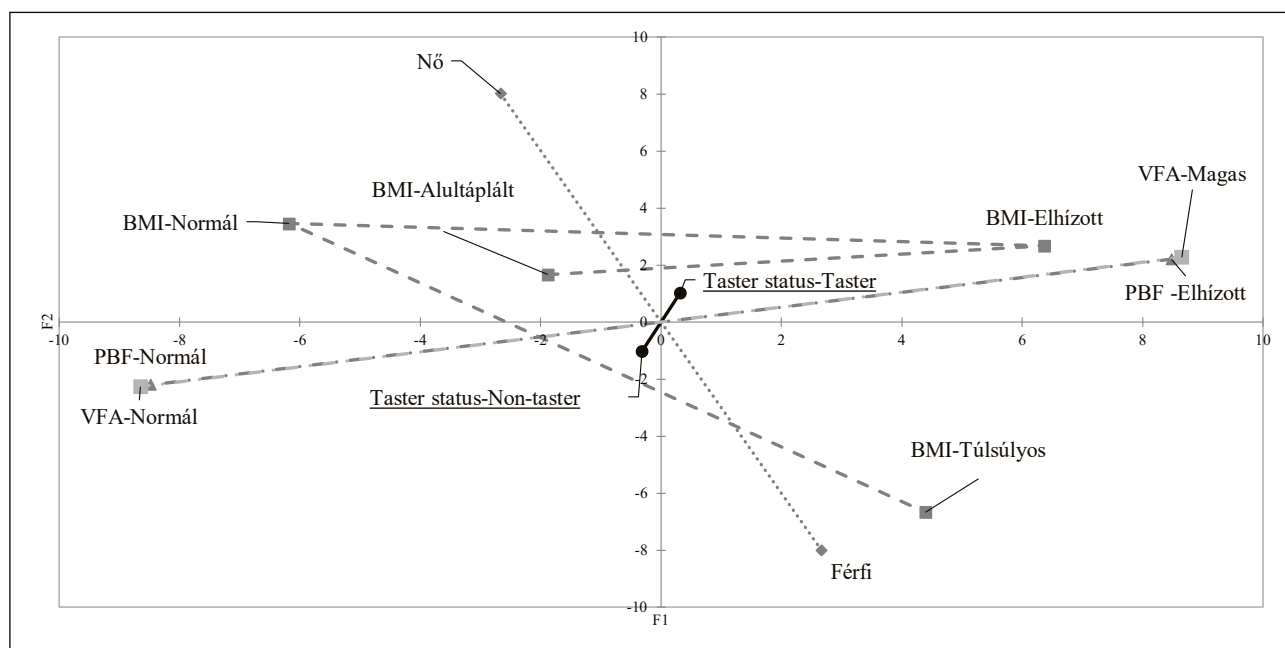
4. táblázat. A testösszetétel-meghatározás során felvett adatok (átlag ± szórás, n = 96)

Nem	Testmagasság (cm)	Testtömeg (kg)	Testtömegindex (BMI, kg/m ²)	Testzsír-százalék (PBF, %)	Viszcerális zsír kiterjedése (VFA, cm ²)
Férfi/Male	180,57±6,37	83,15±1,85	25,53±3,69	20,19±7,18	74,46±33,85
Nő/Female	166,34±6,58	61,75±10,62	22,29±3,50	27,91±6,75	76,63±37,95

A férfiak között a BMI alapján 11 fő túlsúlyos (BMI 25,0-29,9) és 3 fő elhízott (BMI > 30,0) volt. A testzsírszázalék-értékek alapján 6 fő volt elhízott (PBF > 27 %), míg a viszcerális zsír kiterjedése 5 fő esetében volt magasabb, mint a 100 cm²-es felső határérték.

A nők között a BMI szerint 5 fő alultáplált (BMI<18,5), 7 fő túlsúlyos, valamint 3 fő elhízott volt. A testzsírszázalék-értékek alapján 18 fő volt elhízott (PBF > 32 %), a viszcerális zsír kiterjedése pedig 15 fő esetében haladta meg a 100 cm²-t.

A statisztikai elemzések alapján nem találtunk szignifikáns összefüggést egyik obezitást jelző paraméter és a taster státusz között sem (BMI: $\chi^2(3, n=96)=0,42, p=0,93$; PBF: $\chi^2(1, n=96)=0,45, p=0,50$; VFA: $\chi^2(1, n=96)=0,01, p=0,90$). A **2. ábrán** látható többszörös korrespondenciaelemzés eredményei alapján elmondható, hogy az egyes jelző paraméterek egymással összefüggnek. A **2. ábrán** látható mintázat alapján a non-tasterek közelebb helyezkednek el a normál testösszetételt és testtömeget jelző kategóriákhoz. A keresztábra-elemzés alapján BMI alapján a nőkhöz képest a férfiak esetében szignifikánsan magasabb volt a túlsúlyosak aránya, mint a normál kategóriába tartozóké ($\chi^2(3, n=96)=21,52, p<0,0001$).



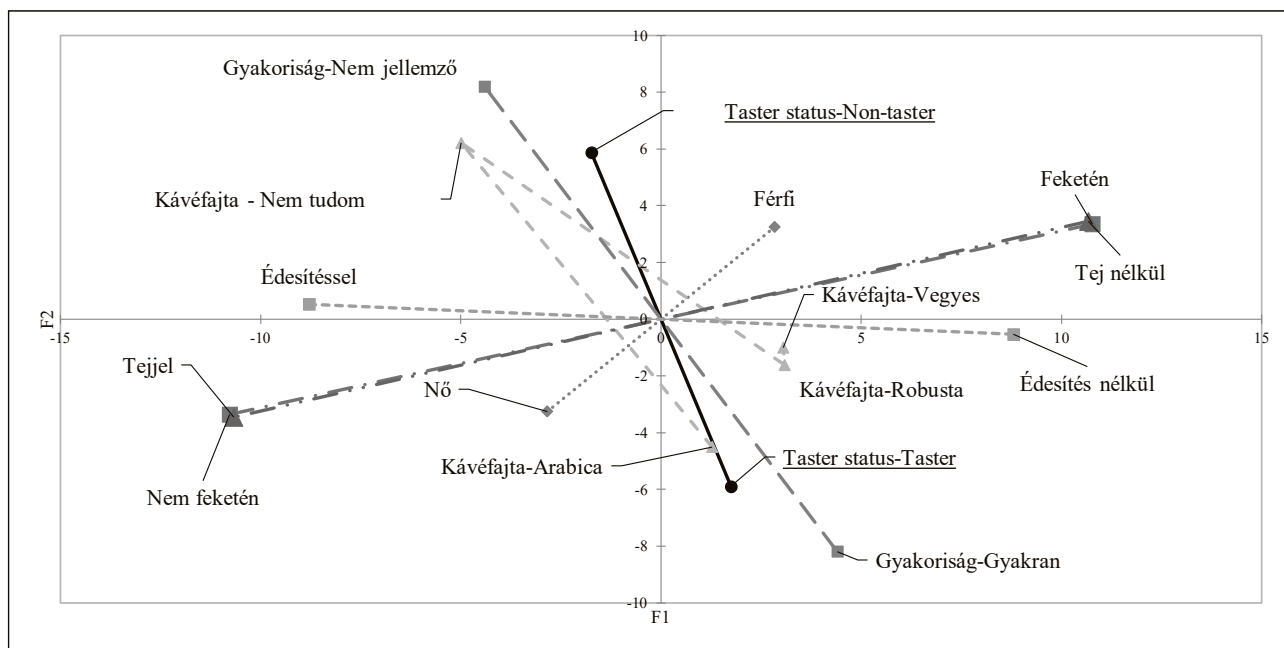
2. ábra. A többszörös korrespondenciaelemzés eredményei a taster státusz, a nem, és a testösszetételt jellemző paraméterek esetében ($n = 96, p=0,05$)

Rövidítések: BMI = Body Mass Index (testtömegindex); PBF = Percent Body Fat (testzsírszázalék); VFA = Visceral Fat Area (viszcerális zsír kiterjedése)

6.1.1.2. A kávéfogyasztás és a taster státusz összefüggései

Az FFQ-t kitöltők közül 27 ember nem fogyaszt kávé, így az ő adataik az elemzésbe nem kerültek bele. A „Tejjel” kategória a tejjel, tejpótlóval, tejtermékkel való ízesítést, az „Édesítéssel” kategória a bármilyen édesítőszerrel (cukor, mesterséges és természetes édesítőszer) való fogyasztást jelöli. A „Vegyes” kávéfajta az Arabica és a Robusta felváltva, vagy blend-ként való fogyasztását jelöli. 143 kávéfogyasztó közül 24 feketén (édesítés és tej, vagy tejpótló nélkül) fogyasztja az italt.

A keresztábra-elemzés alapján nem áll fenn szignifikáns összefüggés a taster státusz és a kávéfogyasztás ($\chi^2(1, n=170)=0,02, p=0,88$), a fogyasztási gyakoriság ($\chi^2(1, n=143)=2,57, p=0,10$), és a fogyasztott kávéfajta ($\chi^2(3, n=143)=4,21, p=0,24$) között. Szintén nem találtunk szignifikáns összefüggést a feketén ($\chi^2(1, n=143)=0,60, p=0,43$), tejjel ($\chi^2(1, n=143)=0,28, p=0,59$), valamint az édesítve ($\chi^2(1, n=143)=0,17, p=0,67$) való fogyasztás, és a taster státusz között. A többszörös korrespondencia analízis mintázata (**3. ábra**) alapján azonban megfigyelhető, hogy a non-tasterek kevésbé gyakran fogyasztanak kávé, mint a tasterek, és a kávéfajtát sem tudják pontosan megnevezni. Amikor kávé fogyasztanak, édesítik azt. A tasterekhez az Arabica fajta áll a legközelebb, és általában nem édesítik a kávé. A tejjel való ízesítés nem feltétlenül jár együtt az édesítéssel. A nemek szempontjából egyértelmű különbség látszik: a nők között szignifikánsan több volt a kávéfogyasztó ($\chi^2(1, n=143)=3,65, p=0,05$), valamint a nők inkább tejjel és édesítve, míg a férfiak tej nélkül, feketén preferálják a kávé. Ezt a keresztábra elemzés is alátámasztotta (Feketén fogyasztás: $\chi^2(1, n=143)=3,46, p=0,05$; Tejjel fogyasztás: $\chi^2(1, n=143)=6,51, p=0,01$).



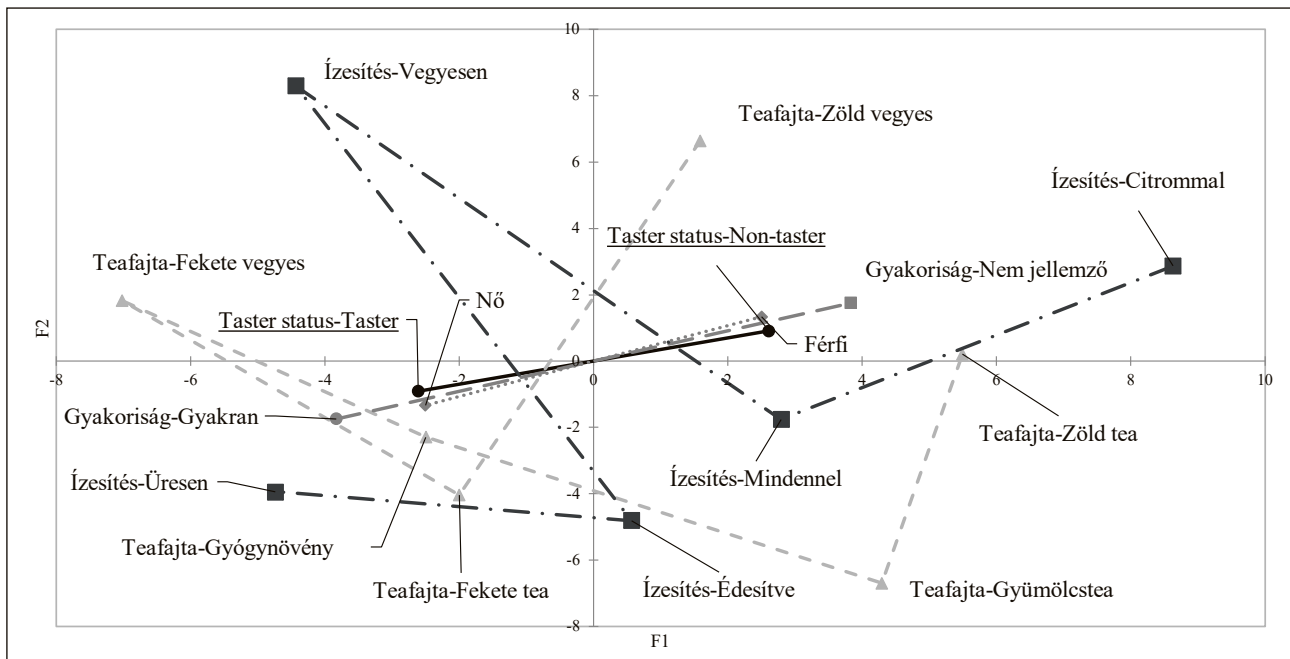
3. ábra. A kávéfogyasztás összefüggései a taster státusszal és a nemmel ($n = 143$, $p=0,05$)
 Rövidítések: 'Tejjel' = tejjel, tejpótlóval, tejtermékkel való ízesítés, 'Édesítéssel' = bármilyen édesítőszerrel (cukor, mesterséges és természetes édesítőszer) való ízesítés, 'Kávéfajta - Vegyes': Arabica és a Robusta felváltva, vagy blend-ként (keverékként) való fogyasztás

6.1.1.3. A teafogyasztás és a taster-státusz összefüggései

A kitöltők közül 14 fő jelölte, hogy nem fogyaszt teát, így adataikat nem elemeztük. A „Fekete vegyes” kategória több teafajta, köztük fekete tea rendszeres fogyasztását jelenti. A „Zöld vegyes” a fekete teán kívül több más teafajta rendszeres fogyasztását jelenti. Az „Édesítve” kategória a bármilyen édesítőszerrel (cukor, mesterséges és természetes édesítőszer) való teafogyasztást jelöli. Az „Ízesítés - Vegyesen” kategória az alkalmanként eltérő ízesítést (egyszer édesítve, és/vagy citrommal, egyszer ízesítés nélkül stb.), az „Ízesítés - Mindennel” pedig a cukorral és citrommal való fogyasztást jelöli. 156 teafogyasztó közül 57 fő ízesítés nélkül (édesítőszer, citrom hozzáadása nélkül) fogyasztja az italt.

Elemzéseink során nem találtunk szignifikáns összefüggést a taster státusz és a teafogyasztás ($\chi^2(1, n=170)=1,26$, $p=0,26$), annak gyakorisága ($\chi^2(1, n=156)=0,95$, $p=0,32$), a fogyasztott teafajták ($\chi^2(5, n=156)=2,57$, $p=0,76$) és az ital ízesítési módjai ($\chi^2(4, n=156)=5,13$, $p=0,27$) között. A nemek esetében szintén nem találtunk szignifikáns összefüggést.

A többszörös korrespondencia-analízis ábráján (4. ábra) látható mintázat alapján a nők és a taster-ek gyakrabban fogyasztanak teát, azon belül is fekete- és gyógynövényteákat, ízesítés nélkül, vagy édesítve. A férfiak és a non-taster-ek ritkábban fogyasztanak teát, valamint a zöld teákat részesítik előnyben, citrommal ízesítve és édesítve, vagy csak citrommal. Kizárólag gyümölcstea fogyasztása, illetve alkalmanként eltérő ízesítés alkalmazása a kitöltők körében nem jellemző.



4. ábra. A teafogyasztás összefüggései a taster státusszal és a nemmel ($n = 156, p=0,05$)
 Rövidítések: 'Teafajta - Fekete vegyes' = több teafajta, köztük fekete tea rendszeres fogyasztása, 'Teafajta - Zöld vegyes': a fekete teán kívül több más teafajta rendszeres fogyasztása, 'Édesítve': bármilyen édesítőszerrel (cukor, mesterséges és természetes édesítőszerrel) való ízesítés, 'Ízesítés - Vegyesen': alkalmanként eltérő ízesítés (egyszer édesítve, és/vagy citrommal, egyszer ízesítés nélkül stb.), 'Ízesítés - Mindennel': cukorral és citrommal való ízesítés

7. Megbeszélés

A taster és non-taster kategóriák arányai megegyeznek a nemzetközi szakirodalomban közölt adatokkal, melyek szerint amerikai és kaukázusi populációban 70 % / 30 % az eloszlás [6, 37].

A taster státusz és a BMI között nem találtunk szignifikáns összefüggést, hasonlóan korábbi kutatásokhoz [17, 38]. Ezzel szemben más kutatók kimutattak szignifikáns összefüggéseket a paraméterek között [39]. A szakirodalmi adatok ez alapján ellentmondások, nincs konszenzus a kutatók között. Új eredményeink alapján nem találtunk összefüggést a taster státusz és a testzsír százalék, a viszcerális zsír kiterjedése között sem.

Vizsgálataink során a túlsúlyos BMI kategórián belül szignifikáns különbséget találtunk a két nem között. Ennek oka a két nem eltérő izomtömege: a BMI nem tesz különbséget a zsírszövet és a zsírmentes szövetek között, valamint nem kalkulál a testzsír eloszlásával sem, így, bár specifikitása nagy, érzékenysége alacsonynak tekinthető [40]. A résztvevő férfiak esetében a vázizomtömeg szignifikánsan magasabb volt (Mann-Whitney $U=1664, n_1 = 23, n_2 = 73, p < 0,0001$, kétoldali), így közülük többen kerültek a túlsúlyos kategóriába.

Noha a kávéfogyasztás esetében nem találtunk szignifikáns összefüggéseket, a többszörös korrespondenciaelemzés alapján azonban tendenciák figyelhetők meg. A non-tasterek kevésbé gyakran fogyasztanak kávé, és nem is tudják megnevezni a fogyasztott kávé fajtáját. Ezek valószínűleg összefüggenek egymással, hiszen a kávéfogyasztás iránt kevésbé érdeklődők a kávé fajtája iránt is kisebb érdeklődést mutathatnak. Amikor kávé fogyasztanak, édesítik azt, ez a tasterok esetében kevésbé jellemző, melyet szakirodalmi adatok is alátámasztanak [41]. A nemek esetében a kávé eltérő ízesítéssel, illetve ízesítés nélkül („Feketén”) való preferálása esetleg egy-egy társadalmi elvárásból fakadó magatartásnak tulajdonítható, mely szerint a rövid eszpresszó kávé (espresso shot) fogyasztása férfiasabb, míg a tejjel-édesítéssel készült kávéitaloké (pl. milk espresso) nőiesebb [42].

A teafogyasztás esetében sem találtunk szignifikáns összefüggéseket, azonban tendenciózus eredményeink összhangban vannak a nemzetközi szakirodalommal, miszerint a tasterok kevésbé preferálják a zöld teákat [43, 44].

A kutatás limitációja, hogy demográfiai szempontból nem volt reprezentatív. A vizsgálatok során kereskedelmi forgalomban kapható tesztcsíkokkal dolgoztunk, melyeknél pontosabb eredményekkel szolgálhatnak PTC vagy PROP oldatsorokkal végzett tesztek.

8. Következtetés

A szakirodalmi adatok, és saját eredményeink alapján nem zárható ki, hogy összefüggés áll fenn a genotípus és a testösszetétel, valamint az élelmiszerválasztás között. Valószínűleg azonban nem a genotípus, hanem a fenotípus (taster – non-taster) az, ami közvetetten, a preferenciákon és az élelmiszerválasztáson keresztül hozzájárulhat az elhízáshoz, és az ahhoz köthető betegségek kialakulásához. Mivel azonban az étkezési szokásokat és az élelmiszerpreferenciákat más, pl. szociodemográfiai és pszichológiai faktorok is befolyásolják, ezek hatása felülírhatja a fenotípus alapján „törvényszerűnek” vélt következményeket (keserű íz kedvelése/kerülése). További, nagymintás, reprezentatív kutatások eredményei szükségesek a feltételezések igazolásához.

9. Nyilatkozatok

Anyagi támogatás: A projekt az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 számú pályázat támogatásával készült. Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-3-I-SZIE-65 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült. A szerzők köszönik a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatását (FK 137577).

Szerzői munkamegosztás: Kísérlettervezés: BB, LA, VBM, GA; Adatgyűjtés: BB, KD, LA, VBM, KZ; Adatelemzés: BB, GA; Kézirat elkészítése: BB, GA, KZ; Kézirat felülvizsgálata, jóváhagyása: BB, GA, KD, LA, VBM, KZ.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Köszönetnyilvánítás: Biró Barbara köszöni a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Élelmiszertudományi Doktori Iskola támogatását. Gere Attila köszöni a Prémium Posztdoktori Program és az NKFIH K134260 számú projektjének támogatását. A szerzők köszönik a kutatásban részt vevők közreműködését.

10. Irodalom

- [1] Miller-Keane, O'Toole M. (2003): Miller-Keane Encyclopedia & Dictionary of Medicine, Nursing & Allied Health, 7th ed. Saunders, Philadelphia.
- [2] Purves D; Augustine G. J; Fitzpatrick D; et al. (2004): Neuroscience, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- [3] Gottfried J. A. (2011): Neurobiology of Sensation and Reward, 1st ed. CRC Press, Boca Raton. DOI: <https://doi.org/10.1201/b10776>
- [4] Meyerhof W; Behrens M; Brockhoff A; et al. (2005): Human bitter taste perception. Chemical Senses, 30 (Suppl 1) pp. 14-15. DOI: <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh089>
- [5] Wieczorek M. N; Walczak M; Skrzypczak-Zielińska M; et al. (2017): Bitter taste of Brassica vegetables: the role of genetic factors, receptors, isothiocyanates, glucosinolates and flavor context. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58 (18) pp. 3130-3140. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1353478>
- [6] Tepper B. J. (2008): Nutritional Implications of Genetic Taste Variation: The Role of PROP Sensitivity and Other Taste Phenotypes. Annual Review of Nutrition, 28 pp. 367-388. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155458>
- [7] Beckett E. L; Martin C; Yates Z; et al. (2014): Bitter taste genetics - the relationship to tasting, liking, consumption and health. Food and Function, 5 (12) pp. 3040-3054. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4FO00539B>
- [8] Kurihara K. (2009): Glutamate: From discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). American Journal of Clinical Nutrition, 90 (3) pp. 1-3. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462D>
- [9] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database. Phenylthiourea, CID=676454. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylthiourea>. (Hozzáférés: 2020. 05. 20.)
- [10] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database. Propylthiouracil, CID=657298. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylthiouracil>. (Hozzáférés: 2020. 05. 20.)
- [11] Trivedi B. P. (2012): The finer points of taste. Nature, 486 S2-S3. DOI: <https://doi.org/10.1038/486S2a>
- [12] Bartoshuk L. M; Duffy V. B; Miller I. J. (1994): PTC/PROP Tasting: Anatomy, Psychophysics, and Sex Effects. Physiology and Behavior, 56 (6) pp. 1165-1171. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90361-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90361-1)

- [13] Hayes J. E; Keast R. S. J. (2011): Two decades of supertasting: Where do we stand? *Physiology and Behavior*, 104 (5) pp. 1072-1074.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.003>
- [14] Brookes A. J. (1999): The essence of SNPs. *Gene*, 234 (2) pp. 177-186.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- [15] National Center for Biotechnology Information and U.S. National Library of Medicine Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
(Hozzáférés: 2020. 05. 20.)
- [16] Kim U. K; Drayna D. (2005): Genetics of individual differences in bitter taste perception: Lessons from the PTC gene. *Clinical Genetics*, 67 (4) pp. 275-280.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00361.x>
- [17] Deshaware S; Singhal R. (2017): Genetic variation in bitter taste receptor gene TAS2R38, PROP taster status and their association with body mass index and food preferences in Indian population. *Gene*, 627 pp. 363-368.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.047>
- [18] Campbell M. C; Ranciaro A; Froment A; et al. (2012): Evolution of functionally diverse alleles associated with PTC bitter taste sensitivity in Africa. *Molecular Biology and Evolution*, 29 (4) pp. 1141-1153.
DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr293>
- [19] Forrai Gy; Bánkövi Gy. (1967): Phenylthiocarbamid-ízlelőképesség vizsgálata budapesti gyermekpopulációban. *Orvosi Hetilap*, 108 (36) pp. 1681-1687.
DOI: <https://doi.org/10.1556/650.1967.09.03>
- [20] Fischer R; Griffin F; England S; et al. (1961): Taste Thresholds and Food Dislikes. *Nature*, 191 pp. 1328. DOI: <https://doi.org/10.1038/1911328a0>
- [21] Carta G; Melis M; Pintus S; et al. (2017): Participants with Normal Weight or with Obesity Show Different Relationships of 6-n-Propylthiouracil (PROP) Taster Status with BMI and Plasma Endocannabinoids. *Scientific Reports*, 7 (1) pp. 1-12.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01562-1>
- [22] Choi J. H; Lee J; Yang S; et al. (2017): Genetic variations in taste perception modify alcohol drinking behavior in Koreans. *Appetite*, 113 pp. 178-186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.022>
- [23] Yang Q; Dorado R; Chaya C; et al. (2018): The impact of PROP and thermal taster status on the emotional response to beer. *Food Quality and Preference*, 68 pp. 420-430.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.03.001>
- [24] Shen Y; Kennedy O. B; Methven L. (2016): Exploring the effects of genotypical and phenotypical variations in bitter taste sensitivity on perception, liking and intake of brassica vegetables in the UK. *Food Quality and Preference*, 50 pp. 71-81.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.01.005>
- [25] Mezzavilla M; Notarangelo M; Concas M. P; et al. (2018): Investigation of the link between PROP taste perception and vegetables consumption using FAOSTAT data. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70 (4) pp. 484-490. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1519527>
- [26] De Toffoli A; Spinelli S; Monteleone E; et al. (2019): Influences of Psychological Traits and PROP Taster Status on Familiarity with and Choice of Phenol-Rich Foods and Beverages. *Nutrients*, 11 (6) pp. 1329. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11061329>
- [27] Yang Q; Kraft M; Shen Y; et al. (2019): Sweet Liking Status and PROP Taster Status impact emotional response to sweetened beverage. *Food Quality Preference*, 75 pp. 133-144.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.02.016>
- [28] Cossu G; Melis M; Sarchioto M; et al. (2018): 6-n-propylthiouracil taste disruption and TAS2R38 nontasting form in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33 (8) pp. 1331-1339.
DOI: <https://doi.org/10.1002/mds.27391>
- [29] Choi J; Kim J. (2019): TAS2R38 Bitterness Receptor Genetic Variation and Risk of Gastrointestinal Neoplasm: A Meta-Analysis. *Nutrition and Cancer - An International Journal*, 71 (4) pp. 585-593. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1559935>
- [30] Dżaman K; Zagor M; Sarnowska E; et al. (2016): The correlation of TAS2R38 gene variants with higher risk for chronic rhinosinusitis in Polish patients. *Otolaryngologia Polska - The Polish Otolaryngology*, 70 (5) pp. 13-18. DOI: <https://doi.org/10.5604/00306657.1209438>
- [31] Dubiel A. (2019): Bioelectrical impedance analysis in medicine. *World Scientific News*, 125 pp. 127-138.

- [32] WHO (2000): Obesity: Preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series 894, Geneva.
- [33] American Council on Exercise (2020): Percent Body Fat Norms for Men and Women. ACE - Tools & Calculators. <https://www.acefitness.org/education-and-resources/lifestyle/tools-calculators/percent-body-fat-calculator/?fbclid=IwAR0Ahy-PUqFswqVZRos5wQvMNSxOQ46RtH7qwCZpvR6jd2haKxK6CgLsEs> Hozzáférés: 2020. 06. 18.
- [34] InBody USA. InBody 770 Result Sheet Interpretation. <https://inbodyusa.com/general/770-result-sheet-interpretation/> (Hozzáférés: 2020. 06. 18.)
- [35] Welch A. A. (2013): Dietary intake measurement: Methodology. In: Caballero B. (ed.): Encyclopedia of Human Nutrition, 3rd ed; vol. 2. Academic Press, Oxford, pp. 65-73. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00075-1>
- [36] Greenacre M. (2017): Correspondence Analysis in Practice, 3rd ed. Chapman and Hall/CRC, New York. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315369983>
- [37] Tepper B. J. (1999): Does genetic taste sensitivity to PROP influence food preferences and body weight? *Appetite*, 32 (3) pp. 422. DOI: <https://doi.org/10.1006/appe.1999.0240>
- [38] Yackinous C. A; Guinard J. (2002): Relation between PROP (6-n-propylthiouracil) taster status, taste anatomy and dietary intake measures for young men and women. *Appetite*, 38 (3) pp. 201-209. DOI: <https://doi.org/10.1006/appe.2001.0481>
- [39] Choi S. E; Chan J. (2015): Relationship of 6-n-propylthiouracil taste intensity and chili pepper use with body mass index, energy intake, and fat intake within an ethnically diverse population. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115 (3) pp. 389-396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.09.001>
- [40] Adab P; Pallan M; Whincup P. H. (2018): Is BMI the best measure of obesity? *BMJ*, 360 pp. 15-16. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.k1274>
- [41] Masi C; Dinnella C; Monteleone E; et al. (2015): The impact of individual variations in taste sensitivity on coffee perceptions and preferences. *Physiology and Behavior*, 138 pp. 219-226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.031>
- [42] Reitz J. K. (2007): Espresso. *Food, Culture and Sociology*, 10 (1) pp. 7-21. DOI: <https://doi.org/10.2752/155280107780154114>
- [43] Chamoun E; Mutch D. M, Allen-Vercoe E; et al. (2018): A review of the associations between single nucleotide polymorphisms in taste receptors, eating behaviors, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (2) pp. 194-207. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1152229>
- [44] Pasquet P; Oberti B; El Ati J; et al. (2002): Relationships between threshold-based PROP sensitivity and food preferences of Tunisians. *Appetite*, 39 (2) pp. 167-173. DOI: <https://doi.org/10.1006/appe.2002.0503>

Barbara BIRÓ^{1*}, Dániel KOREN², Adrienn LICHTHAMMER³,
Márta VERESNÉ BÁLINT³, Attila GERE¹, Zoltán KÓKAI¹

DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2022/2-1-ENG>

Received: January 2022 – Accepted: March 2022

Relationships amongst phenylthio-carbamide sensitivity, body composition, coffee and tea consumption

Keywords: taste perception, single nucleotide polymorphism, electric impedance, Body Mass Index, food preferences

1. SUMMARY

Polymorphisms of TAS2R38 gene responsible for bitter taste perception elicit a bimodal receptor response in the population upon the detection of phenylthiocarbamide and 6-n-propylthiouracil, respectively. Genetic differences in sensitivity to phenylthiocarbamide and 6-n-propylthiouracil may affect body composition, food preferences, and frequency of consuming different food types. To date, no publication has been published in Hungary on the joint study of these factors.

The aim of the present research is to find correlations between phenylthiocarbamide taster status and body composition, and the frequency of consumption of different bitter-tasting foods.

In the study, a taster status survey of participants (n = 170), a bioimpedance-based body composition analysis (n = 96) and completed a food frequency questionnaire of bitter foods (n = 170) were conducted.

Descriptive statistical methods, cross-tabulation analysis, multiple correspondence analysis, and Mann-Whitney test were used for data analysis at 5% significance level.

The proportions of the taster and non-taster categories proved to be the same as reported by international literature (70%/30% respectively). There were no significant correlations among taster status and the other examined parameters, however, based on the multiple correspondence analysis, the observed trends are in accordance with the international literature. There were significant correlations among gender, body composition and some variables describing food preference.

Based on the literature data and our own results, there can be a relationship between genotype and body composition, and genotype and food choice. Further analyses with large-sample size and representative research are needed to substantiate these assumptions.

¹ Institute of Food Science and Technology, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences

² Pécsi Brewery

³ Department of Dietetics and Nutritional Sciences, Semmelweis University, Faculty of Health Sciences

Barbara BIRÓ
Dániel KOREN
Adrienn LICHTHAMMER
Márta VERESNÉ BÁLINT
Attila GERE
Zoltán KÓKAI

barbarabirophd@gmail.com
danikoren3@gmail.com
lichthammera@se-etk.hu
veresne@se-etk.hu
gere.attila@uni-mate.hu
kokai.zoltan@uni-mate.hu

<https://orcid.org/0000-0001-5042-8169>
<https://orcid.org/0000-0002-3663-5636>
<https://orcid.org/0000-0003-4619-4907>
<https://orcid.org/0000-0001-7356-8156>
<https://orcid.org/0000-0003-3075-1561>
<https://orcid.org/0000-0002-1158-721X>

Abbreviations:

PTC: phenylthiocarbamide; PROP: propylthiouracil; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; GPCR: G Protein Coupled Receptor; PAV: Proline-Alanine-Valine; AVI: Alanine-Valine-Isoleucine; AAI: Alanine-Alanine-Isoleucine; PAI: Proline-Alanine-Isoleucine; PVI: Proline-Valine-Isoleucine; AAV: Alanine-Alanine-Valine; FFQ: Food Frequency Questionnaire; BIA: Bioelectrical Impedance Analysis; BMI: Body Mass Index; PBF: Percentage of Body Fat; VFA: Visceral Fat Area; MCA: Multiple Correspondence Analysis.

2. Introduction

Humans perceive their environment and its relation to them through their sense organs and senses. Five major senses are distinguished: sight, hearing, touch, olfaction, and gustation. There are further channels of sensations also known, e.g. balance, hunger, thirst, pain or discomfort [1]. Perception of taste and flavours are related to the oral and nasal area, including the sense of smell and the trigeminal sensation through the chemosensory system. It belongs to the chemical senses, and it focuses on the perception of the chemicals in our environment. Taste receptors detect the chemicals in the consumed food, which are generally called tastants. These are usually water-soluble molecules, which provide information on the quality and safety of food [2].

Taste perception is a direct contact process, which takes place in the oral cavity. The receptors can be found on the surface of the tongue, in the pharynx, on the palate and in the upper part of the oesophagus. Receptors are organized in the taste buds, which are located in the taste papillae. The sensory information is transferred through the VII; IX. and X. cranial nerves, then the brainstem's and the thalamus' nuclei and finally arrives to the frontal operculum and the gustatory cortex of the insula. These areas and the nuclei of tractus solitarius in the brainstem are linked with the hypothalamus and the amygdala, thus probably influencing hunger and satiety, homeostatic reactions to eating and any emotions linked to eating [2, 3].

Bitter taste often triggers a rejection, which is an innate human reaction. On one hand, this aversive reaction is due to the fact, that many bitter tasting compounds (secondary plant metabolites, e.g. alkaloids, some inorganic and synthetic compounds, and in case of food the rancid fat) are toxic, thus consuming them might be harmful, or life-threatening [4].

On the other hand, several bitter tasting compounds are known, which have beneficial effect from the pharmacological or nutritional point of view. These compounds are for example the glucosinolates and their decomposition products, the isocyanates, which are found in cabbage, broccoli or brussels sprouts (all belong to the *Brassicaceae* family). Coffee, tea, and cocoa contains methylated xanthine derivatives, like caffeine, theophylline, and theobromine; in beers we find the alpha-acids, which originate from the hop and are mainly responsible for the bitter taste. In case of the vegetable species, the bitter taste note might trigger rejection, in the case of the latter products; bitterness is an expected part of their sensory character [5, 6, 7].

In the field of taste perception, five basic tastes are distinguished: sweet, salty, sour, bitter and umami. This last one was accepted as a basic taste following the discovery of its specialized taste receptor in 2002 [8]. Among the five basic quality, the detection of bitter taste is the most complex; the TAS2R gene family, which consists of 25 functional genes, performs its regulation. These genes are coding the TAS2Rs receptors, which structurally bind to given bitter taste compounds (ligands), however in case of several receptors, their ligands is not identified yet [7].

Phenylthiocarbamide (PTC, also known as 1-phenylthiourea) and the 6-n-propylthiouracil (PROP) are colourless or white, crystalline, bitter tasting organic compounds: both have sulphur containing (SCN) functional group. Their use is different: phenylthiocarbamide is used as an industrial additive, colorant, while the propylthiouracil is applied as an antithyroid agent in case of hyperthyroidism [9, 10]. The structure of PTC and PROP shown in the **figure 1**.

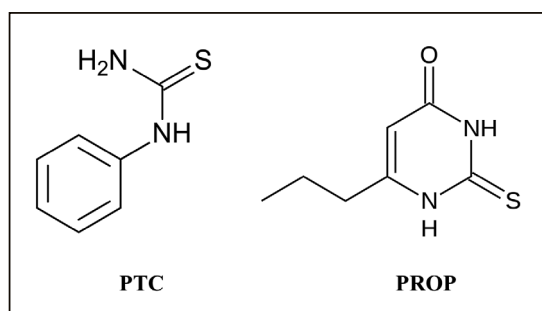


Figure 1. The chemical structure of phenyl-thiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil

Peculiarity of these two compounds, that they trigger a bimodal reaction in humans: a part of the population is able to perceive their bitter taste, while others not. Its discovery is linked to the chemist Arthur Fox. In 1931, Fox working in a laboratory of the DuPont chemical company accidentally released some fine crystalline PTC to the atmosphere of the room. A colleague working nearby complained on perceiving bitter taste. Fox did not perceive any bitter taste, despite the fact that he directly contacted the fine dust. After this occasion, he tested his family and friends, and categorized the individuals as ‘taster’ or ‘non-taster’. Laurence Hasbrouck Synder geneticist, who identified that the inheritance of the non-taster status is a recessive phenomenon according to the Mendelian genetics [11], strengthened his results.

In the 1960’s the issue of changing of PTC to PROP has risen, because of the strong, sulphuric odour of PTC. In the 1980’s toxicological information also questioned the use of PTC, so researchers started to work with PROP after the comparison of the two compounds and measuring the threshold concentration of PROP [12].

Bartoshuk and co-workers discovered in 1991, that the non-taster group gives relatively homogenous responses, while the reaction of tasters were much more different, and one of their subgroups perceived the bitter taste of PROP much more intensively. Individuals, belonging to that subgroup were called *supertasters*. The supertaster status is not influenced by the genotype responsible for the taster status, but this discovery resulted in a third type of classification label, *medium taster* [13].

Taster status is defined by some variations of the genetic domain; in this case the single nucleotide polymorphisms (SNP). SNP’s are DNA sequence variations that affect one nucleotide, which are identified between the genetic domains of two individuals belonging to the same species. Each human genome has a unique SNP pattern, but these changes might be called SNP, if they show up at least in 1% of the total population. SNP’s are usually the results of errors during the DNA replication, or caused by DNA damage. They might be located in genes (both in coding and in non-coding sections), and between genes (intergenetically), thus might cause change in structure or in functions [14].

A database (dbSNP) is collecting these SNP’s, was created in 1999 by the American National Centre for Biotechnology Information and the National Human Genome Research Institute. The number of discovered SNP’s was dramatically increased by the Human Genome Project, which mapped the whole humane genome in 2003, thus resulting a total number of more than 650 million SNP’s in the database up to date (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) [15].

In case of PTC or PROP sensitivity the SNP’s of TAS2R28 gene (responsible for bitter taste perception) define, whether the individual perceives bitter taste or not. This gene codes a heptahelical (including seven transmembrane domain), G-protein coupled bitter taste perceiving receptor, which binds to the N-C=S group of the compounds. In this case, the gene contains 1002 nucleotides, from which 3 are functionally missense-coding SNP’s, which cause a non-synonym changes, thus modifying the structure of the coded protein.

The amino acid sequence of this protein is shown in **Table 1**.

Table 1. Polymorphisms of TAS2R38 gene, and the amino acids of the coded protein based on [16, 17]

Position of the nucleotide	SNP allele	Position of the amino acid	The encoded amino acid
145	rs713598 – Cytosine	49	Proline
	rs713598 – Guanine		Alanine
785	rs1726866 – Cytosine	262	Alanine
	rs1726866 – Thymine		Valine
886	rs10246939 – Guanine	296	Valine
	rs10246939 – Adenine		Isoleucine

The two most frequent haplotype are the PAV and AVI. Individuals having dominant PAV/PAV, or PAV/AVI diplotype are usually belong to the taster group, while the recessive AVI/AVI diplotypes are non-tasters. With a much lower occurrence (1-5%), AAI, PAI, PVI and AAV haplotypes also occur in some ethnics and populations. In case of PVI and AAV the two status is usually balanced. Based on the studies it might can be concluded that the occurrence of the taster status varies between 55% and 85%, depending on the investigated population [16, 17, 18].

In Hungary, György Forray paediatrician and György Bánkövi mathematician performed a survey on children aged 7-15, in Budapest in 1967. During their study, they applied the Harris-Kalmus method with PTC solutions in order to measure the taste threshold of the children, and thus they concluded their taster status. According to their results 67.8% of the children belonged to the taster group, but they did not find a significant correlation between gender and taster status. They have published their research in the journal *Orvosi Hetilap* [19].

From the anatomic point of view the polymorphysm has a relationship with the number of taste buds: tasters have more fungiform papillae and more taste pores [12].

The study of PTC and PROP sensitivity's effect on other factors have started in the 1960's. The psychopharmacologist researcher Roland Fischer (born in Hungary) was the first, who assumed that there might be a relationship between taste perception and food preference [20]. Even until now several researchers study the relationship between taster status (and its haplo- and diplotypes) and body mass index [17, 21], food preference and frequencies of different food consumption (e.g. alcoholic drinks [22, 23], vegetables, especially the Brassicales [24, 25], coffee, tea [26], sweeteners [27]), and some diseases (e.g. Parkinson-disease, gastrointestinal tumours, chronic rhinosinusitis) and their symptoms [28, 29, 30].

3. Scope

The scope of the current research is to investigate correlations between taster status, body composition and the consumption frequency of bitter tasting foods. To achieve that we have performed PTC status survey, bioimpedance-based body composition measurement and used a food frequency questionnaire focused on bitter tasting foods.

4. Methods

Data collection took place in February and March of 2019, participants were volunteers from the Food Science Faculty of Szent István University, and Faculty of Health Sciences, Semmelweis University (students and staff), altogether 170 people. In the taster status survey 170 people participated, in the body composition study we had 96 participants, the food frequency questionnaire (FFQ) was filled out by 170 individuals. All data were recorded anonymously. To link the different type of data, all participants received an individual code. Participants were informed on the data handling according to the general GDPR guidelines (Regulation (EU) 2016/679).

Taster status was defined with PTC-impregnated paper strips (Precision Europe, Northampton, United Kingdom). PTC is present at 20 micrograms per strip. Individuals were assigned to the taster or non-taster category based on their responses after tasting the paper strips.

The body composition was measured with an InBody 770 (InBody USA, Cerritos, California) device, which works based on bioelectric impedance analysis (BIA). This method relies on the different levels of conductivity of the human body's tissues. The measurement is simple and non-invasive, which provides accurate data for several anthropometric parameters, e.g. percentage of body fat, and its distribution [31]. From the recorded data set we have used the body mass index (BMI, kg/m²), the body fat percentage (PBF, %) and the visceral fat area (VFA, cm²) for further analysis [32, 33, 34]. The FFQ questionnaire involves a list of specific foods or food types, and respondents have to indicate the consumption frequency of these items [35]. Our questionnaire was assembled including bitter tasting food types, consumption frequencies were measured with category scales. The final forms were implemented through the Google Forms platform, data recording was performed online. From the recorded data in this study we report the values concerning coffee and tea consumption, not only the frequency indices, but its type and flavorings also. In order to provide transparent data, the FFQ categories were merged into three major categories (see **Table 2**).

Table 2. Merging of the food frequency questionnaire categories

Categories	Merged categories used during the analyses
I consume it more than one time a day	Regularly
I consume it daily	
I consume it 1 to 3 times a week	
I consume it 1 to 3 times a month	Not typical
I consume it less often than a month	
I never consume it	Never

5. Statistical analyses

To analyse the recorded datasheet, we applied descriptive statistical methods (mean, standard deviation, percentages). Afterwards, data were transformed into category variables, thus suitable for contingency table analysis, multiple correspondence analysis (MCA) and Mann-Whitney test at 5% significance level [36]. XLStat 2020.1.3. and Microsoft® Office Excel® 2016 softwares were used for data analysis.

6. Results

6.1. Demographic parameters

55 males and 115 females participated in this study, so the ratio of genders are 32.5% male and 67.65% female. The youngest respondent was 19 years old, while the eldest was 40 years old, the average age was 23.85 ± 3.05 years. Based on their residence 44.70% lived in the capital of Hungary (Budapest), 55.30% lived in other locations. In the latter group 24.46% lived in Pest County (relating it to the total data that was 13.53%). There were only two Hungarian counties (Zala and Csongrád-Csanád) which were not indicated in any of the respondents.

6.1.1. Taster status

The distribution of taster status data (**Table 3.**) showed that 72.94% of the respondents were tasters, while 27.06% were non-tasters. The ratio of non-tasters among males was 23.63%, while in case of females it was 28.69%. Based on the results of the contingency table analysis there is no significant relationship between the gender and the taster status ($\chi^2(1, n=170)=0.483, p=0.48$).

Table 3. Results of the taster status survey according to genders and in total (number of individuals, $n = 170$)

Gender	Taster	Non-taster
Male	42	13
Female	82	33
Total	124	46

6.1.1.1. Results of investigation of body composition analysis and its relation to the taster status

Body composition analysis was performed in case of 23 males and 73 females, altogether on 96 individuals. The averaged data of these values are listed in **Table 4.**

Table 4. Averaged values of the body composition data (average \pm standard deviation, $n = 96$)

Gender	Height (cm)	Weight (kg)	Body Mass Index (BMI, kg/m ²)	Body Fat Percentage (PBF, %)	Visceral Fat Area (VFA, cm ²)
Male	$180,57 \pm 6,37$	$83,15 \pm 1,85$	$25,53 \pm 3,69$	$20,19 \pm 7,18$	$74,46 \pm 33,85$
Female	$166,34 \pm 6,58$	$61,75 \pm 10,62$	$22,29 \pm 3,50$	$27,91 \pm 6,75$	$76,63 \pm 37,95$

BMI data showed that among the males 11 individuals were obese (BMI from 25.0 to 29.9) and three individuals were overweight (BMI > 30.0). The percentage of body fat values showed obesity in case of 6 people (PBF > 27%), while the visceral fat area was higher than the upper limit of 100 cm² value in the case of 5 people.

Among the females the BMI showed undernourishment for 5 individuals (BMI < 18.5), 7 were obese, and 3 were overweight. The percentage of body fat data showed that 18 people was obese, and the visceral fat area was higher than 100 cm² for 15 participants.

Based on the statistical evaluations we did not find significant relationships in case of any of the obesity-indicating parameters and the taster status (BMI: $\chi^2(3, n=96)=0.42, p=0.93$; PBF: $\chi^2(1, n=96)=0.45, p=0.50$; VFA: $\chi^2(1, n=96)=0.01, p=0.90$). The multiple correspondence analysis results on **Figure 2** shows that the obesity-indicating parameters have relationships with each other. The patterns show that non-tasters are positioned closer to the categories of normal body composition and body weight. Outcomes of the contingency table analysis showed that on the basis of BMI values the ratio of overweight individuals (compared to the normal weighted ones) were significantly higher among males, than among females ($\chi^2(3, n=96)=21.52, p<0.0001$).

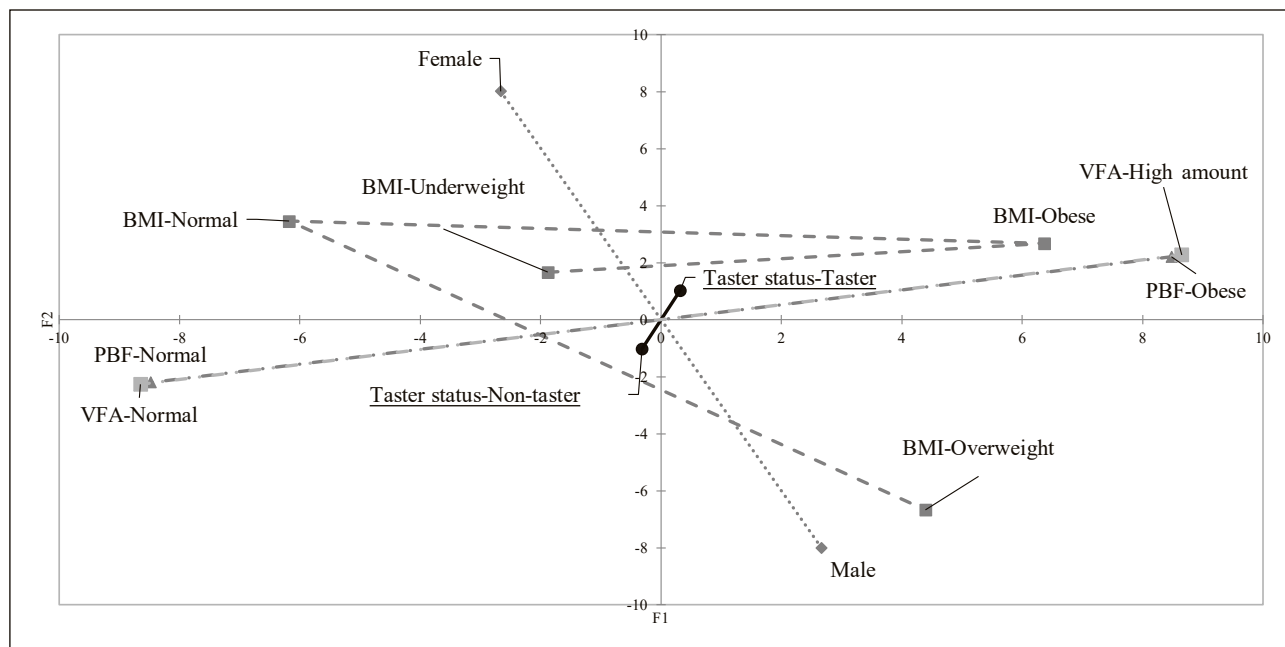


Figure 2. Results of multiple correspondence analysis for taster status, gender, and body composition parameters ($n = 96, p = 0.05$).
Abbreviations: BMI = Body Mass Index; PBF = Percent Body Fat; VFA = Visceral Fat Area

6.1.1.2. Relationship of coffee consumption and taster status

Among the FFQ respondents, 27 individuals do not consume coffee, so their data was removed from the analysis. Flavouring categories were the following: 'with milk' (referring to the use of milk, dairy products, or milk substitutes) and 'with sweetener' (referring to the use of any sweeteners (sugar, natural or artificial sweeteners)). The 'mixed' coffee variety indicated the consumption of both Arabica and Robusta (individually or as a blend). From the 143 consumers 24 individuals drink their coffee black (without sweetener, milk, or milk substitute).

Based on the contingency table analysis there is no significant relationship among taster status and coffee consumption ($\chi^2(1, n=170)=0.02, p=0.88$), consumption frequency ($\chi^2(1, n=143)=2.57, p=0.10$) and the consumed type of coffee ($\chi^2(3, n=143)=4.21, p=0.24$). Similarly there was no significant relationship between the type of consumption, like black ($\chi^2(1, n=143)=0.60, p=0.43$), with milk ($\chi^2(1, n=143)=0.28, p=0.59$) or sweetened ($\chi^2(1, n=143)=0.17, p=0.67$) and the taster status.

The patterns of multiple correspondence analysis (**Figure 3**) shows that non-tasters consume coffee less frequently than the tasters, and they are unable to specify the type of coffee they consume. When the non-tasters consume coffee, they prefer the sweetened way. Tasters use Arabica type, and they usually do not add sweetener to it. Even if they add milk, it is not necessarily means the addition of sweetener. There is a clear distinction among genders: there are significantly more coffee consumers among women ($\chi^2(1, n=143)=3.65, p=0.05$), furthermore females have their coffee with milk and sweetener, while males prefer to drink it without milk (black). This is supported with the outcomes of contingency analysis (drinking coffee black: $\chi^2(1, n=143)=3.46, p=0.05$; with milk: $\chi^2(1, n=143)=6.51, p=0.01$).

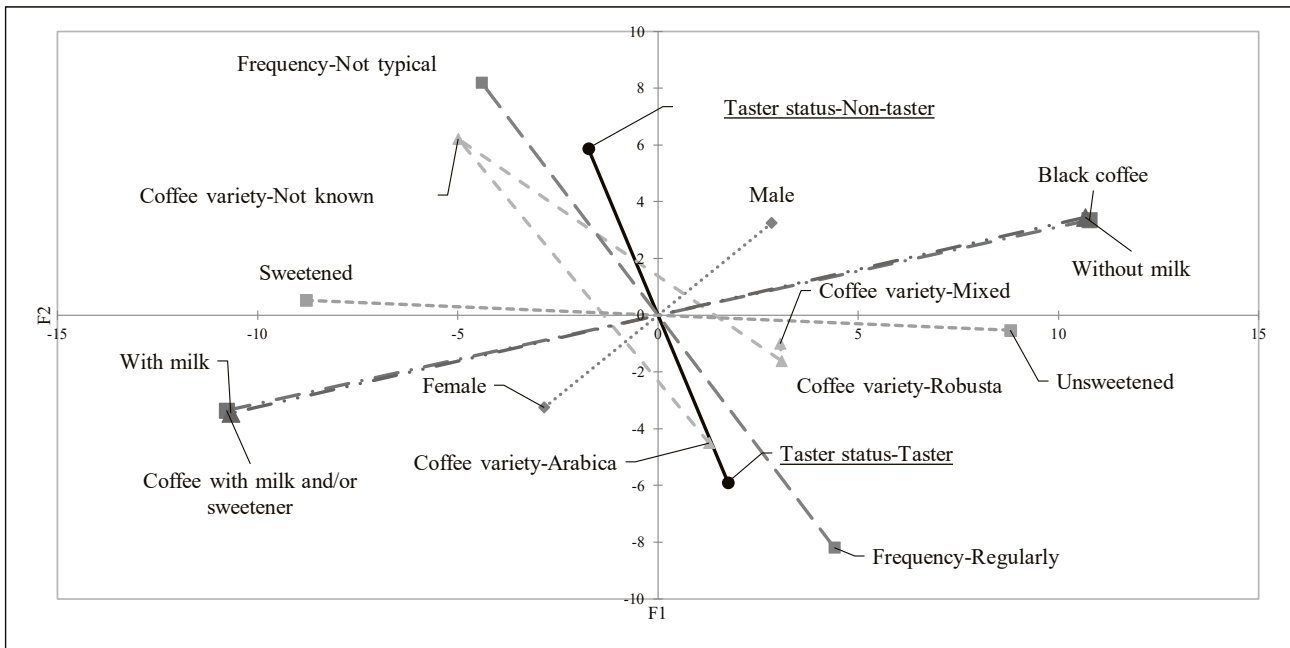


Figure 3. Relationships between coffee consumption and taster status and gender ($n = 143$, $p = 0.05$)
 Abbreviations: 'Milk' = flavored with milk, milk replacer, dairy product, 'Sweetened' = flavored with any sweetener (sugar, artificial and natural sweeteners),
 'Type of coffee' - Assorted: consumed alternately or as a blend (Arabica)

6.1.1.3. Relationship among taster status and tea consumption

Fourteen respondents reported that they do not consume tea, so their results were not analysed. The major categories were 'Several types including black tea' (consuming several tea types, including black tea); 'Several types, but no black tea' (consuming regularly other type of tea than black). The 'Sweetened' label refers to the use of any sweeteners (sugar, artificial and natural sweeteners) for tea consumption. The 'Flavouring – Variegated' category means the use of several ways of flavouring (sometimes with sugar, with lemon and sometimes without sugar), while the 'Flavouring – More items' refers to the use of sweetener and lemon. Among the 156 tea consumers 57 individuals drink their tea without flavouring (no sweetener, no lemon added).

During our analysis we did not find significant relationship among taster status and tea consumption ($\chi^2(1, n=170)=1.26$, $p=0.26$), its frequency ($\chi^2(1, n=156)=0.95$, $p=0.32$), the consumed tea types ($\chi^2(5, n=156)=2.57$, $p=0.76$) and the flavouring types of the tea ($\chi^2(4, n=156)=5.13$, $p=0.27$). There were also no significant differences among genders.

Pattern of the multiple correspondence analysis (**Figure 4**) shows that females and tasters consume tea more frequently, especially black teas and herbal infusions, both flavoured, or non-flavoured. Males and non-tasters consume tea less frequently, they prefer green tea, flavoured with lemon and sweetener, or only with lemon. It was not typical among the respondents that they might consume only fruit infusions.

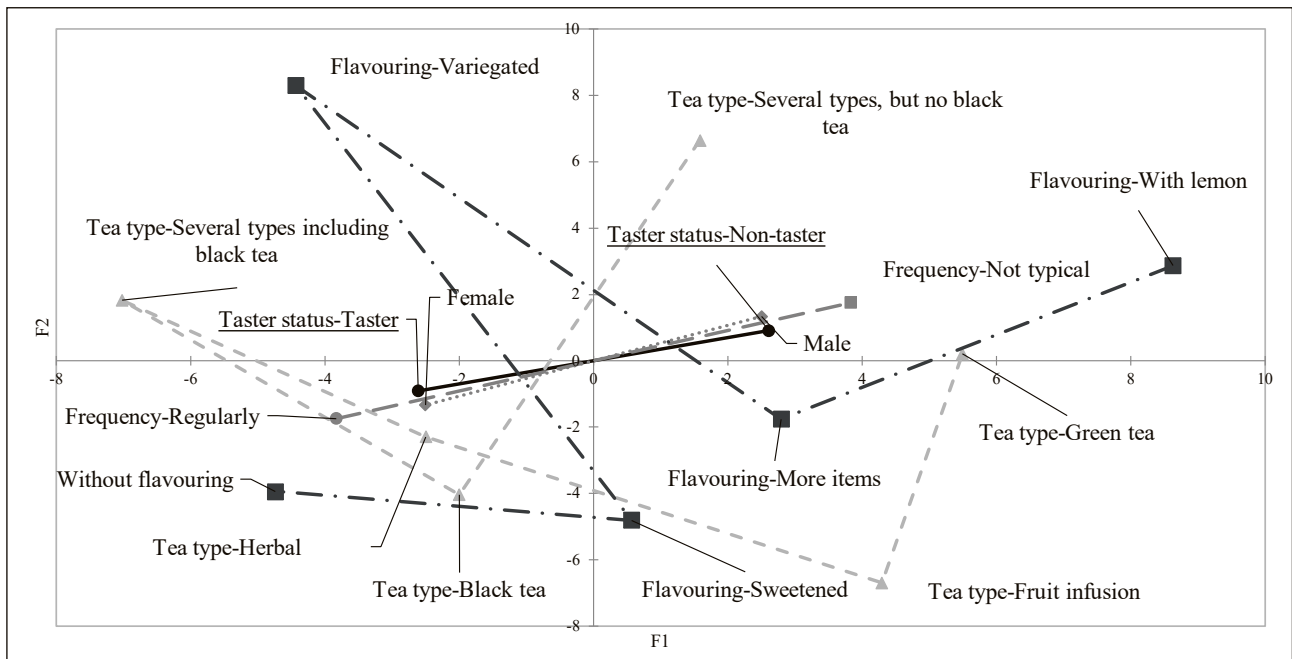


Figure 4. Correlations of tea consumption with taster status and gender ($n = 156, p=0,05$)
 Abbreviations: 'Tea type' – Several types including black tea: consumption of several tea types, including black tea; 'Tea type – Several types, but no black tea': consumption of several tea types, except black tea; 'Sweetened: with any sweeteners' (sugar, artificial and natural sweeteners); 'Flavouring – Variogated': occasionally different flavouring (sometimes sweetened and / or lemon, sometimes unflavoured); 'Flavouring – More items': flavouring with both sweetener and lemon.

7. Discussion

The ratio of tasters and non-tasters in our study is in accordance with those reported in the literature, namely 70% vs. 30% in the American and Caucasian population [6, 37]. We did not find relationship between taster status and BMI value, similarly to previous studies [17, 38]. Contrary to these results, some researchers were able to find significant correlations among these parameters [39]. Generally, the results on this field are controversial; there is no consensus among the researchers. Our new outcomes did not show relationships between taster status, body fat percentage and visceral fat area. However, our results showed significant differences between the genders in the overweight BMI category. The reason behind this is the muscle weight of the two genders: the BMI does not differentiate between fat tissue and non-fat tissue and does not take into consideration the distribution of body fat. Therefore, the BMI value's specificity is high, but its sensitivity is low [40]. In case of the male participants the skeletal muscle mass was significantly higher (Mann-Whitney $U=1664, n_1 = 23, n_2 = 73, p < 0.0001$, two-sided), so more of these individuals were put into the overweight category.

Although we did not find significant relationships in case of coffee consumption, we have observed trends, patterns according to the multiple correspondence analysis. Non-tasters consume coffee less frequently, and they are unable to specify its exact type. These two factors are probably related to each other, since those people who are less interested in coffee consumption, are also less interested in the exact type of coffee. When these individuals consume coffee, they usually add sweeteners, this is less typical in case of tasters, which is supported with literature data [41]. The difference among genders in flavouring or not flavouring the coffee might be related to a social expectation, that the espresso shot is more masculine, while the latte type drinks (e.g. milk espresso) is more feminine [42].

In case of tea consumption, we did not find significant relationships, but several trends were recognized, which are in accordance with the international literature, stating that tasters prefer green tea in a smaller extent [43, 44].

The limitation of our study, that it was not representative from the demographic point of view. During the tests, we have worked with commercially available paper strips, while using PTC or PROP solutions might lead to results that are more precise.

8. Conclusions

Both literature data and our own results show that there might be some level of relationships among genotype, body composition and food choice. It is very likely, that not the genotype, but the phenotype (taster – non-taster) will be the factor which indirectly, through the food choice and food preferences might contribute to obesity, and its related diseases. Since eating habits and food preferences are influenced by other factors (like sociodemographic or psychological ones), these effects might overwrite the expected consequences of the phenotype (preference or aversion toward bitter taste). Furthermore, representative studies with larger sample size are necessary to confirm these hypotheses.

9. Statements

Financial support: The project was supported by the grant EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005. It was also supported by the Ministry of Innovation and Technology grant number ÚNKP-19-3-I-SZIE-65 New National Excellence Program. The authors thank the support of the National Research, Development, and Innovation Office of Hungary (OTKA, contracts No FK 137577).

Contribution of authors: Experimental design: BB, AL, MVB, AG; Data acquisition: BB, DK, AL, MVB, ZK; Data analysis: BB, AG; Preparation of manuscript: BB, AG, ZK; Supervision and approval of manuscript: BB, AG, DK, AL, MVB, ZK.

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest.

Acknowledgements: Barbara Biró thanks the support of the Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Doctoral School of Food Science. Attila Gere thanks the support of the Premium Postdoctoral Program and the National Research, Development and Innovation Office (project number K134260). The authors thank the cooperation of the test participants.

10. References

- [1] Miller-Keane, O'Toole M. (2003): Miller-Keane Encyclopedia & Dictionary of Medicine, Nursing & Allied Health, 7th ed. Saunders, Philadelphia.
- [2] Purves D; Augustine G. J; Fitzpatrick D; et al. (2004): Neuroscience, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland.
- [3] Gottfried J. A. (2011): Neurobiology of Sensation and Reward, 1st ed. CRC Press, Boca Raton. DOI: <https://doi.org/10.1201/b10776>
- [4] Meyerhof W; Behrens M; Brockhoff A; et al. (2005): Human bitter taste perception. *Chemical Senses*, 30 (Suppl 1) pp. 14-15. DOI: <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh089>
- [5] Wieczorek M. N; Walczak M; Skrzypczak-Zielińska M; et al. (2017): Bitter taste of Brassica vegetables: the role of genetic factors, receptors, isothiocyanates, glucosinolates and flavor context. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (18) pp. 3130-3140. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1353478>
- [6] Tepper B. J. (2008): Nutritional Implications of Genetic Taste Variation: The Role of PROP Sensitivity and Other Taste Phenotypes. *Annual Review of Nutrition*, 28 pp. 367-388. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155458>
- [7] Beckett E. L; Martin C; Yates Z; et al. (2014): Bitter taste genetics - the relationship to tasting, liking, consumption and health. *Food and Function*, 5 (12) pp. 3040-3054. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4FO00539B>
- [8] Kurihara K. (2009): Glutamate: From discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). *American Journal of Clinical Nutrition*, 90 (3) pp. 1-3. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462D>
- [9] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database. Phenylthiourea, CID=676454. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylthiourea>. (Hozzáférés: 2020. 05. 20.)
- [10] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database. Propylthiouracil, CID=657298. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylthiouracil>. (Acquired: 05.20.2020.)
- [11] Trivedi B. P. (2012): The finer points of taste. *Nature*, 486 S2-S3. DOI: <https://doi.org/10.1038/486S2a>
- [12] Bartoshuk L. M; Duffy V. B; Miller I. J. (1994): PTC/PROP Tasting: Anatomy, Psychophysics, and Sex Effects. *Physiology and Behavior*, 56 (6) pp. 1165-1171. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90361-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90361-1)

- [13] Hayes J. E; Keast R. S. J. (2011): Two decades of supertasting: Where do we stand? *Physiology and Behavior*, 104 (5) pp. 1072-1074.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.003>
- [14] Brookes A. J. (1999): The essence of SNPs. *Gene*, 234 (2) pp. 177-186.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- [15] National Center for Biotechnology Information and U.S. National Library of Medicine Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
(Acquired: 05.20.2020.)
- [16] Kim U. K; Drayna D. (2005): Genetics of individual differences in bitter taste perception: Lessons from the PTC gene. *Clinical Genetics*, 67 (4) pp. 275-280.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00361.x>
- [17] Deshaware S; Singhal R. (2017): Genetic variation in bitter taste receptor gene TAS2R38, PROP taster status and their association with body mass index and food preferences in Indian population. *Gene*, 627 pp. 363-368.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.047>
- [18] Campbell M. C; Ranciaro A; Froment A; et al. (2012): Evolution of functionally diverse alleles associated with PTC bitter taste sensitivity in Africa. *Molecular Biology and Evolution*, 29 (4) pp. 1141-1153.
DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr293>
- [19] Forrai Gy; Bánkövi Gy. (1967): Phenylthiocarbamid-ízlelőképesség vizsgálata budapesti gyermekpopulációban. *Orvosi Hetilap*, 108 (36) pp. 1681-1687.
DOI: <https://doi.org/10.1556/650.1967.09.03>
- [20] Fischer R; Griffin F; England S; et al. (1961): Taste Thresholds and Food Dislikes. *Nature*, 191 pp. 1328. DOI: <https://doi.org/10.1038/1911328a0>
- [21] Carta G; Melis M; Pintus S; et al. (2017): Participants with Normal Weight or with Obesity Show Different Relationships of 6-n-Propylthiouracil (PROP) Taster Status with BMI and Plasma Endocannabinoids. *Scientific Reports*, 7 (1) pp. 1-12.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01562-1>
- [22] Choi J. H; Lee J; Yang S; et al. (2017): Genetic variations in taste perception modify alcohol drinking behavior in Koreans. *Appetite*, 113 pp. 178-186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.022>
- [23] Yang Q; Dorado R; Chaya C; et al. (2018): The impact of PROP and thermal taster status on the emotional response to beer. *Food Quality and Preference*, 68 pp. 420-430.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.03.001>
- [24] Shen Y; Kennedy O. B; Methven L. (2016): Exploring the effects of genotypical and phenotypical variations in bitter taste sensitivity on perception, liking and intake of brassica vegetables in the UK. *Food Quality and Preference*, 50 pp. 71-81.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.01.005>
- [25] Mezzavilla M; Notarangelo M; Concas M. P; et al. (2018): Investigation of the link between PROP taste perception and vegetables consumption using FAOSTAT data. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70 (4) pp. 484-490. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1519527>
- [26] De Toffoli A; Spinelli S; Monteleone E; et al. (2019): Influences of Psychological Traits and PROP Taster Status on Familiarity with and Choice of Phenol-Rich Foods and Beverages. *Nutrients*, 11 (6) pp. 1329. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11061329>
- [27] Yang Q; Kraft M; Shen Y; et al. (2019): Sweet Liking Status and PROP Taster Status impact emotional response to sweetened beverage. *Food Quality Preference*, 75 pp. 133-144.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.02.016>
- [28] Cossu G; Melis M; Sarchioto M; et al. (2018): 6-n-propylthiouracil taste disruption and TAS2R38 nontasting form in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33 (8) pp. 1331-1339.
DOI: <https://doi.org/10.1002/mds.27391>
- [29] Choi J; Kim J. (2019): TAS2R38 Bitterness Receptor Genetic Variation and Risk of Gastrointestinal Neoplasm: A Meta-Analysis. *Nutrition and Cancer - An International Journal*, 71 (4) pp. 585-593. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1559935>
- [30] Dżaman K; Zagor M; Sarnowska E; et al. (2016): The correlation of TAS2R38 gene variants with higher risk for chronic rhinosinusitis in Polish patients. *Otolaryngologia Polska - The Polish Otolaryngology*, 70 (5) pp. 13-18. DOI: <https://doi.org/10.5604/00306657.1209438>
- [31] Dubiel A. (2019): Bioelectrical impedance analysis in medicine. *World Scientific News*, 125 pp. 127-138.

- [32] WHO (2000): Obesity: Preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series 894, Geneva.
- [33] American Council on Exercise (2020): Percent Body Fat Norms for Men and Women. ACE - Tools & Calculators. <https://www.acefitness.org/education-and-resources/lifestyle/tools-calculators/percent-body-fat-calculator/?fbclid=IwAR0Ahy-PUqFswqVZRos5wQvMNSxOQ46RtH7qwCZpvR6jd2haKxK6CgLsEs> (Acquired: 06.18.2020.)
- [34] InBody USA. InBody 770 Result Sheet Interpretation. <https://inbodyusa.com/general/770-result-sheet-interpretation/> (Acquired: 06.18.2020.)
- [35] Welch A. A. (2013): Dietary intake measurement: Methodology. In: Caballero B. (ed.): Encyclopedia of Human Nutrition, 3rd ed; vol. 2. Academic Press, Oxford, pp. 65-73. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00075-1>
- [36] Greenacre M. (2017): Correspondence Analysis in Practice, 3rd ed. Chapman and Hall/CRC, New York. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315369983>
- [37] Tepper B. J. (1999): Does genetic taste sensitivity to PROP influence food preferences and body weight? *Appetite*, 32 (3) pp. 422. DOI: <https://doi.org/10.1006/appe.1999.0240>
- [38] Yackinous C. A; Guinard J. (2002): Relation between PROP (6-n-propylthiouracil) taster status, taste anatomy and dietary intake measures for young men and women. *Appetite*, 38 (3) pp. 201-209. DOI: <https://doi.org/10.1006/appe.2001.0481>
- [39] Choi S. E; Chan J. (2015): Relationship of 6-n-propylthiouracil taste intensity and chili pepper use with body mass index, energy intake, and fat intake within an ethnically diverse population. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115 (3) pp. 389-396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.09.001>
- [40] Adab P; Pallan M; Whincup P. H. (2018): Is BMI the best measure of obesity? *BMJ*, 360 pp. 15-16. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.k1274>
- [41] Masi C; Dinnella C; Monteleone E; et al. (2015): The impact of individual variations in taste sensitivity on coffee perceptions and preferences. *Physiology and Behavior*, 138 pp. 219-226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.031>
- [42] Reitz J. K. (2007): Espresso. *Food, Culture and Sociology*, 10 (1) pp. 7-21. DOI: <https://doi.org/10.2752/155280107780154114>
- [43] Chamoun E; Mutch D. M, Allen-Vercoe E; et al. (2018): A review of the associations between single nucleotide polymorphisms in taste receptors, eating behaviors, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (2) pp. 194-207. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1152229>
- [44] Pasquet P; Oberti B; El Ati J; et al. (2002): Relationships between threshold-based PROP sensitivity and food preferences of Tunisians. *Appetite*, 39 (2) pp. 167-173. DOI: <https://doi.org/10.1006/appe.2002.0503>

Kisüzemi gyümölcsös sör termékfejlesztésének kezdeti mikrobiológiai tapasztalatai

Kulcsszavak: Sör, palackozógép higiéniai állapota, kisüzemi sörfőzés, *tejsavbaktériumok*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Pectinatus*, *Megasphaera*, vadélesztő, gombák, CIP tisztító rendszer, alfasavak

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A kisüzemi sörfőzdék piaci részesedése a teljes magyar sörpiacon 2020-ban 3 százalékot tett ki [1]. A kisüzemi sörök értékesítését befolyásoló törvény („sörtörvény”, amely 2020. december 11-én jelent meg a Magyar Közlöny 2020. évi 275. számában) célja, hogy lehetőséget teremtsen a kisüzemi sörfőzdék számára, hogy jobb piaci helyzetbe kerüljenek [2]. Az intézkedés várhatóan előnyösen befolyásolja a Magyarországon évek óta tartó tendenciákat, mint a piaci szereplők számának növekedése, a termékkínálat bővülése, a fogyasztói érdeklődés fokozódása.

A fenti biztató tendenciák mellett fogyasztóként azt tapasztaljuk, hogy a kisüzemi sörfőzdék folytonos minőség előállításában, valamint a kisserelt sörök stabilitásának és minőségmegőrzési idejének biztosításában átlagosan elmaradnak a nagyüzemi gyártás színvonalától. Az említett minőségi deficitet elsősorban a kisüzemek minőségirányítási rendszereinek hiányosságai, a rendelkezésre álló szaktudás nem megfelelő szintje és az értékesítés körülményeinek sajátosságai okozzák.

Cikkünkben egy olyan gyümölcsös sör kisüzemi termékfejlesztését mutatjuk be, amely alacsony alkoholtartalma és egyidejűleg magas cukortartalma révén a kisserelt termék stabilitásának szempontjából az egyik legérzékenyebb termék kategóriát képviseli. A dolgozat elsősorban a mikrobiológiai stabilitás elérésével kapcsolatos tapasztalatokat összegzi, foglalkozik a gyártási környezet kiépítésével, összegzi a legfontosabb veszélyforrásokat és hibalehetőségeket, valamint felhívja a meglévő és leendő gyártók figyelmét annak a lehetőségére, hogy a sörfőzdei berendezések gyártói megfelelőségi igazolásai nem minden esetben jelentenek garanciát azok megfelelő működésére, sok esetben azok felülvizsgálata és átalakítása lehet szükséges. A kéziratunkban említett mikrobiológiai összefüggések saját megfigyeléseinként alapulnak. A projekt során alkalmazott termékspecifikus mikrobiológiai vizsgálati módszereket is részletesen bemutatjuk.

¹ Novel Food Kft.

² Eurofins Food Analytica Kft.

2. Bevezetés

2.1. Kisüzemi sörgyártás

Magyarországon 2017 óta jogilag azt a főzdet nevezik kisüzemi sörfőzdeinek, ahol kevesebb mint évi 200.000 hektoliter sört állítanak elő. A 2017 előtti szabályozás még 8000 hektoliternél húzta meg a vonalat, mely alatt 50% jövedéki adókedvezménnyel támogatottak a főzdek [3].

2.2. Gyümölcsös sör

A gyümölcsös sör kategóriába azok a sörök tartoznak amiket valamilyen gyümölccsel, vagy több gyümölcs kombinálásával készítene. A gyümölcs szót itt konyhai, nem pedig botanikai értelemben használják – húsos, magra asszociáló növényi struktúrák amelyek édesek, vagy savanyúak, és nyersen ehetőek. Ide tartoznak például az almatermésűek (alma, körte, birs), a csonthéjasok (cseresznye, szilva, őszibarack, sárgabarack, mango stb.), továbbá amelyek angol nevében megtalálható a "berry" szó (eper, málna, áfonya), ribizlik, citrusfélék, aszalt gyümölcsök (datolya, aszalt szilva, mazsola stb.), trópusi gyümölcsök (banán, ananász, guava, papaya, füge, gránátalma, fügekaktusz stb.). [7]

Ízesített sör: Olyan sör, amelyhez az ízhatás kialakításához a komló helyett, vagy mellett egyéb ízesítőanyagot is felhasználhatnak. Ezen termékek részletes jellemzőit a gyártmánylap rögzíti.

Ízesített sörök esetében az ízesítőanyagot a sörgyártás műveletei – legkésőbb az érlelés vagy szűrés – során adagolják a sörléhez vagy a sörhöz. Az érlelés, szűrés folyamán hozzáadott ízesítőanyag következtében a kész sör eredeti extrakt tartalma nem növekedhet annak 1/3-ánál nagyobb mértékben. [8]

2.3. Kisüzemi sörfőzdei gyártásindítás

A kisüzemi sörfőzdei gyártásindítás főbb részfolyamatai ideális sorrendben a következők:

1. Hatósági engedélyezési eljárások lefolytatása
2. A gyártóüzem és segédlétesítmények épületeinek kiépítése
3. Termékfejlesztés
4. A sörfőzdei technológia telepítése
5. Termékgyártás
6. Termékértékesítés

Fontos hangsúlyozni, hogy a hatékony és költségoptimalizált gyártásindítás során a termékfejlesztés megelőzi a sörfőzdei technológia beszerzését, amely részfolyamat kifejezetten az előbbi tapasztalatain alapul. Ez a sorrendiség egy termékfejlesztésre szakosodott szolgáltató szervezet bevonásával oldható meg, amely rendelkezik a folyamathoz szükséges szakmai és technológiai háttérrel.

2.4. A projektünkhöz kapcsolódó technológiai berendezések

A kisüzemi gyümölcsös sör gyártásához az alábbi főbb technológiai berendezéseket telepítettük:

- Malátaroppantó berendezés
- Főzőházi berendezések
- Kombinált cefréző-szűrőkád
- Univerzális komlóforraló - Whirlpool kád
- Elektromos vezérlőpult a sörlégyártás folyamatához
- Sörlé hűtő és rekuperációs berendezések
- Hőellátó berendezések
- Főzőházi kiegészítő berendezések
- Fermentációs tér berendezései
- Hordómosás és töltés berendezései
- Kovaföldes szűrő
- Sörpasztőr
- Palackozógép
- Sűrített levegő ellátó berendezés
- Hűtéstechnológiai berendezések
- Sörüzemi kiegészítő berendezések

A fenti listában kiemelten szerepelnek azok a berendezések, amelyek kifejezetten a sör mikrobiológiai stabilitásának biztosítására, vagy javítására használatosak, vagy azt átlagon felüli mértékben befolyásolják.

3. Mikrobiológiai szempontú gyártásellenőrzés

3.1. A sör mikrobiológiai stabilitása

A sör biológiai stabilitását minden olyan mikroorganizmus veszélyezteti, amely képes a sörben szaporodni, zavarosodást, vagy fenéküledéket képezni és az anyagcseretermékei révén a sört károsítani. E mikroorganizmusok száma csekély, mivel a sör alkoholtartalma, szénsav- és keserűanyag-tartalma és kis pH-ja következtében az adott anaerob feltételek között csak a tejsavbaktériumok és az élesztők képesek fejlődni. E mikroorganizmusok okozta fertőzés és zavarosodás, illetve a fenéküledék megjelenése között egy bizonyos idő telik el, amelynek hossza a fertőzés mértékétől, az organizmusok virulenciájától, a sör minőségétől, az oxigénhez való hozzáféréstől és a tárolás hőmérsékletétől függ.

A mikrobiológiai stabilitás biztosítható biológiailag kifogástalan, erős erjesztőképességű beállítóélesztők alkalmazásával, amelyeknek tömény kultúráját és a tartályok, vezetékek és készülékek hiánytalan mosását, tisztítását és fertőtlenítését ellenőrizték.

Az automatikus tisztítóberendezések különös figyelmet érdemelnek. Az éles szűrés a környezeti levegőtől elzárt fejtéssel együtt és a kellő alapossággal tisztított edények esetén lehetővé teszi, hogy a sört pasztörözés nélkül is kiadhassák. Az egyes stádiumokban, mint az erjesztés, ászokolás, szűrés és fejtés, tüzetes mikrobiológiai ellenőrzésre van szükség. [4]

3.2. A sör mikrobiológiai stabilitását befolyásoló tényezők

A sör mikrobiológiailag viszonylag stabil italnak számít. Ehhez a stabilitáshoz hozzájáruló sörparaméterek a következők:

- Etanoltartalom (akár 10% - néha még magasabb is): kimutatták, hogy az 5%-os etanolnak való kitettség növeli a sejtmembrán permeabilitását, és így zavarja a membrán feletti protonmozgató erőt (az energiatermelés szempontjából fontos). Ez azt jelenti, hogy a legtöbb mikroba nem éli túl vagy nem szaporodik a sörben ilyen alkoholszint mellett.
- Szén-dioxid-tartalom (~0,5% v/v): az oldott CO₂ anaerob környezetet hoz létre, megakadályozva az aerob romlást okozó mikroorganizmusok növekedését.
- Alacsony pH (pH 3,8-4,7): sok mikroorganizmus nem képes alacsony pH-n (pH<5) növekedni, mivel ezeken az alacsony pH-értékeken nem tudja fenntartani az intracelluláris pH-homeosztázist.
- Izo-alfa savak (15-100 µg/L, a koncentráció ettől eltérő is lehet): az izo-alfa savak antimikrobiális hatást fejtenek ki azáltal, hogy megnövelik a bakteriális sejtmembránok permeabilitását.
- A tápanyagok elérhetőségének csökkenése (a legtöbb fermentálható cukrot az élesztő metabolizálja): sok fontos tápanyag, például szénhidrátok, aminosavak és néhány B-vitamin nagyon alacsony koncentrációban van jelen a sörben, mivel az élesztő ezeket az erjedés során elfogyasztja. Bármilyen megnövekedett tápanyagszint (pl. szénhidrát alacsony alkoholtartalmú sörökben) a romlást okozó mikroorganizmusok elszaporodásának kockázatát jelenti.
- Alacsony oxigéntartalom (lehetőleg 0,1 µg/L alatt): az anaerob körülmények csökkentik az aerob romlást okozó mikroorganizmusok potenciális növekedésének kockázatát.

A modern sörgyártás során számos technikát alkalmaznak, hogy megakadályozzák a mikrobiológiai szennyeződések bejutását vagy túlélését a főzési folyamat, valamint a töltés/csomagolás során, hogy növeljék a mikrobiológiai stabilitást. Néhány példa:

- A cefre forralása, pasztörözés, vagy steril szűrés a kiszerezés előtt.
- Jól megtervezett sörfőző berendezés, amely ellenáll az agresszív higiéniai eljárásoknak, például a CIP (Clean-In-Place) rendszerű tisztításnak.
- A számos hagyományos (és mikrobiológiailag kockázatos) gyártási eljárás (pl. spontán erjesztés vagy nyitott fermentációs edények) megszüntetése.

3.3. A fertőzési okok

- A „sörszacharina” (*Pediococcus cerevisiae*) mono- és diplococcusok, vagy tetracoccusok formájában a sört zavarosítják és annak savas, vajra emlékeztető diacetilízt kölcsönöznek.
- A tejsavbaktériumok tejsavat, hangyasavat és ecetsavat termelnek. Zavarosodást, részben pedig fenéküledéket is képeznek.
- A vadélesztők ritkák. A sört zavarossá teszik, leveses fenéküledéket képeznek és többnyire aromás, eltérő, részben durván keserű ízt is kölcsönöznek.

- A kultúrélesztők a lefejtett sörben zavarosodást, fenéküledéket, vagy csak különálló élesztőtelep-képződést idéznek elő. Ha szűrésnél csak tökéletlenül maradnak is vissza, a fejtés alatti gazdag oxigénfelvétel után elszaporodhatnak, elsősorban akkor, ha a sör végerjedésfoka és kiadási erjedésfoka között nagy a különbség. [4]

3.4. Romlást okozó mikroorganizmusok

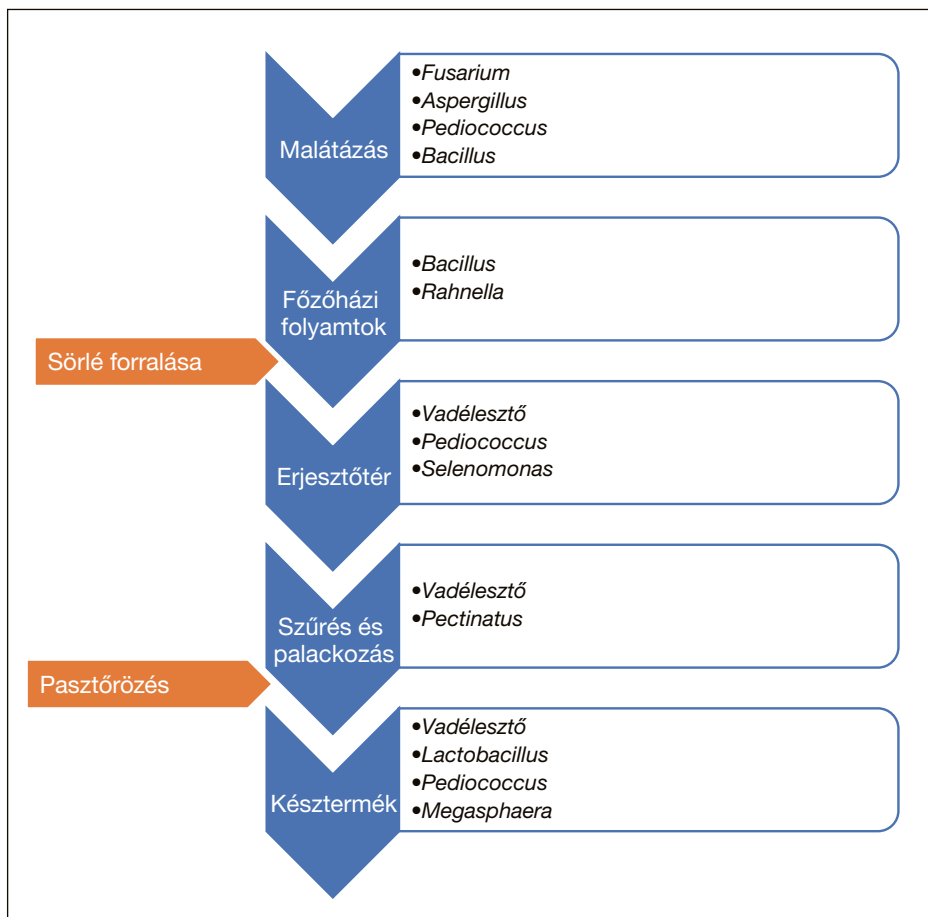
3.4.1. A sörgyártáshoz és a sörhöz leggyakrabban kapcsolódó mikroorganizmusok

Minden alapanyag (pl. maláta, komló, víz, vagy adalékanyagok) saját specifikus mikroorganizmusokat hordoz. Ezen mikroorganizmusok elszaporodása valamelyik főzési lépés során mellékízeket okozó metabolitok képződését vonja maga után. Abban az esetben, ha ezek a mikroorganizmusok túlélnek a sörfőzési folyamat összes lépését - beleértve a pasztörözést is, amennyiben alkalmazzák – potenciális sörrontóként a kiszertelt sörbe kerülhetnek. A fermentációhoz használt élesztő szintén szennyeződés forrása lehet.

Megfigyeltük, hogy a beélesztőzés során az élesztő kis mennyiségben baktériummal és vadélesztővel szennyeződhet. Ennek elkerülésére az élesztőt megfelelő kezelésre van szükség.

A szennyeződések további forrásai a sörfőzdei berendezések (edények, csövek) lehetnek, amennyiben nincsenek megfelelően tisztítva és karbantartva. A kiszertelési egység lezárásáig a gyártási folyamat utolsó lépései (erjedés után) is hajlamosak lehetnek a levegőben szálló, vagy a töltőberendezésen lévő mikroorganizmusok általi szennyeződésre (pl. magas páratartalom miatt).

Az **1. ábra** a sörfőzdében és a sörben leggyakrabban előforduló romlást okozó mikroorganizmusokat sorolja fel.



1. ábra. Leggyakrabban előforduló sörrontó mikroorganizmusok a főzési folyamat különböző lépései során és a késztermékben. A narancssárga nyilak a gyártási folyamat azon lépéseire utalnak, ahol hőkezelés (sörlé forralás és pasztörözés) hatására csökken a mikrobaterhelés. [2]

A sörben található szennyező baktériumok többnyire a *Lactobacillus* és a *Pediococcus* nemzetségbe tartozó tejsavbaktériumok (a sör bakteriális fertőzéseinek több mint 80%-a), de a romlott sörben időnként más anaerob baktériumok, mint például a *Pectinatus* és a *Megasphaera* is megtalálhatók. [2]

3.4.1.1. Tejsavbaktériumok [6]

A tejsavbaktériumok olyan szigorúan fermentatív, fakultatív anaerob Gram-pozitív, nem spóráképző pálcák vagy coccusok, amelyek a *Lactobacillales* rendjébe tartoznak. A legtöbb Gram-pozitív baktériumot gátolják az izo-alfa-savak, azonban néhányuk rezisztenciát mutat ezekkel az antibakteriális vegyületekkel szemben. A két leggyakrabban előforduló tejsavbaktérium a sörben a *Lactobacillus brevis* és a *Pediococcus damnosus*. Ezek a baktériumok ecetsavat és tejsavat, valamint különféle mellékízeket, például diacetilt ("vajás" ízt) termelnek. Különösen a *Pediococcus*-ról ismert, hogy nagy mennyiségű vicinális diketont termel. A *Pediococcus* alkohol-tűrőképessége is relatíve magas: Még 10% feletti etanolkoncentráción is képes szaporodni. Mindezek mellett a tejsavbaktériumok exopoliszacharidokat (EPS) is termelnek, amelyek a sörben a megnövekedett viszkozitás és a nyálkás megjelenés miatt ún. selymes zavarosságot okoznak.

A legfontosabb *Lactobacillus* fajok a *L. brevis* és a *L. lindneri*; kevésbé gyakoriak a *L. rossiae*, *L. buchneri*, *L. coryniformis*, *L. casei* és *L. backii*. A *L. brevis* gyakran hosszabb, párhuzamos falú, egy- vagy páros, kerek végű pálcát fejleszt (0,7 × 4 µm), a kettős pálcák gyakran hajlítottak. Sejtláncokat nem képez, de a sörben esetenként rendkívül hosszú pálcák (akár 50 µm) is megtalálhatók. A *L. brevis* általános jellemzője a gázképzés (hetero-fermentatív), a pentózok és melibiózok fermentációja, valamint az arginin hasításának képessége. Ez a leggyakoribb sörrontó zavarosságot és üledéket okoz a sörben, valamint érzékelhetően csökkenti a pH-értéket, ami pedig savas ízt kölcsönöz a sörnek. Diacetilt azonban nem termel. Gyakran másodlagos szennyeződésként jelenik meg.

A *L. buchneri* a melizitóz erjesztésére képes, ebben különbözve a *L. brevis*-től. A *L. lindneri* rövid, enyhén szabálytalan, vagy coccoid sejteket képez, amelyek hosszabb láncokba rendeződnek. Időnként hosszú pálcák alakulnak ki. A heterofermentatív fajok főleg glükózt és maltózt fermentálnak és nem hasítják az arginint. Enyhe üledékesség és zavarosság lehet megfigyelhető a sörben, ennek ellenére ízbeli hibák általában nem fordulnak elő. Ez egy tipikus elsődleges szennyeződés, amely gyakran megtalálható az élesztőüzemben, vagy az erjesztőtérben, de a nagyon kis méretű sejtek révén a szűrőkön keresztül tovább is juthat.

A *L. rossiae* is hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, és nyálkaképző. A fakultatív hetero-erjesztő fajok: *L. casei*, *L. coryniformis* és *L. plantarum* rövidebb pálcákat alkotnak, amelyek gyakran láncokba rendeződnek. Többnyire gyengébben komlózott sörben (pl. búzasör) fordulnak elő, és a diacetilképződés következtében nyilvánvaló ízhibát okoznak. Gyakran másodlagos szennyeződésként jelennek csak meg. Az obligát homofermentatív, sörromlást okozó *L. backii* mannózt, mannitot és szorbitot erjeszt. A többi fajtól a maltóz és a glükonát fermentációjának hiányában is különbözik.

A *P. damnosus*-ra jellemző a tetrádok képzése. Tipikusan elsődleges szennyeződések, amelyek gyakran előfordulnak a kultúrélesztőben és a szűretlen sörben. A sejtek a szűrőn keresztül a fejtett sörökbe is átvihetők. Szennyeződés esetén erős diacetilképződés (vajás íz) és pH-érték csökkenés lép fel, a sörök gyakran enyhén zavarosak és észrevehető üledékképződést mutatnak. Két másik sörromlást okozó *Pediococcus* faj, a *P. inopinatus* és a *P. claussenii* is hasonlóan viselkedik, bár mindkét faj kevésbé elterjedt. Utóbbi nyálkásodást okoz a sörben.

3.4.1.2. Enterobacteriaceae [6]

Az *Enterobacteriaceae* fakultatív anaerob Gram-negatív baktériumcsalád. A sörfőzéshez általában kapcsolódó két nemzetség a *Citrobacter* és a *Rahnella* (a legvalószínűbb, hogy a sörfőzésnél használt víz által jutnak be). Ezek a baktériumok számos olyan mellékíz termelődésért felelősek, mint a VDK-k (pl. diacetil), a 2,3-butándiol, a DMS, az acetaldehid és a tejsav. Ezeket a vegyületeket az erjesztés kezdetén termelik.

3.4.1.3. Bacillus [6]

Gram-pozitív, fakultatív anaerob, spóráképző baktériumok. A spóráképződésnek köszönhetően túlélnek a hőkezelést, beleértve a pasztőrözést is. A *Bacillus* azért is jelent kockázatot, mert képes a nitrátot nitráttá redukálni, ami N-nitrózaminok képződését eredményezheti (rákkeltő, teratogén és mutagén anyagok közé sorolják). Mivel egyes *Bacillus* fajok nagy mennyiségű tejsavat képesek termelni, ezek is savasodást okozhatnak. A legtöbb *Bacillus* faj (de a spóráik nem) érzékeny a komlóból származó izo-alfa savakra.

3.4.1.4. Pectinatus [6]

Ezek a Gram-negatív, szigorúan anaerob baktériumok nagy mennyiségű ecetsavat és acetoint tudnak termelni, valamint esetükben hidrogén-szulfid termelésről (rothadt tojás aroma) is beszámoltak már.

A *Pectinatus cerevisiiphilus* és a *P. frisingensis* szintén szigorú anaerob, kataláz-negatív, Gram-negatív baktériumok, és hasonló negatív hatásokkal bírnak, mint az eddig fesorolt fajok. A sejtek karcsúak (0,8×4 µm), párhuzamos falúak, hegyes végűek, enyhén hajlítottak vagy kígyószerűek, illetve dugóhúzószzerűek,

valamint egyik oldalukon egy sorosan flagelláltak. A *M. cerevisiae*-hoz hasonlóan 15-40 °C (optimum: 28-32 °C) tartományban nőnek. Különböző cukrokat, cukoralkoholokat és szerves savakat (főleg piruvát és laktát) fermentálnak. Az elsődleges metabolitok a propionsav, az ecetsav, a piroszólósav, az acetoin és a CO₂. A általuk szennyezett sörök (pH 4,3 felett, alkoholtartalom 5 térfogat% alatt) nem csak súlyos ülepedési és zavarosodási problémát, hanem kellemetlen szag- és ízhibákat is (szennyvíz szag) mutatnak. A *M. cerevisiae*-hez hasonlóan ezek is tipikus másodlagos szennyeződések, amelyek elsősorban a palackozótérben fordulnak elő.

3.4.1.5. Megasphaera

A *Megasphaera* fajok Gram-negatív, szigorúan anaerob szennyeződésként jelenhetnek meg mind a sörlé, mind a kész sör esetében. A sörben zavarosodást okoznak, és nagy mennyiségű hidrogén-szulfidot és számos rövid szénláncú zsírsavat ("sajtos" aroma) termelnek. [2]

A kataláz-negatív, szigorúan anaerob, Gram-negatív *Megasphaera cerevisiae* nagy méretű ovális vagy kerek sejteket (1,2-1,6 µm) képez, amelyek diplococcusok és rövid láncok formájában léteznek. Különösen a fruktózt, a piroszólósavat és a tejsavat erjesztik [6].

Az elsődleges metabolitok a vajsav, az ecetsav, a propionsav, a valeriansav, valamint a CO₂ és a hidrogéngáz. A sörben csak enyhe zavarosság képződik; a fent említett metabolitok következtében azonban jelentős szag- és ízhibák (szennyvíz szag) tapasztalhatóak. A faj alkoholérzékeny (5 V/V% alatt), és kedveli a magasabb pH-értéket (4,4 felett). Tipikusan másodlagos szennyeződések kedvezőek számára, amelyek elsősorban a palackozó berendezés környezetében vannak jelen [6].

3.4.1.6. Vadélesztő

Bármely élesztőtörzs, kivéve a kiválasztott *Saccharomyces* élesztőt, szennyező. A sörfőzők többnyire vadélesztőnek nevezik ezeket az élesztőszennyezéseket, amelyek lehetnek *Saccharomyces cerevisiae* vagy nem *Saccharomyces* törzsek, például *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida* vagy *Pichia*. A vad élesztő szaporodása biztonsági kockázatokat hordozhat magában: az alkoholtartalom megemelkedhet a fertőző élesztő anyagcseréje miatt. Ezek a vad élesztők néha képesek dextrinet és keményítőt etanolra erjesztetni (úgynevezett szuperattenuáció). Az etanol előállításával együtt nő a CO₂-tartalom és ezáltal a palacknyomás, ami biztonsági kockázatot jelenthet a palackok szétrobbanása miatt. Ezenkívül a vad élesztő tönkretelheti a sört az észter vagy fenolos mellékíz (pl. 4-vinil-gvajakol) előállításával, valamint zavarosodás vagy üledékképződés révén. Fontos megjegyezni, hogy az elvett élesztősejtek savas mosása nem távolítja el ezeket a vadélesztő szennyeződések [5].

3.4.1.7. Gombák

A *Fusarium* gombák által okozott termőföldi fertőzés komoly élelmiszerbiztonsági veszélyt okoz a gabonáknál. A növénynek szinte minden része (a csíranövény, a gyökér, a szártó, a szár, a levélhüvely, a levél, a kalász és a szemek) megbetegedhet. A súlyosan fertőzött növények kevesebb és gyengébb minőségű termést hoznak, a beteg szemekben méreganyagok (toxintok) képződnek, csírázási erélyük csökken. A betegség kórokozói a különféle *Fusarium* fajok amelyek fertőzőképessége és méreganyag (toxin) termelése eltérő, amely nagyban összefüggésbe hozható olyan környezeti tényezőkkel is, mint a hőmérséklet vagy a páratartalom. A toxinok jelen lehetnek a sörgyártás teljes folyamatában egészen a palackozott végtermékig. Egyes *Aspergillus* fajok szintén termelhetnek mikotoxinokat. A *Fusarium* és az *Aspergillus* fajok is termelnek hidrofób vegyületeket, kis felületaktív fehérjéket, amelyek kihabzást okoznak [6].

4. Tisztítás, fertőtlenítés

A csövek, tartályok és gépek tisztítása és fertőtlenítése kulcsfontosságú egy sörfőzdében. Minden felületnek és berendezésnek tisztának kell lennie, szennyező baktériumok, élesztőgombák és gombák jelenlétét ki kell zárni.

Példák a sörfőzdében előforduló lehetséges szennyeződésekre:

- Előző főzésből visszamaradó sör
- Mikrobiológiai szennyeződések (élesztők, baktériumok, gombák)
- Komlómaradványok
- Kalcium-oxalát (sörkő, amely savakkal eltávolítható)
- Lipidek, fehérjék (eltávolítás bázisokkal)
- Ásványi lerakódások a víz körében

Ebben a tekintetben fontos különbséget tenni a tisztítószer és a fertőtlenítőszer között.

A tisztítószeres eltávolítják a termékmaradványokat és lerakódásokat, például a lipideket és a fehérjéket. A pH-értéküktől függően ezek a tisztítószeres lúgos, savas vagy semleges tisztítószeres közé sorolhatók. A tisztítási kapacitás további növelése érdekében adalékanyagok, pl. tenzidok adagolhatók. Ezek olyan vízben oldódó molekulák, amelyek csökkentik a víz felületi feszültségét, ezáltal könnyebben eltávolíthatók a szennyeződések.

Fertőtlenítő szereket használnak a legtöbb mikrobiális szennyeződés elpusztítására. Itt ismét fontos kiemelni, hogy a baktériumspórákat nagyon nehéz elpusztítani – ezért is hívják ezt a folyamatot nem sterilizálásnak, hanem fertőtlenítésnek. Példák a fertőtlenítőszeresre:

- Halogéntartalmú fertőtlenítőszeres, például NaOCl (nátrium-hipoklorit). A NaOCl általánosan használt termék, de 40 °C feletti hőmérsékleten instabil (magnövekedett korróziós kockázattal).
- Oxidálószeres, például H₂O₂.
- Kvaterner ammóniumvegyületek (gyakran kvatoknak nevezik). A kvatok kationos tenzidok. Jó tulajdonságai ellenére a kvatokat nem használják olyan gyakran sörfőzdékben, mert jellemzően habképzők és nehezen öblíthetők, ami miatt veszélyeztetik a sör minőségét, pl. ronthatják a habtartósságot.
- Fertőtlenítés gőzzel.
- A kritikus pontok az ún. holtterek (csonkok, ágak a vezetékekben, mintavételi helyek, rossz hegesztés stb.). A csöveket és a tartályokat legjobban egy integrált CIP rendszerrel lehet tisztítani.

5. Laboratóriumi vizsgálatok

5.1. Általános tapasztalatok

A meggyes sör minták, illetve a meggyesűrtmennyek mikrobiológiai vizsgálata során a következőket tapasztaltuk:

- A meggyes sör minták szűrése a magas rosttartalom miatt nem oldható meg.
- Szintén a sörök vizsgálatok lemezöntéses eljárás esetén nagyméretű Petri-csészében (140x14,8 mm) 10 ml mintát megfelelő 3-5 mm rétegvastagsággal leöntve PCA (mikrobaszám vizsgálat esetén), illetve DRBC (élesztőgomba szám vizsgálat esetén) táptalajjal, az agar a minta alacsony pH-ja miatt nem gélesedik. Emiatt ezen vizsgálatok során először a vizsgálati mennyiséget 10 ml-ről 1 ml-re csökkentettük.
- Ezután megkezdtek a meggyesűrtmennyek mikrobiológiai vizsgálatait is - az alapanyag elvárt sterilitása miatt – egy saját módszerű jelenlét/hiány kimutatással.
- Ezt a módszert tovább módosítva kiterjesztettük a sörök vizsgálatára is. Mivel a kérdés nem a sör sterilitása, hanem a gyakorlati eltarthatósága volt, ezért a végső, módosított megoldásként mindkét vizsgálati irányban dúsításos módszerrel végeztük a szaporodásra képes mikroorganizmusok jelenlét/hiány vizsgálatát, a kész sör receptúrájában lévő azonos mennyiségű gátlóanyagtartalom mellett (0,02 g/L kálium-szorbát). Így gyakorlatilag azt modelleztük, hogy magas tápanyagtartalom mellett a sörben esetlegesen jelenlévő mikroorganizmusok képesek-e szaporodni.

5.2. A meggyes sörök vizsgálati módszereinek leírata

5.2.1. Mikrobaszám, lemezöntés, telepszámlálás (MSZ EN ISO 4833-1:2014, akkreditált módszer)

A mintából az MSZ EN ISO 6887 nemzetközi szabvány szerint elkészítjük az alapszuspenziót és a decimális hígításokat. Két Petri-csészébe steril pipettával 1 ml mintát (folyadék esetén), vagy alapszuspenziót adagolunk. Szükség szerint ismételjük meg az eljárást további hígításokkal. Töltsünk 12-15 ml 44-47 °C-os PCA agart minden Petri-csészébe. Fordítsuk meg a Petri-csészéket és inkubáljuk azokat 30 °C-os termosztátban 72±3 órán keresztül.

5.2.2. Élesztőgomba szám, felületi szélesztés, telepszámlálás, vízaktivitás >0,95 (MSZ EN ISO 21527-1:2013, akkreditált módszer)

A mintából az MSZ EN ISO 6887 nemzetközi szabvány szerint elkészítjük az alapszuspenziót és a decimális hígításokat. Petri-csészékbe töltött DRBC agar felületére 1 ml mintát (folyadék esetén), vagy alapszuspenziót egyenletesen 3 felé adagolunk, és a mintarészt az agar felületén szélesztjük. Ismételjük meg az eljárást egy további hígítási fokkal, illetve szükség szerint további hígításokkal is. Negyed óra elteltével fordítsuk meg a csészéket és inkubáljuk azokat 25 °C-os termosztátban 3-5 napon keresztül.

5.2.3. Szaporodóképes mikroba, jelenlét-hiány kimutatás, dúsításos technika (saját módszer)

0,33 literes üveges sör kiszemelése esetén a mintát 3 egyenlő részre osztva a mintarészeket 3x100 ml, 0,02 g/liter kálium-szorbát tartalmú alaplevésbe bemérve 72 órán keresztül 30 °C-on inkubáljuk. A tenyésztés végén a dúsításból mintarészenként 1 - 1 db PCA lemezre 1 µl mintarészt kioltunk, majd a lemezeket 72 órán keresztül 30 °C-on inkubáljuk. Amennyiben a lemezen telepnövekedést nem tapasztalunk, az eredményt 'negatív/100 ml', telepek kialakulása esetén pedig 'pozitív/100 ml' formában adjuk meg.

PCA – Plate Count Agar (agar táptalaj mikrobaszám meghatározáshoz) összetétele:

- tripton 5 g/l
- élesztőkivonat 2,5 g/l
- glükóz 1 g/l
- agar 9 g/l
- pH: 7,0±0,2 (25 °C)

5.2.4. Szaporodóképes élesztőgomba, jelenlét-hiány kimutatás, dúsítós technika (saját módszer)

0,33 literes üveges sör kiszemelése esetén a mintát 3 egyenlő részre osztva a mintarészeket 3 x 100 ml, 0,02 g/liter kálium-szorbát tartalmú malátalevesbe bemérve 72 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk. A tenyésztés végén a dúsításból mintarészenként 1-1 db DRBC agar lemezre 1 µl mintarészt olttunk, majd a lemezeket 72 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk. Amennyiben a lemezen telepnövekedést nem tapasztaltunk, az eredményt 'negatív/100 ml', telepek kialakulása esetén pedig esetén 'pozitív/100 ml' kifejezéssel adtuk meg.

A DRBC - Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol agar (bengálrózsa diklorán agar) összetétele:

- enzimátikusan emésztett állati és növényi szövetek 5 g/l
- glükóz 10 g/l
- kálium-dihidrogén foszfát 1 g/l
- magnézium szulfát 0,5 g/l
- diklorán (2,6-diklor-4-nitroanilin) 0,002 g/l
- bengálrózsa 0,025 g/l
- agar 15.0 g/l
- pH: 7,6±0,2 (25 °C)

A Takács-féle alapleves (MSZ 3640/13-76) összetétele:

- tripton 4 g/l
- húskivonat 4 g/l
- élesztőkivonat 2 g/l
- nátrium klorid 2 g/l
- dinátrium-hidrogén foszfát 2 g/l
- pH 7,2-7,4 (25 °C)

A laboratóriumi vizsgálatokat az EUROFINS Food Analytica Kft. laboratóriuma végezte.

6. A késztermék és a palackozógép mikrobiológiai állapotának összefüggései

A termékfejlesztés, majd az azt követő gyártás során alkalmazott ellenőrző vizsgálatokat minden esetben kiterjesztettük a technológiai berendezések mikrobiológiai állapotának vizsgálatára. Ezzel egyidejűleg feltártuk a berendezések mikrobiológiai állapotának a termékminőségre gyakorolt lehetséges hatásait.

A projekt során a palackozógépet vizsgálva a készülék olyan gyártási hibáira derítettünk fényt, amelyeket a gyártó a vizsgálataink eredménye alapján később elismert és kiküszöbölt.

- A csapok pneumatikus ágvezetékein a gyártói CIP (Cleaning-In-Place) tisztító és fertőtlenítő program elégtelen hatásidővel volt beállítva
- A kihabosító vízvezeték nem volt bekötve a CIP rendszerbe
- A sörös druck tartály nem volt megfelelően tisztítható a benne található holtterek miatt
- A sörös druck tartály CO₂ bevezető ágvezeték nem volt bekötve a CIP rendszerbe

A projektünkben használt palackozógép átalakítás előtti átfogó mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit az **1. táblázatban**, a palackozógépen töltött sör mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit pedig a **2. táblázatban** foglaltuk össze. A mikrobiológiai vizsgálatokat az EUROFINS Food Analytica Kft. Laboratórium. A NAH által NAH-1-1582/2021 számon akkreditált vizsgálólaboratórium végezte. A táblázatokban a kifogásolható eredményeket piros színnel emeltük ki.

1. táblázat. Palackozógép átfogó mikrobiológiai vizsgálata az átalakítás előtt

Minta jele	Minta típusa	Vizsgált részegység	Vizsgált paraméter	Eredmény	M. egység
2	Víz minta	Kihabosító víz	Élesztőgomba szám	15	sejt/10 ml
			Mikrobaszám	>300	db/10 ml
5	Víz minta	Sörtartály csurgalékvíz hálózati vizes öblítés után	Élesztőgomba szám	7	sejt/10 ml
			Mikrobaszám	1,9*10 ³	db/10 ml
6	Higiéniai felületi tampon minta	Sörtartály fedőlemez belső oldal+nyomásmérő csonk	Élesztőgomba szám	12	sejt/100 cm ²
			Mikrobaszám	42	db/100 cm ²
7	Higiéniai felületi tampon minta	Sörtartály oldalfal	Élesztőgomba szám	10	sejt/100 cm ²
			Mikrobaszám	>300	db/100 cm ²
8	Higiéniai felületi tampon minta	Nyomásmérő talp	Élesztőgomba szám	5	sejt/100 cm ²
			Mikrobaszám	26	db/100 cm ²
9	Víz minta	Pneumatika ág csurgalékvíz	Élesztőgomba szám	4	sejt/10 ml
			Mikrobaszám	270	db/10 ml

Vizsgálati módszer - élesztőgomba szám: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Vizsgálati módszer - mikrobaszám: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

2. táblázat. Kisüzemi gyümölcsös sör mikrobiológiai vizsgálata az átalakítás előtt

Minta típusa	Minta megnevezése	Vizsgált paraméter	Eredmény	M. egység
Palackos sör	Gyümölcsös sör - lot 28.09.19.	Élesztőgomba szám	4,6*10 ⁴	sejt/1 ml
		Mikrobaszám	4*10 ⁴	db/10 ml

Vizsgálati módszer - élesztőgomba szám: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Vizsgálati módszer - mikrobaszám: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

Az átalakítást megelőzően a palackozott gyümölcsös sör annak mikrobiológiai állapotával összefüggésbe hozható minőségi hibái: ízhibák (észteres mellékíz), CO₂ tartalom és ezáltal palacknyomás növekedés, gushing (a söröspalack felnyitásakor spriccelő habos sör).

Javaslatunkra a gyártó a palackozógépen az alábbi átalakításokat végezte el:

- A csapok pneumatikus ágvezetékein megnövelte a CIP program hatásidejét
- A kihabosító vízvezetékét bekötötte a CIP rendszerbe
- Megszüntette a sörös druck tartály holttereit
- A sörös druck tartály CO₂ bevezető ágvezetékét bekötötte a CIP rendszerbe

A projektünkben használt palackozógép átalakítás utáni átfogó mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit az **3. táblázatban**, a palackozógépen töltött sör mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit pedig a **4. táblázatban** foglaltuk össze.

3. táblázat. Palackozógép átfogó mikrobiológiai vizsgálata az átalakítás után

Minta jele	Minta típusa	Vizsgált részegység	Vizsgált paraméter	Eredmény	M. egység
2	Víz minta	Kihabosító víz	Élesztőgomba szám	-	sejt/10 ml
			Mikrobaszám	2	db/10 ml
5	Víz minta	Sörtartály csurgalékvíz hálózati vizes öblítés után	Élesztőgomba szám	-	sejt/10 ml
			Mikrobaszám	0	db/10 ml
6	Higiéniai felületi tampon minta	Sörtartály fedőlemez belső oldal+nyomásmérő csonk	Élesztőgomba szám	-	sejt/100 cm ²
			Mikrobaszám	0	db/100 cm ²
7	Higiéniai felületi tampon minta	Sörtartály oldalfal	Élesztőgomba szám	-	sejt/100 cm ²
			Mikrobaszám	0	db/100 cm ²
8	Higiéniai felületi tampon minta	Nyomásmérő talp	Élesztőgomba szám	-	sejt/100 cm ²
			Mikrobaszám	0	db/100 cm ²
9	Víz minta	Pneumatika ág csurgalékvíz	Élesztőgomba szám	-	sejt/10 ml
			Mikrobaszám	0	db/10 ml

Vizsgálati módszer - élesztőgomba szám: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Vizsgálati módszer - mikrobaszám: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

4. táblázat. Kisüzemi gyümölcsös sör mikrobiológiai vizsgálata az átalakítás után

Minta típusa	Minta megnevezése	Vizsgált paraméter	Eredmény	M. egység
Palackos sör	Gyümölcsös sör - lot 29.10.20.	Élesztőgomba szám	-	sejt/1 ml
		Mikrobaszám	0	db/10 ml

Vizsgálati módszer - élesztőgomba szám: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Vizsgálati módszer - mikrobaszám: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

Az átalakítást követően a palackozógép higiéniai állapota megfelelő lett (**3. táblázat**), és palackozott gyümölcsös sör korábban tapasztalható, annak mikrobiológiai állapotával összefüggésbe hozható minőségi hibái is megszűntek a **4. táblázatban** látható vizsgálati eredmények tanúsága szerint. Az elért mikrobiológiai stabilitás révén a termék minőségmegőrzése biztosíthatóvá vált.

7. Irodalom

- [1] Növekedes.hu (2020): A kisüzemi sörfőzdek piaci részesedése 5-6 százalékra nőhet az új törvény hatására. <https://novekedes.hu/hirek/a-kisuzemi-sorfozdek-piaci-reszesedese-5-6-szazalekra-nohet-az-uj-torveny-hatasara> (Hozzáférés: 2021. 10.16.)
- [2] 2020. évi CXL. törvény a kereskedelemről szóló 2005. évi CLXIV. törvény módosításáról
- [3] A Tanács 92/83/EGK Irányelve (1992. október 19.) az alkohol és az alkoholtartalmú italok jövedéki adója szerkezetének összehangolásáról. 1. szakasz, 4. cikk
- [4] Ludwig Narziss (1981): *A sörgyártás*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- [5] KU LeuvenX (2021): *Beer: the science of brewing*. *BrewingX*. KU Leuven, Leuven, Belgium
- [6] Hans Michael Eßlinger (2009): *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [7] Beer Judge Certification Program, Inc. (BJCP) (2015): *2015 Style Guidelines*
- [8] Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság (2013): *2-702 számú irányelv (régii 2-96 számú irányelv) Sör*. Magyar Élelmiszerkönyv - Codex Alimentarius Hungaricus. Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság, Budapest
- [9] MSZ ISO 21527-1:2013 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer az élesztők és a penészek számlálására. 1. rész: Telepszámlálásos technika a 0,95-nél nagyobb vízaktivitású termékekre (Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for teh enumeration of yeasts and moulds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95)
- [10] MSZ EN ISO 4833-1:2014 Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Horizontális módszer a mikroorganizmusok számlálására. 1. rész: Telepszámlálás 30 °C-on lemezöntéssel módszerrel (ISO 4833-1:2013) (Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique (ISO 4833-1:2013)

Initial microbiological experience in small-scale fruit beer product development

Keywords: Beer, bottling machine hygiene, small-scale brewing, *lactic acid bacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Pectinatus*, *Megasphaera*, wild yeast, fungi, CIP cleaning system, alpha acids

1. SUMMARY

The market share of small-scale breweries in the total Hungarian beer market was 3 percent in 2020 [1]. The goal of the law affecting the sale of small-scale beers (the so-called “Beer Act”, published in Issue 275 of 2020 of the Hungarian Gazette on December 11, 2020) is to create an opportunity for small-scale breweries to gain a better market position [2]. The measure is expected to have a positive effect on the trends that have been going on in Hungary for years, such as the increase in the number of market participants, the expansion of the product range and the increase in consumer interest.

In addition to the above encouraging trends, as consumers, we find that, on average, small-scale breweries lag behind large-scale producers in terms of producing a constant high quality and in ensuring the stability and shelf life of the bottles of beers. The quality deficit mentioned is mainly due to the deficiencies in the quality management systems of small breweries, the inadequate level of expertise available and the specific sales conditions.

In this article, small-scale product development of a fruit beer representing one of the most sensitive product categories in terms of packaged product stability because of its low alcohol content and, at the same time, high sugar content is presented. Mainly the experience related to the achievement of microbiological stability is summarized in the paper, while also dealing with the development of the manufacturing environment, summarizing the most important sources of danger and possibilities for failure, and drawing the attention of existing and future manufacturers to the possibility that the certificates of conformity of manufacturers of brewing equipment do not always guarantee their proper functioning, and in many cases they may have to be reviewed and modified. The microbiological relationships mentioned in our manuscript are based on our own observations. The product-specific test methods used in the course of the project are also presented in detail.

¹ Novel Food Kft.

² Eurofins Food Analytica Kft.

2. Introduction

2.1. Small-scale brewing

In legal terms, breweries that produce less than 200,000 hectoliters of beer per year has been called small-scale breweries in Hungary since 2017. Regulation before 2017 drew the line at 8,000 hectoliters, under which breweries benefited from a 50% excise tax rebate [3].

2.2. Fruit beers

The category *fruit beer* includes beers that are made with some kind of fruit or a combination of several fruits. Here the word fruit is used in a culinary rather than a botanical sense: fleshy, seed-associated plant structures that are sweet or sour and can be eaten raw. These include, for example, pome fruits (apples, pears, quinces), stone fruits (cherries, plums, peaches, apricots, mangoes, etc.), as well as fruits that have “berry” in their English names (strawberries, raspberries, blueberries), currants, citrus fruits, dried fruits (dates, prunes, raisins, etc.), tropical fruits (banana, pineapple, guava, papaya, fig, pomegranate, cactus figs, etc.) [7].

Flavored beer: Beer for which other flavoring substances may be used instead of or in addition to hops to create a flavor effect. The detailed characteristics of these products are recorded in the product data sheet.

In the case of flavored beers, the flavoring substances are added to the wort or the beer during the brewing operations, at the latest during maturation or filtration. As a result of the flavoring substance added during maturation or filtration, the original gravity of the finished beer may not increase by more than 1/3 [8].

2.3. Launching production in a small-scale brewery

Ideally, the main sub-processes of launching production in a small-scale brewery are as follows:

1. Conducting official licensing procedures
1. Construction of the production plant and auxiliary facilities
2. Product development
3. Installation of brewing technology
4. Product manufacturing
5. Product sales

It is important to emphasize that during an efficient and cost-optimized production launch, product development precedes the acquisition of brewing technology, a sub-process specifically based on the experience of the former. This sequence can be achieved with the involvement of a service organization specializing in product development, which has the professional and technological background required for the process.

2.4. Technological equipment involved in our project

For the small-scale production of fruit beer, the following main technological equipment were installed:

- Malt mill
- Mash house equipment
- Combined mashing/filtering tub
- Universal hop kettle - Whirlpool tub
- Electric control panel for the brewing process
- Wort cooling and recuperation equipment
- Heat supply equipment
- Mash house auxiliary equipment
- Fermentation area equipment
- Barrel washing and filling equipment
- Diatomaceous earth filter
- Beer pasteurization equipment
- Bottling machine
- Compressed air supply equipment
- Refrigeration technology equipment
- Brewery ancillary equipment

In the above list, equipment which is specifically used to ensure or improve the microbiological stability of beer or have an above-average effect on it are highlighted.

3. Microbiological production control

3.1. Microbiological stability of beer

The biological stability of beer is compromised by any microorganism that is able to multiply in beer, cause turbidity or form bottom sediments, and damage the beer through its metabolites. The number of these microorganisms is small, as only lactic acid bacteria and yeasts are able to grow under the given anaerobic conditions due to the alcohol content, carbon dioxide content, bitterness and low pH of beer. There is a certain period of time between the infection and turbidity caused by these microorganisms and the appearance of the bottom sediment, the length of which depends on the degree of infection, the virulence of the organisms, the quality of the beer, the access of oxygen and the storage temperature.

Microbiological stability can be ensured by the use of biologically sound adjusting yeasts with high fermentation potential, the concentrated culture of which and the thorough washing, cleaning and disinfection of the tanks, lines and equipment have been checked.

Automatic cleaning equipment deserves special attention. Sharp filtration, together with pumping with the exclusion of ambient air and the use of containers cleaned with sufficient thoroughness, allows the beer to be dispensed without pasteurization. Close microbiological control is required at each stage, such as fermentation, maturation, filtration and pumping [4].

3.2. Factors influencing the microbiological stability of beer

From a microbiological point of view, beer is a relatively stable beverage. The beer parameters that contribute to this stability are as follows:

- Ethanol content (up to 10%, sometimes even higher): exposure to 5% ethanol has been shown to increase the permeability of the cell membrane and thus to interfere with the proton-driving force across the membrane (which is important for energy production). This means that most microbes do not survive or multiply in beer at this alcohol level.
- Carbon dioxide content (~0.5% v/v): dissolved CO₂ creates an anaerobic environment, preventing the growth of microorganisms that cause aerobic deterioration.
- Low pH (pH 3.8-4.7): many microorganisms are unable to grow at low pH (pH<5) because they cannot maintain intracellular pH homeostasis at these low pH values.
- Iso-alpha acids (15-100 µg/L, the concentration may be different from this): iso-alpha acids exert an antimicrobial effect by increasing the permeability of bacterial cell membranes.
- Decreased nutrient availability (most fermentable sugars are metabolized by yeast): many important nutrients, such as carbohydrates, amino acids and some vitamins B are present in very low concentrations in beer as they are consumed by the yeast during fermentation. Any increased nutrient levels (e.g., carbohydrates in low-alcohol beers) pose a risk of proliferation of microorganisms that cause spoilage.
- Low oxygen content (preferably below 0.1 µg/L): anaerobic conditions reduce the risk of potential growth of microorganisms that cause aerobic spoilage.

In modern brewing, a number of techniques are used to prevent the entry of microbiological contaminants or their survival during the brewing process, as well as during filling/packaging, in order to increase microbiological stability. Some examples:

- Boiling the mash, pasteurization, or sterile filtration before packaging.
- Well-designed brewing equipment that resists aggressive hygiene practices, such as CIP (Clean-In-Place) cleaning.
- Elimination of many traditional (and microbiologically risky) production processes (e.g., spontaneous fermentation or open fermentation vessels).

3.3. Causes of infection

Pediococcus cerevisiae in the form of mono- and diplococci, or tetrads, clouds the beer and gives it an acidic, diacetyl taste reminiscent of butter.

Lactic acid bacteria produce lactic acid, formic acid and acetic acid. They also cause turbidity and, in part, form bottom sediment.

Wild yeasts are rare. They make the beer cloudy, form a juicy bottom sediment and also impart a mostly aromatic, distinct, partly coarsely bitter taste.

Cultured yeasts cause turbidity, bottom sediment, or only separate yeast colonies in the pumped off beer. Even if they remain only imperfectly in the beer after filtration, they can multiply after the rich oxygen uptake during pumping, especially if there is a large difference between the final degree of fermentation of the beer and the dispensed degree of fermentation [4].

3.4. Spoilage microorganisms

3.4.1. Microorganisms most often associated with brewing and beer

Each raw material (e.g., malt, hops, water or additives) carries its own specific microorganisms. The proliferation of these microorganisms during one of the brewing steps results in the formation of metabolites that cause aftertastes. In the event that these microorganisms survive all steps of the brewing process, including pasteurization, if used, they may be present in the bottled beer as potential spoilage agents. Yeast used for the fermentation can also be a source of contamination.

It has been observed that during yeasting, the yeast can be contaminated with small amounts of bacteria and wild yeast. To avoid this, proper treatment of brewer's yeast is required.

Additional sources of contamination can be the brewing equipment (vessels, lines) if they are not properly cleaned and maintained. Until packaging is completed, the final steps in the manufacturing process (after fermentation) may also be prone to contamination by microorganisms that are airborne or present in the filling apparatus (e.g., due to high humidity).

Spoilage microorganisms most often found in breweries and in beer are listed in **Figure 1**.

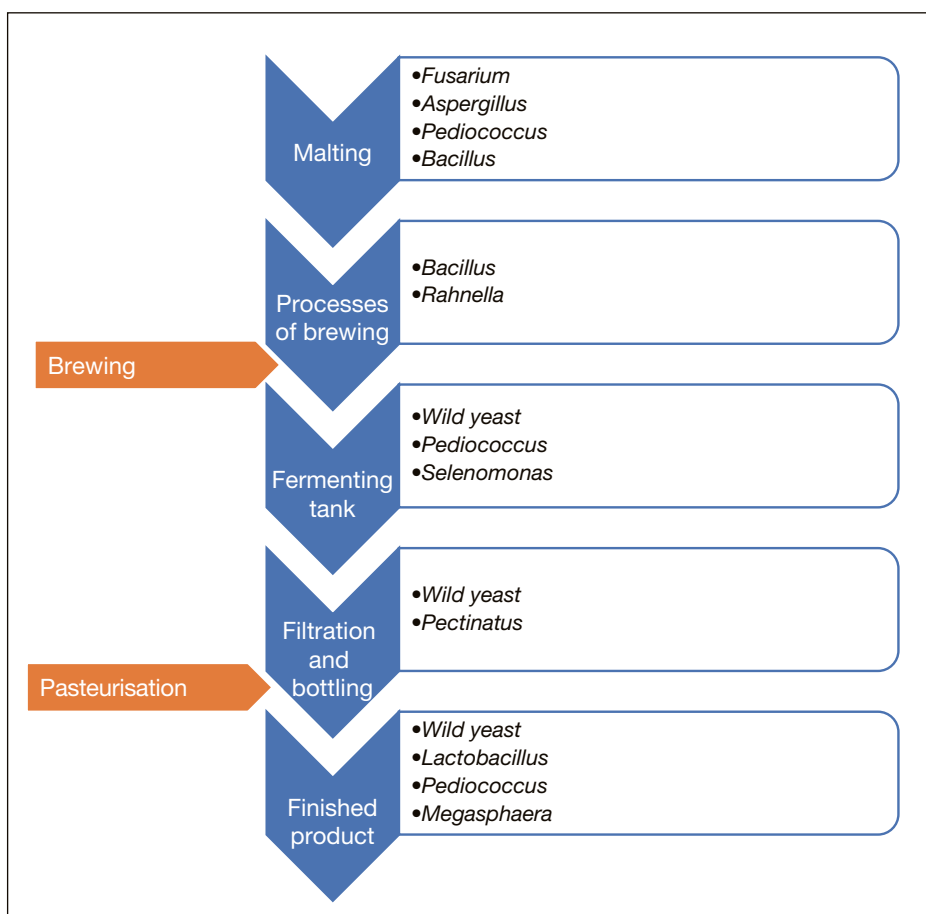


Figure 1. Most common beer spoilage microorganisms during the various steps of the brewing process and in the finished product. Orange arrows indicate the steps of the manufacturing process where the microbial load is reduced by heat treatment (wort boiling and pasteurization). [2]

Contaminating bacteria in beer are mostly lactic acid bacteria belonging to the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* (accounting for more than 80% of the bacterial infections in beer), but other anaerobic bacteria such as *Pectinatus* and *Megasphaera* are sometimes also found in spoiled beer [2].

3.4.1.1. Lactic acid bacteria [6]

Lactic acid bacteria are strictly fermentative, facultative anaerobic Gram-positive, non-spore-forming rods or cocci that belong to the order *Lactobacillales*. Most Gram-positive bacteria are inhibited by iso-alpha acids however some are resistant to these antibacterial compounds. The two most common lactic acid bacteria in beer are *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus damnosus*. These bacteria produce acetic acid and lactic acid, and also compounds responsible for various aftertastes, such as diacetyl (“buttery” flavor). *Pediococcus* in particular is known to produce large amounts of vicinal diketones. *Pediococcus* also has a relatively high alcohol tolerance: it can proliferate even at ethanol concentrations above 10%. In addition, lactic acid bacteria also produce exopolysaccharides (EPS), which cause so-called silky turbidity in beer due to the increased viscosity and mucous appearance.

The most important *Lactobacillus* species are *L. brevis* and *L. lindneri*; less common are *L. rossiae*, *L. buchneri*, *L. coryniformis*, *L. casei* and *L. backii*. *L. brevis* often develops longer, parallel-walled, single or double rods with a round end (0.7 × 4 µm), with the double rods often being bent. It does not form cell chains, but extremely long rods (up to 50 µm) can sometimes be found in beer. Common characteristics of *L. brevis* are (hetero-fermentative) gas formation, fermentation of pentoses and melibioses, as well as the ability to cleave arginine. This is the most common beer spoilage bacterium, causing turbidity and sediment, while also lowering the pH perceptibly, which in turn gives beer an acidic taste. However, it does not produce diacetyl. It often appears as a secondary contaminant.

L. buchneri is able to ferment melisitose, unlike *L. brevis*. *L. lindneri* forms short, slightly irregular or coccoid cells that are arranged in longer chains. Sometimes long rods are formed. Heterofermentative species mainly ferment glucose and maltose and do not cleave arginine. Mild sedimentation and turbidity may be observed in the beer however taste defects do not usually occur. This is a typical primary contaminant that is often found in yeast factories or in the fermentation area, but can also pass through the filters, being very small cells.

L. rossiae has similar properties and is mucus-forming. Facultative heterofermentative species, such as *L. casei*, *L. coryniformis* and *L. plantarum* form shorter rods that are often arranged in chains. They are mostly found in weaker hop beers (e.g., wheat beer) and cause obvious taste defects due to diacetyl formation. They often appear only as secondary contaminants. The obligate homofermentative beer spoilage *L. backii* ferments mannose, mannitol and sorbitol. It also differentiated from the other species by the absence of fermentation of maltose and gluconate.

P. damnosus is characterized by the formation of tetrads. It is typically a primary contamination that often occurs in cultured yeast and unfiltered beer. The cells can also be transferred to the bottled beer through the filter. Contamination results in strong diacetyl formation (buttery taste) and a decrease in pH, and beers are often slightly turbid and exhibit noticeable sedimentation. Two other *Pediococcus* species that cause beer spoilage, *P. inopinatus* and *P. claussenii*, behave similarly, although both species are less common. The latter causes mucus formation in the beer.

3.4.1.2. Enterobacteriaceae [6]

Enterobacteriaceae is a facultative anaerobic Gram-negative bacterial family. The two genera commonly associated with brewing are *Citrobacter* and *Rahnella* (most likely to be introduced with the water used for brewing). These bacteria are responsible for the production of a number of compounds causing aftertastes, such as VDKs (e.g., diacetyl), 2,3-butanediol, DMS, acetaldehyde and lactic acid. These compounds are produced at the beginning of the fermentation.

3.4.1.3. Bacillus [6]

Gram-positive, facultative anaerobic, spore-forming bacteria. Due to spore formation, they survive heat treatment, including pasteurization. *Bacillus* also poses a risk because it can reduce nitrate to nitrite, which can lead to the formation of N-nitrosamines (classified as carcinogenic, teratogenic and mutagenic substances). Since certain *Bacillus* species are able to produce large amounts of lactic acid, they can also cause acidification. Most *Bacillus* species (but not their spores) are susceptible to the iso-alpha acids from hops.

3.4.1.4. Pectinatus [6]

These Gram-negative, strictly anaerobic bacteria can produce large amounts of acetic acid and acetoin, and hydrogen sulfide production (rotten egg aroma) has also been reported.

Pectinatus cerevisiiphilus and *P. frisingensis* are also strictly anaerobic, catalase-negative, Gram-negative bacteria, and have similar negative effects as the species listed so far. The cells are slender (0.8 × 4 µm), parallel-walled with a pointed end, slightly bent or serpentine or corkscrew-like, and serially flagellated on one side. Similarly to *M. cerevisiae*, they grow in the range of 15 to 40 °C (with the optimum being between 28 and 32 °C). They ferment various sugars, sugar alcohols and organic acids (mainly pyruvate and lactate). The primary metabolites are propionic acid, acetic acid, pyruvic acid, acetoin and CO₂. Beers contaminated with them (pH above 4.3, alcohol content below 5% vol.) exhibit not only serious sedimentation and turbidity problems, but also unpleasant odor and taste defects (sewage odor). Similarly to *M. cerevisiae*, these are typically secondary contaminants that occur primarily in the bottling area.

3.4.1.5. Megasphaera

Megasphaera species can appear as Gram-negative, strictly anaerobic contaminants in both wort and finished beer. They cause turbidity in beer and produce large amounts of hydrogen sulfide and a number of short-chain fatty acids (“cheesy” aroma) [2].

Catalase-negative, strictly anaerobic, Gram-negative *Megasphaera cerevisiae* forms large oval or round cells (1.2 – 1.6 µm) that exist in the form of diplococci and short chains. They ferment fructose, pyruvic acid and lactic acid, in particular [6].

The primary metabolites are butyric acid, acetic acid, propionic acid, valeric acid, as well as CO₂ and hydrogen gas. Only a slight turbidity is exhibited by the beer; however, due to the above-mentioned metabolites, there can be significant odor and taste defects (sewage odor). The species is sensitive to alcohol (below 5% vol.) and prefers a higher pH value (above 4.4). The secondary contaminant that is present primarily in the vicinity of the bottling equipment are typically favorable to these bacterial species [6].

3.4.1.6. Wild yeast

Any strain of yeast, except the selected *Saccharomyces* yeast, is a contaminant. These yeast contaminants are usually referred to by brewers as wild yeast, which may be *Saccharomyces cerevisiae* or non-*Saccharomyces* strains, such as *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida* or *Pichia*. Proliferation of wild yeast can carry a safety risk: the alcohol content can increase due to the metabolism of the infecting yeast. These wild yeasts are sometimes able to ferment dextrins and starch into ethanol (so-called superattenuation). Along with the production of ethanol, the CO₂-content, and thus the bottle pressure increases, which can pose a safety risk due to the bursting of the bottles. In addition, wild yeast can ruin the beer through the production of ester or phenolic aftertaste (e.g., 4-vinylguaiacol), as well as turbidity or sediment formation. It is important to note that acid washing of the yeast cells does not remove these wild yeast contaminants [5].

3.4.1.7. Fungi

Field infestation by *Fusarium* fungi poses a serious food safety risk to cereals. Almost all parts of the plant (germ, root, stalk, stem, leaf pod, leaf, ear and grain) can become affected. Severely infected plants produce less and lower quality crops, toxins are produced in the diseased grains, their germination vigor is reduced. The pathogens that cause the disease are different *Fusarium* species with various infectivity and toxin production, which can be greatly related to environmental factors, such as temperature and humidity. The toxins can be present throughout the entire brewing process, up to the bottled finished product. Certain *Aspergillus* species can also produce mycotoxins. Both *Fusarium* and *Aspergillus* species produce hydrophobic compounds, which are small surfactant proteins that cause foaming [6].

4. Cleaning, disinfection

Cleaning and disinfection of the lines, tanks and equipment is key in a brewery. All surfaces and equipment must be clean, the presence of contaminating bacteria, yeasts and fungi must be eliminated.

Examples of possible contaminants in a brewery:

- Beer left over from previous brewing
- Microbiological contaminants (yeasts, bacteria, fungi)
- Hop residues
- Calcium oxalate (beer stone that can be removed with acids)
- Lipids, proteins (removal with bases)
- Mineral deposits in the water circuit

In this regard, it is important to distinguish between cleaning agents and disinfectants.

Cleaning agents remove product residues and deposits, such as lipids and proteins. Depending on their pH value, these cleaning agents can be classified as alkaline, acidic or neutral cleaning agents. In order to further increase the cleaning capacity, additives, e.g., surfactants can be added. These are water-soluble molecules that reduce the surface tension of water, making it easier to remove contaminants.

Disinfectants are used to destroy most microbial contaminants. Here again, it is important to point out that bacterial spores are very difficult to destroy, which is why this process is called disinfection, not sterilization. Examples of disinfectants:

- Halogenated disinfectants, for example NaOCl (sodium hypochlorite). NaOCl is a commonly used product, but unstable above 40 °C (with increased risk of corrosion).
- Oxidizing agents, such as H₂O₂.
- Quaternary ammonium compounds (often called quats). Quats are cationic surfactants. Despite their good properties, quats are not used in breweries very often because they typically form foams and difficult to rinse, which endangers the quality of the beer, e.g., may impair the stability of the foam.
- Steam disinfection.
- Critical points include the so-called dead spaces (pipe ends, branches in the lines, sampling points, poor welding, etc.). Lines and tanks are best cleaned with an integrated CIP system.

5. Laboratory tests

5.1. General experience

During the microbiological testing of the sour cherry beer samples and the sour cherry concentrates, we found the following:

- Filtering of the sour cherry beer samples was not possible due to the high fiber content.
- Also, when testing the beers, in the case of the plate casting process, when covering 10 ml of the sample with a suitable layer thickness of 3 to 5 mm of PCA (for microbial count test) or DRBC (for yeast count test) culture medium in a large Petri dish (140 x 14.8 mm), the agar did not gel because of the low pH of the sample. Therefore, in these tests, the test volume was first reduced from 10 ml to 1 ml.
- Then the microbiological study of the sour cherry concentrates was started, due to the expected sterility of the raw material, using our own method for the detection of presence/absence.
- This method was further modified to include the testing of beers. As the issue was not the sterility of the beer but its practical shelf life, as a final, modified solution, the presence/absence of reproducible microorganisms was tested by an enrichment method in both cases, with the same amount of inhibitor as prescribed in the recipe of the finished beer (0.02 g/L potassium sorbate). In this way, it was practically modelled whether the microorganisms that may be present in the beer can reproduce at a high nutrient content.

5.2. Description of the test methods of sour cherry beers

5.2.1. Microbial count, plate casting, colony counting (MSZ EN ISO 4833-1:2014, accredited method)

The stock suspension and the decimal dilutions are prepared from the sample according to the international standard MSZ EN ISO 6887. Using a sterile pipette, 1 ml of the sample (for liquid samples) or stock suspension is added to two Petri dishes. The procedure is repeated with additional dilutions, if necessary. 12 to 15 ml of 44 to 47 °C PCA agar is added to each Petri dish. The Petri dishes are inverted and incubated in a thermostat at 30 °C for 72±3 hours.

5.2.2. Yeast count, surface spreading, colony counting, water activity >0.95 (MSZ EN ISO 21527-1:2013, accredited method)

The stock suspension and the decimal dilutions are prepared from the sample according to the international standard MSZ EN ISO 6887. 1 ml of the sample (for liquid samples) or stock suspension is added evenly in 3 portions to the surface of the DRBC agar filled in Petri dishes, and the sample portions are spread on the surface of the agar. The procedure is repeated with an additional degree of dilution and, if necessary, with additional dilutions. The dishes are inverted after 15 minutes and incubated in a thermostat at 25 °C for 3 to 5 days.

5.2.3. Presence/absence detection of reproducible microbes, enrichment technique (own method)

In the case of a 0.33-liter bottle of beer, the sample is divided into 3 equal portions and the sample portions are incubated for 72 hours at 30 °C in 3 x 100 ml stock broth containing 0.02 g/liter of potassium sorbate.

At the end of the culture period, 1 µl of each enriched sample portion is applied to a PCA plate, and the plates are incubated for 72 hours at 30 °C. If no increase in the colonies is observed on the plate, the result is reported as 'negative/100 ml', while if colonies do form, the result is reported as 'positive/100 ml'.

Composition of the PCA (Plate Count Agar) culture medium for microbial count determination:

- tryptone 5 g/l
- yeast extract 2.5 g/l
- glucose 1 g/l
- agar 9 g/l
- pH: 7.0±0.2 (25 °C)

5.2.4. Presence/absence detection of reproducible yeast, enrichment technique (own method)

In the case of a 0.33-liter bottle of beer, the sample is divided into 3 equal portions and the sample portions are incubated for 72 hours at 25 °C in 3 x 100 ml of malt broth containing 0.02 g/liter of potassium sorbate. At the end of the culture period, 1 µl of each enriched sample portion is applied to a DRBC agar plate, and the plates are incubated for 72 hours at 25 °C. If no increase in the colonies is observed on the plate, the result is reported as 'negative/100 ml', while if colonies do form, the result is reported as 'positive/100 ml'.

Composition of the DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol) agar:

- enzymatically digested animal and plant tissues 5 g/l
- glucose 10 g/l
- potassium dihydrogen phosphate 1 g/l
- magnesium sulfate 0.5 g/l
- dichloran (2,6-dichloro-4-nitroaniline) 0.002 g/l
- Rose Bengal 0.025 g/l
- agar 15.0 g/l
- pH: 75.6±0.2 (25 °C)

Composition of the Takács stock broth (MSZ 3640/13-76):

- tryptone 4 g/l
- meat extract 4 g/l
- yeast extract 2 g/l
- sodium chloride 2 g/l
- disodium hydrogen phosphate 2 g/l
- pH 7.2-7.4 (25 °C)

Laboratory tests were carried out by the laboratory of EUROFINS Food Analytica Kft.

6. Relationships between the microbiological state of the finished product and the bottling machine

In all cases, the control tests applied during product development and subsequent production were extended to the examination of the microbiological condition of the technological equipment. At the same time, the possible effects of the microbiological condition of the equipment on product quality were explored.

In the course of the project, by examining the bottling machine, manufacturing defects of the machine were brought to light, which were later acknowledged and eliminated by the manufacturer based on the results of our tests.

- The manufacturer's CIP (Cleaning-In-Place) cleaning and disinfection program was set on the pneumatic branch lines of the taps with insufficient exposure time
- The foaming water supply was not connected to the CIP system
- The beer druck tank could not be cleaned adequately due to the dead spaces it contained
- The CO₂ inlet branch line of the beer druck tank was not connected to the CIP system

The results of the comprehensive microbiological testing of the bottling machine used in our project before conversion are summarized in **Table 1**, while the results of the microbiological testing of the beer bottled using this machine are summarized in **Table 2**. The microbiological tests were performed by the laboratory of EUROFINS Food Analytica Kft., a testing laboratory accredited by NAH (National Accreditation Authority) under reg. no. NAH-1-1582/2021. Objectionable results are highlighted in the table in red.

Table 1. Comprehensive microbiological testing of the bottling machine before conversion

Sample ID	Sample type	Tested subunit	Tested parameter	Result	Unit
2	Water sample	Foaming water	Yeast count	15	cell/10 ml
			Microbial count	>300	pc/10 ml
5	Water sample	Beer tank leachate after rinsing with mains water	Yeast count	7	cell/10 ml
			Microbial count	1.9*10 ³	pc/10 ml
6	Hygienic surface swab sample	Beer tank lid inside + pressure gauge nozzle	Yeast count	12	cell/100 cm ²
			Microbial count	42	pc/100 cm ²
7	Hygienic surface swab sample	Beer tank side wall	Yeast count	10	cell/100 cm ²
			Microbial count	>300	pc/100 cm ²
8	Hygienic surface swab sample	Pressure gauge foot	Yeast count	5	cell/100 cm ²
			Microbial count	26	pc/100 cm ²
9	Water sample	Pneumatic branch line leachate	Yeast count	4	cell/10 ml
			Microbial count	270	pc/10 ml

Test method – yeast count: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Test method – microbial count: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

Table 2. Microbiological testing of small-scale fruit beer before conversion

Sample Type	Sample ID	Tested parameter	Result	Unit
Bottled beer	Fruit beer - lot 28.09.19.	Yeast count	4.6*10 ⁴	cell/1 ml
		Microbial count	4*10 ⁴	pc/10 ml

Test method – yeast count: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Test method – microbial count: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

Prior to the conversion, the quality defects of bottled fruit beer that could be attributed to its microbiological condition were: taste defects (ester aftertaste), increase in CO₂ content and thus in bottle pressure, gushing (foaming beer squirting when the bottle is opened).

At our suggestion, the following modifications were made to the bottling machine by the manufacturer:

- Increased operating time of the CIP program on the pneumatic branch lines of the taps
- Connection of the foaming water supply to the CIP system
- Elimination of the dead spaces of the beer druck tank
- Connection of the CO₂ inlet line of the beer druck tank to the CIP system

The results of the comprehensive microbiological testing of the bottling machine used in our project after conversion are summarized in **Table 3**, while the results of the microbiological testing of the beer bottled using this machine are summarized in **Table 4**.

Table 3. Comprehensive microbiological testing of the bottling machine after conversion

Sample ID	Sample type	Tested subunit	Tested parameter	Result	Unit
2	Water sample	Foaming water	Yeast count	-	cell/10 ml
			Microbial count	2	pc/10 ml
5	Water sample	Beer tank leachate after rinsing with mains water	Yeast count	-	cell/10 ml
			Microbial count	0	pc/10 ml
6	Hygienic surface swab sample	Beer tank lid inside + pressure gauge nozzle	Yeast count	-	cell/100 cm ²
			Microbial count	0	pc/100 cm ²
7	Hygienic surface swab sample	Beer tank side wall	Yeast count	-	cell/100 cm ²
			Microbial count	0	pc/100 cm ²
8	Hygienic surface swab sample	Pressure gauge foot	Yeast count	-	cell/100 cm ²
			Microbial count	0	pc/100 cm ²
9	Water sample	Pneumatic branch line leachate	Yeast count	-	cell/10 ml
			Microbial count	0	pc/10 ml

Test method – yeast count: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Test method – microbial count: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

Table 4. Microbiological testing of small-scale fruit beer after conversion

Sample type	Sample ID	Tested parameter	Result	Unit
Bottled beer	Fruit beer - lot 29.10.20.	Yeast count	-	cell/1 ml
		Microbial count	0	pc/10 ml

Test method – yeast count: MSZ ISO 21527-1:2013 [9]

Test method – microbial count: MSZ EN ISO 4833-1:2014 [10]

Following the conversion, the hygienic condition of the bottling machine became satisfactory (**Table 3**), and the previously observed quality defects of the bottled fruit beer related to its microbiological condition were eliminated, as shown by the test results in **Table 4**. Due to the achieved microbiological stability, the preservation of the quality of the product could be ensured.

7. References

- [1] Növekedes.hu (2020): A kisüzemi sörfőzdek piaci részesedése 5-6 százalékra nőhet az új törvény hatására. (The market share of small-scale breweries could increase to 5-6 percent as a result of the new law.) <https://novekedes.hu/hirek/a-kisuzemi-sorfozdek-piaci-reszesedese-5-6-szazalekra-nohet-az-uj-torveny-hatasara> (Acquired: 10.16.2021.)
- [2] 2020. évi CXL. törvény a kereskedelemről szóló 2005. évi CLXIV. törvény módosításáról (2020 CXL. Act CLXIV of 2005 on Trade amending the law)
- [3] Council Directive 92/83/EEC of 19 October 1992 on the harmonization of the structures of excise duties on alcohol and alcoholic beverages. Section 1, Article 4.
- [4] Ludwig Narziss (1981): *A sörgyártás. (The Brewing)* Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- [5] KULeuvenX (2021): *Beer: the science of brewing. BrewingX. KU Leuven, Leuven, Belgium*
- [6] Hans Michael Eßlinger (2009): *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [7] Beer Judge Certification Program, Inc. (BJCP) (2015): *2015 Style Guidelines*
- [8] Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság (2013): *2-702 számú irányelv (régii 2-96 számú irányelv) Sör.* Magyar Élelmiszerkönyv - Codex Alimentarius Hungaricus. Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság, Budapest (Codex Alimentarius Hungaricus – The bier – The old directive 2-96)
- [9] MSZ ISO 21527-1:2013 *Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer az élesztők és a penészek számlálására. 1. rész: Telepszámlálásos technika a 0,95-nél nagyobb vízaktivitású termékekre (Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95)*
- [10] MSZENISO 4833-1:2014 *Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Horizontális módszer a mikroorganizmusok számlálására. 1. rész: Telepszámlálás 30 °C-on lemezöntéssel módszerrel (ISO 4833-1:2013) (Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique (ISO 4833-1:2013)*

Egysejt-fehérje előállítása állati takarmányozáshoz fermentációs biotechnológiával

Kulcsszavak: Kwashiorkor, egysejtes fehérje, élelmiszer-melléktermékek, takarmányozás, fermentáció, biotechnológia

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Háttérinformáció: A fermentáció egyfajta biotechnológia, amely mikroorganizmusok kémiai folyamatait használ állati táplálék előállítására. A régi időkben a hulladékokat vegyszerekkel kezelték, napjainkban viszont a vállalkozások a hulladékokat értékes élelmiszerekké, élelmiszer-összetevőkké vagy takarmánytermékekké például egysejt-olajokká, vagy egysejtfehérjékké alakítják át. A leggyakrabban használt szubsztrátum a melasz és a kukoricaáztató lúg, amelyek a fermentációs folyamat részei.

Cél: Kéziratunk megírásának célja az, hogy áttekintést adjon az egysejt-fehérjék (single cell proteins – SCP) fermentációs eljárással történő előállításához felhasznált élesztőtörzsekről és élelmiszer-melléktermékekről. Ezen túlmenően a dolgozat összefoglalja az egysejt-fehérjék szerepét az állati takarmányban.

Módszerek: A cikk anyagához a Google Scholar Medline és PubMed adatbázisában elektronikus keresést végeztünk. További keresést végeztünk az Élelmiszer- és Mezőgazdasági Világszervezet, a FAO kutatási cikkadatbázisában.

Eredmények: A fentebb említett szubsztrátok és a különböző mikroorganizmusok (algák, élesztő, baktériumok) által termelt egysejt-fehérjék fontos szerepet játszanak az állati takarmányozásban. Ezenkívül az SCP-k kiváló minőségű fehérje-, telítetlen zsírsav-, vitamin- és ásványianyag-források az állatok számára.

Következtetés: Az egysejt-fehérje fermentációval történő előállítása számos jelentős előnnyel jár, beleértve a fenntarthatóságot, az egészséget és a termelési hatékonyságot.

¹ Széchenyi István Egyetem, Agrártudományi és Élelmiszertudományi Kar, Víz- és Környezettudományi tanszék

² SISAF Nanotechnology Drug Delivery, Ulster University

* Levelező szerző: Széchenyi István Egyetem, Agrártudományi és Élelmiszertudományi Kar, Víz- és Környezettudományi tanszék

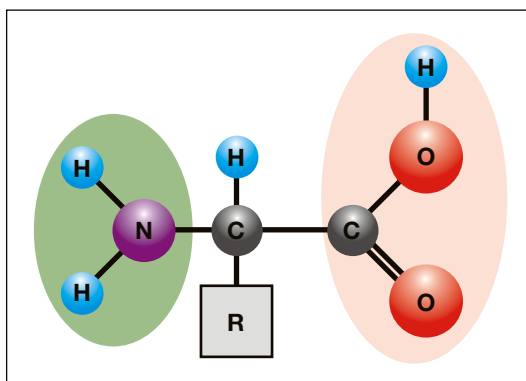
2. Bevezetés

A régebbi évtizedekben a különböző élelmiszeripari hulladékokat különféle vegyszerekkel kezelték, amely nem volt a legjobbnak tekinthető hulladékkezelési megoldás. Ahogy a világ népessége növekszik, az elmúlt évtizedekben az állat- és tejtermelés is folyamatosan növekszik. A világ jelenleg több mint 350 millió tonna állati eredetű fehérjét termel, és ez az érték 2050-re várhatóan 1250 millió tonnára fog emelkedni, hogy kielégítse az állati eredetű fehérje iránti globális keresletet [1]. Manapság sok cég alakít át a különféle hulladékokat hasznos élelmiszerekké, élelmiszer-összetevőkké vagy takarmánytermékekké emberi táplálkozásra és az állatok takarmányozása céljából. Ezek a termékek környezetbarátok és egészségügyi szempontból is kedvezőnek tekinthetők, mint például a biogáz, a bioüzemanyagok és az egyéb bioenergiák. A rendelkezésre álló módszerek és technikák lehetőséget adnak arra, hogy ezeket a termékeket egysejt-olajokként, egysejt-fehérjékként, vegyi anyagokként, enzimekként és sok más hasznos anyaggá alakítsuk át.

A szénhidrátok és a zsírok után a fehérjék a legfontosabb makrotápanyagok, amelyekre a szervezetnek nagy mennyiségben szüksége van. Fogyasztásuk elengedhetetlen tényező a növekedéshez, a test helyreállításához és az egészség megőrzéséhez. Valamennyi fehérje 20 aminosavból áll, és ezek határozzák meg a fehérje tápértékét. Az aminosavak egy részét az ember nem tudja szintetizálni, de mégis esszenciálisak (valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, triptofán, lizin, hisztidin, metionin és treonin), és ezeket étrendünkől kell bevinni. Az aminosavak általános szerkezetét az **1. ábra** mutatja be.

A fehérjék emésztése a gyomorban kezdődik és a bél lumenében folytatódik, ahol a fehérjék mono- és diaminosavakká bomlanak le. Ezeket az aminosavakat a belekben specifikus transzporterek kötik meg, majd a vérbe juttatják, hogy a szervezet egyéb szöveteinek nitrogénalapú vázát képezhessék. Ezek között neurotranszmitterek, enzimek és hormonok is vannak [2, 3]. Bár mind a növényi, mind az állati fehérjék összetevőikben hasonlóak, mindkettő fehérjecsoport közel ugyanazokat az aminosavakat tartalmazza, de az összes esszenciális aminosavat az állati fehérjék tartalmazzák [4].

Általánosságban elmondható, hogy az emberi szervezetnek testtömeg-kilogrammonként 1,0-1,5 g fehérjére van szüksége úgy a felnőttek, mint a gyermekek esetében [5]. Ha az étrend hosszú ideig fehérjehiányos, a kwashiorkor nevű betegséget okozhatja, amely az alultápláltság súlyos formája [6].



1. ábra. Az aminosavak általános szerkezeti képlete: aminocsoport (-NH₂), karboxilcsoport (-COOH) és cserélhető csoport (-R) [7]

Az egysejt-fehérje (SCP) a hulladékokból származó egyik kiváló minőségű és értékes diétás termék [8, 9, 10, 11, 12]. Az SCP egy biomasza, amelyet különböző mikroorganizmusok állítanak elő, így bioproteinnek, mikrobiális fehérjének vagy biomaszának is nevezhetjük. Ezek a mikroorganizmusok fehérjében gazdag összetevőként emberi táplálékban és állati takarmányban is felhasználhatók [8]. Ezen túlmenően az SCP-k növényi fehérjeforrások hasznos alternatívája lehet, egész évben előállíthatók és nem bocsátanak ki üvegházhatású gázokat. A fehérje előállításához legfontosabb az olcsó és megfelelő szubsztrátok vagy agráripári melléktermékek és értékes mikroorganizmusok kiválasztása az egysejt-fehérjék előállítási költségének csökkentéséhez [8, 13, 14, 15, 16, 17]. Ennek elérése érdekében különféle szubsztrátumokat használtak, mint például almatörköly, jamsz-héj (*Dioscorea* sp. Szerk), citruspép, burgonya héja, ananász hulladék, papayahulladék [8]. A leggyakrabban használt melléktermékek azonban a melasz és a kukoricaáztató lé. A mikroorganizmusok kutatási és ipari célokra való helyes kiválasztása is fontos.

Dolgozatunk a mikroorganizmusok (algák, élesztő, baktériumok) által termelt egysejt-fehérjékre, mint alternatív fehérjeforrásokra összpontosít. Az erjesztéssel előállított egysejt-fehérje kedvező beltartalmi értékeinek köszönhetően (fehérjék, vitaminok, ásványi anyagok) jól emészthető formában felhasználható emberi táplálkozásra, mint élelmiszer. Vitamin-kiegészítéssel különösen, mint funkcionális élelmiszer-összetevő, hozzájárul az alultápláltság megelőzéséhez, kezeléséhez is [10].

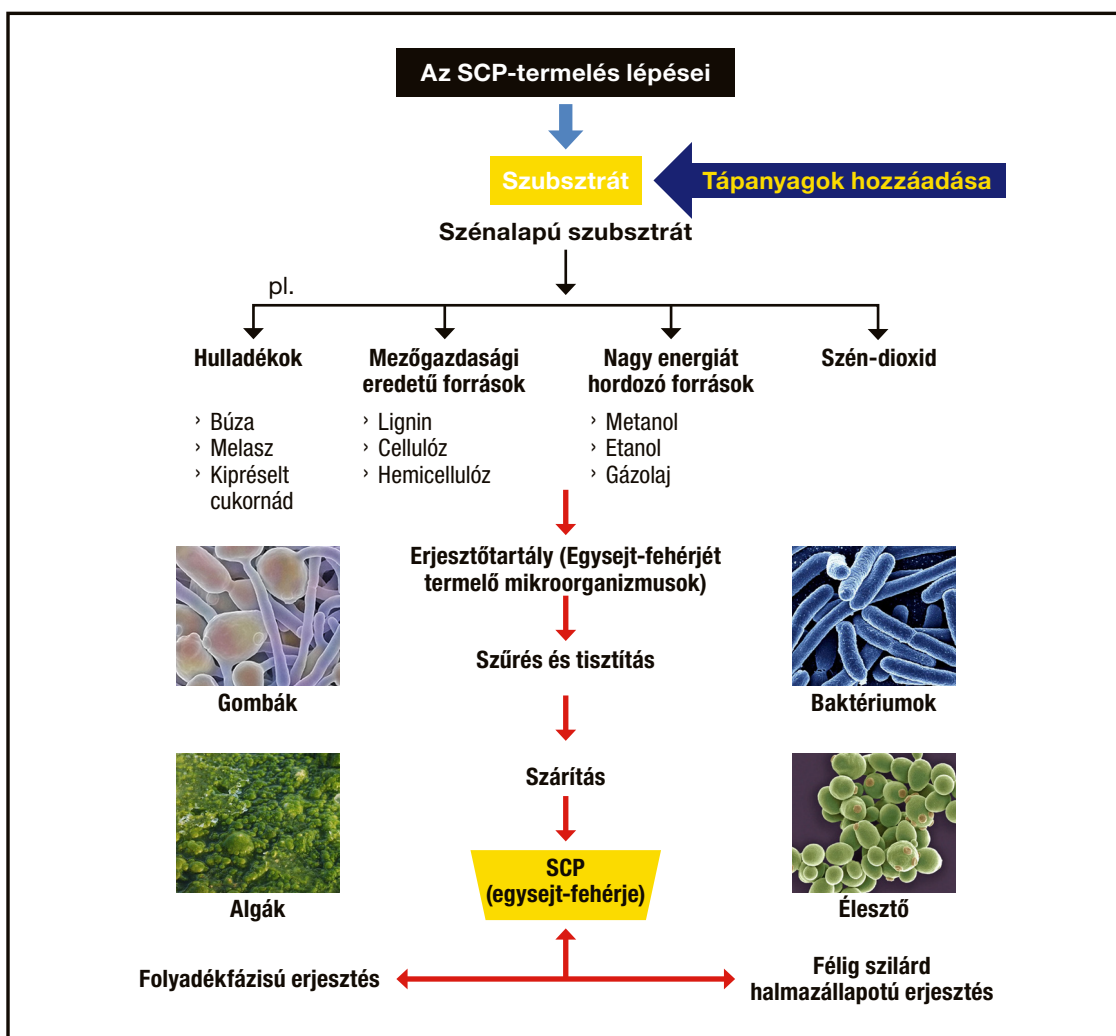
3. Anyag és módszer

Az áttekintő dolgozat elkészítéséhez elektronikus kereséseket végeztünk a Google Scholar adatbázison, a Medline-on és a PubMed-en. További keresést végeztünk az interneten is. A keresési elemek a következők voltak: táplálkozás, étrend, fehérje, egysejt-fehérje, immunrendszer. Ezt az áttekintést a legújabb irodalom elemzésére végeztük, abból a célból, hogy bemutassuk a táplálkozási szokások és az egysejt-fehérjék étrendi hatását.

4. Eredmények

4.1. Egysejt-fehérjék előállítása fermentációval

Az egysejt-fehérje (SCP) egy, természetett mikrobiális biomasszából származó fehérje, amely az étrendben fehérje-kiegészítésre használható. Az SCP fermentációs folyamata a **2. ábrán** látható. Az SCP-k előállításához mezőgazdasági és ipari hulladékok szolgálnak szubsztrátként. Az algák, gombák és baktériumok a mikrobiális fehérje fő forrásai, amelyek SCP-ként hasznosíthatók (**1. táblázat**) [18]. A fajok élelmiszerként való felhasználhatósága függ a növekedési sebességtől, a felhasznált szubsztráttól, annak szennyeződéseitől, toxintartalmától. Az előállított biomassza fehérjében, aminosavakban, például lizinben és metioninban, telítetlen zsírsavakban, vitaminokban és ásványi anyagokban gazdag. Az ilyen biomasszát élelmiszerként, étrend-kiegészítőként [18] és takarmányként világszerte használják.



2. ábra. Egysejt-fehérje előállítása fermentációs eljárással (Módosított vázlat [8])

1. táblázat. Különböző táptalajok és mikroorganizmusok egysejt-fehérje (biomassza) termelésére

Mikroorganizmusok	Szubsztrát	Irodalmi hivatkozások
Trichosporon cutaneum LOCK 0254 Candida tropicalis LOCK 0007 Pichia stipitis LOCK 0047 Candida guilliermondii ATCC 6260 Saccharomyces cerevisiae LOCK 0132	Cukorrépa pép	[19]
<i>Candida utilis</i>	Melsz	[20]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Fruktóz táptalaj	[21]
<i>Spirulina platensis</i>	Répa vinasz	[22]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KV-25	Melasz, Kukorica főzőlé	[23]
<i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	Forrázott rizs	[24]
<i>Candida utilis</i>	Rizs	[25]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Candida crusei</i>	Búza	[26]
<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma viride</i>	Citrom pulp	[27]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Szűz szőlőtörköly	[28]
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Nyers cukorrépa juice, Hidrolizált préselt cukornád	[29]

4.2. Élelmiszer melléktermékek, főként melasz és kukoricaáztató lé felhasználása biomassza előállítására

A termelési költségek csökkentésének, az élelmiszerrendszer kapacitásának növelése és a környezeti fenntarthatósági kampányhoz való csatlakozás fontos feltétele az élelmiszer-veszteség és -pazarlás csökkentése. Az élelmiszer-hulladék számos biológiailag lebomló komponenst tartalmaz a kórokozó mikroorganizmusok számára, amelyek fertőző betegségeket okozhatnak. Így az élelmiszer-veszteség és a hulladékcsökkentés szintén kedvező hatással van a fogyasztók egészségére és jólétére.

Az Európai Unió ennek szellemében is támogatja az élelmiszer-pazarlás csökkentését, amelyek zöldségekből, gyümölcsökből, italokból, cukorból, húsból, akvakultúrából és tenger gyümölcseiből származó élelmiszer-melléktermékek funkcionális vagy bioaktív összetevőit is tartalmazzák. Az élelmiszer-melléktermékek felhasználhatók a táplálék- vagy gyógyszeriparban. Ezek fermentációs biotechnológiával állati takarmánytermékeké alakíthatók [30]. Az egyik leggyakrabban használt élelmiszer-melléktermék a melasz és a kukoricapehely. A melasz (M) a cukornád mellékterméke, és számos fermentációs vegyületet tartalmaz, például vitaminokat, ásványi anyagokat, szacharózt és szerves vegyületeket. Ezenkívül a kukorica áztatólúg (CSL) a kukorica nedves őrlési iparának mellékterméke, és számos összetevőben gazdag, például vitaminokban, ásványi anyagokban, aminosavakban és fehérjékben. Ezenkívül a CSL fontos nitrogénforrás is [31]. A fermentációs folyamatban szubsztrátként használt melasszal és kukoricaáztató lével kapcsolatos irodalmi adatokat a **2. táblázatban** foglaltuk össze.

2. táblázat. A melasz és a kukorica áztatólé kedvező hatásait összefoglaló irodalmi hivatkozások

Szubsztrát	A közlemény témája	Hivatkozási szám
Melasz	A melasz kémiai összetételének jellemzése	[32]
Melasz	A melasz hatása a vegyes szilázs fermentációs jellemzőire	[33]
Melasz	Melasz, mint melléktermék és alapanyag	[34]
Melasz	A melaszból történő etanoltermelés vízlábnomának felmérése	[35]
Melasz	A melasz termékek hatása a tehének termelékenységére és tejzsírsavprofiljára	[36]
Kukorica áztatólé	A kukorica áztatószesz antidiabetikus hatása	[37]
Kukorica áztatólé	Friss rizsszalma-szilázs kukoricaáztató lé hatása	[38]

A táblázat a következő oldalon folytatódik.

Szubsztrát	A közlemény témája	Hivatkozási szám
<i>Kukorica áztatólé</i>	Bepeárolt kukorica áztatólúg koncentrátum vizsgálata	[39]
<i>Kukorica áztatólé</i>	A CSL tanulmányozása a tejsavbaktériumok táplálkozásában	[40]
<i>Kukorica áztatólé</i>	A kukoricaáztató lúg mikrobiológiai vizsgálata	[41]

4.3. A fermentációval előállított egysejt-fehérje szerepe az állati takarmányozásban

A jó minőségű és magas fehérjében gazdag emberi élelmiszerek és állati takarmányok, amelyeket fontos növelni a globális népesség növekedésével. A mikrobiális biomasszán alapuló, egysejtű fehérje (SCP) termékek potenciális összetevője ennek az igénynek [42]. Az SCP kiváló minőségű omega-3 zsírsavakat, vitaminokat, mikrotápanyagokat, fehérjét és egyéb, az állati szervezet számára hasznos összetevőket tartalmaz. Ezeket az értékes összetevőket a **3. táblázatban** foglaltuk össze.

3. táblázat. Különböző mikroorganizmusokból származó egysejt-fehérjék különböző, értékes komponensei [42]

SCP források	Fehérjetartalom (%)	Különleges tulajdonságok	A termelő mikroorganizmusok példái
Mikroalgák	60-70 %	Omega-3 zsírsavak termelése	<i>Chlorella vulgaris</i>
Élesztő	30-50 %	Vitaminok és mikrotápanyagok termelése	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bakteriumok	50-80 %	Nagy fehérjetartalom	<i>Methylococcus capsulatus</i>
Protiszták (átmenet az állati és növényi organizmusok között A Szerk.)	10-20 %	Omega-3 zsírsavak termelése	<i>Schizochytrium limacinum</i>

Az egysejt-fehérjék az állati takarmányban kedvezően egészítik ki a fehérjeszükségletet a hagyományos takarmányok mellett. Ez az állati eredetű termékek minőségét is befolyásolhatja. Az egysejt-fehérjék állati takarmányban betöltött szerepét számos kézirat igazolja, melyeket a **4. táblázat** mutat be.

4. táblázat. Az egysejt-fehérjék szerepe a takarmányban

Vizsgált állatfaj	Az egysejt-fehérjék kedvező hatása a táplált állatra	Irodalmi hivatkozás jelzete
Pisztrángsügér (<i>Micropterus salmoides</i>)	Az atlanti lazac intenzív súlygyarapodása	[43]
Szarvasmarha	Szarvasmarhánál a szoptatás alatti kedvező hatás teljesen vegyes takarmányadag részeként érvényesül	[44]
Broiler csirke	A takarmányfelvétel és a súlygyarapodás javítása	[45]
Norvég vörös szarvasmarha	A mikrobiológiai eredetű fehérjeforrások (C. utilis) kedvezően hatnak a sajt minőségére	[46]
Abalon tengeri kagylók (Haliotidae családba tartozó kis és nagyon nagy tengeri haslábú puhatestűek csoportjának általános neve. A Szerk.)	Az egysejtű fehérje fokozza a tengeri kagylók növekedését	[47]

5. Irodalom

- [1] Ritala A., Häkkinen Suvi T., Toivari M., Wiebe Marilyn G. (2017) Single Cell Protein State of the Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*. 8:1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
- [2] Dallas D. C., Sanctuary M. R., Qu Y., Khajavi S. H., Van Zandt A. E., Dyandra M., Frese S. A., Barile D., Germal J. B. (2017): Personalizing protein nourishment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(15):3313-3331. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1117412>
- [3] Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002): *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman Section 23.1, Proteins Are Degraded to Amino Acids. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22600/>
- [4] Lopez M. J, Mohiuddin S. S. (2021): *Biochemistry, Essential Amino Acids*. [Updated 2021 Mar 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
- [5] Delimaris I. (2013): Adverse Effects Associated with Protein Intake above the Recommended Dietary Allowance for Adults. *ISRN Nutrition*. 2013:1-6. <https://doi.org/10.5402/2013/126929>
- [6] Benjamin O, Lappin S. L. (2021): *Kwashiorkor*. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing, 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507876/>
- [7] Ahmed M., Ahmed W., Byrne J. (2013): Adsorption of Amino Acids Onto Diamond for Biomedical Applications: Deposition, Characterization and the Adsorption Behaviour of Amino Acids on Doped Diamond. *KS Omniscriptum Publishing*. 296. ISBN: 365947360X, 9783659473609
- [8] Sharif M., Zafar M. H., Aqid A. I., Saeed M., Farag M. R., Alagawany M. (2021): Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture*. 531:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885>
- [9] Spalvins K., Zihare L., Blumberga D. (2018): Single cell protein production from waste biomass: comparison of various industrial by-products. *Energy Procedia*. 147:409-418. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.07.111>
- [10] Reihani S. F. S., Khosravi-Darani K. (2019): Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 37:34-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.005>
- [11] Baidhe E., Kigozi J., Mukisa I., Muyanja C., Namubiru L., Kitarikawe B. (2021): Unearthing the potential of solid waste generated along the pineapple drying process line in Uganda: A review. *Environmental Challenges*. 2:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2020.100012>
- [12] Allegue L. D., Puyol D., Melero J. A. (2020): Novel approach for the treatment of the organic fraction of municipal solid waste: Coupling thermal hydrolysis with anaerobic digestion and photo-fermentation. *Science of the Total Environment*. 714. pp. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136845>
- [13] Buitrago Mora H. M., Pineros M. A., Espinosa Moreno D., Restrepo Restrepo S., Jaramillo Cardona J. E. C., Álvarez Salano Ó. A., Fernandez-Nino M., González Barrios A. F. (2019): Multiscale design of a dairy beverage model composed of *Candida utilis* single cell protein supplemented with oleic acid. *Journal of Dairy Science*. 102. pp. 9749-9762. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16729>
- [14] Lo C.-A., Chen B. E. (2019): Parental allele-specific protein expression in single cells *In vivo*. *Developmental Biology*. 454:66-73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.004>
- [15] Mahmoud M. M., Kosikowski F. V. (1982): Alcohol and single Cell Protein Production by *Kluyveromyces* in Concentrated Whey Permeates with Reduced Ash. *Journal of Dairy Science*. 65. pp. 2082-2087. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82465-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82465-X)
- [16] Dagher N. J., Sell J. L. (1981): Amino Acid Limitations of Yeast Single-Cell Protein for Growing Chickens. *Poultry Science*. 61. pp. 337-344. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0610337>
- [17] El-Samragy Y. A., Zall R. R. (1987): The Influence of Sodium Chloride on the Activity of Yeast in the Production of Single Cell Protein in Whey Permeate. *Journal of Dairy Science*. 71. pp. 1135-1140. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79666-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79666-6)
- [18] Anupama, Ravindra P. (2000): Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*. 18. pp. 459-479. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00045-8)
- [19] Patelski P., Berlowska J., Dziugan P., Pielechprzybylska K., Balcerak M., Dziekonska U., Kalinowska H. (2015): Utilisation of sugar beet bagasse for the biosynthesis of yeast SCP. *Journal of Food Engineering*. 167. pp. 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.031>
- [20] Lee B., Kim J. K. (2001): Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*. 25. pp. 111-124. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00075-9)

- [21] Kim J. K., Tak K., Moon J. (1998): A continuous fermentation of *Kluyveromyces fragilis* for the production of a highly nutritious protein diet. *Aquacultural Engineering*. 18. pp. 41-49. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00021-1)
- [22] Coca M., Barrocal V. M., Lucas S., Gonzálezbenito G., García-Cubero M. T. (2015): Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioprocess Technology*. 94. pp. 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.012>
- [23] Hanh V., Kim K. (2009): High-Cell-Density Fed-Batch Culture of *Saccharomyces cerevisiae* KV-25 Using Molasses and Corn Steep Liquor. *Journal of Microbiology and biotechnology*. 19. pp. 1603-1611. DOI: 10.4014/jmb.0907.07027
- [24] Zepka L. Q., Jacob-Lopes E., Goldbeck R., Souza-soares L. A., Queiroz M. I. (2010): Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*. 101. pp. 7107-7111. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.001
- [25] Rajoka M. I., Khan S. H., Jabbar M. A., Awan M. S., Hashmi A. S. (2006): Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*. 97. pp. 1934-1941. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.08.019
- [26] Yadav J. S. S., Bezawada J., Ajila C. M., Yan S., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. (2014): Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology*. 164. pp. 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.069>
- [27] De Gregorio, A., Mandalari, G., Arena, N., Nucita, F., Tripodo, M. M., Lo Curto, R. B. (2002): SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology*. 83. pp. 89-94. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00209-7)
- [28] Lo Curto, R. B., Tripodo M. M. (2001): Yeast production from virgin grape marc. *Bioresource Technology*. 78. pp. 5-9. DOI:10.1016/s0960-8524(00)00175-9
- [29] Fontana J. D., Czczuga B., Bonfim T. M. B., Chociai M. B., Oliveira B. H., Guimaraes M. F., Baron M. (1996): Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia Rhodozyma*. *Bioresource Technology*. 58. pp. 121-125. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00092-2)
- [30] Socas-Rodríguez B., Álvarez-Rivera G., Valdés A., Ibáñez E. (2021): Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization? *Trends in Food Science & Technology*. 114. pp. 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>
- [31] Amado I. R., Vázquez J. A., Pastrana L., Teixeira J. A. (2017): Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. *Biochemical Engineering Journal*. 117. pp. 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.017>
- [32] Palmonari A., Cavallini D., Sniffen C. J., Fernandes L., Holder P., Fagioli L., Fusaro I., Biagi G., Formigoni A., Mammi L. (2020): *Short communication*: Characterization of molasses chemical composition. *Journal of Dairy Science*. 103. pp. 6244-6249. DOI: 10.3168/jds.2019-17644
- [33] Wang J., Chen L., Yuan X.-J., Guo G., Li J.-F., Bai Y.-F., Shao T. (2017): Effects of molasses on the fermentation characteristics of mixed silage prepared with rice straw, local vegetable by-products and alfalfa in Southeast China. *Journal of Integrative Agriculture*. 16. pp. 664-670. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61473-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61473-9)
- [34] Sarka E., Bubnik Z., Hinkova A., Gebler J., Kadlec P. (2012): Molasses as a by-product of sugar crystallization and a perspective raw material. *Procedia Engineering*. 42. pp. 1219-1228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.514>
- [35] Chooyok P., Pumijumng N., Ussawarujikulchai A. (2013): The Water Footprint Assessment of Ethanol Production from Molasses in Kanchanaburi and Supanburi Province of Thailand. *APCBEE Procedia*. 5. pp. 283-287. DOI: 10.1016/j.apcbee.2013.05.049
- [36] Siverson A., Vargas-Rodríguez C. F., Bradford B. J. (2014): *Short communication*: Effects of molasses products on productivity and milk fatty acid profile of cows fed diets high in dried distillers grains with solubles. *Journal of dairy Science*. 97. pp. 3860-3865. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7902>
- [37] Karigidi K. O., Olaiya C. O. (2020): Antidiabetic activity of corn steep liquor extract of *Curculigo pilosa* and its solvent fractions in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 10. pp. 555-564. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.06.005>
- [38] Li X., Xu W., Yang J., Zhao H., Xin H., Zhang Y. (2016): Effect of different levels of corn steep liquor addition on fermentation characteristics and aerobic stability of fresh rice straw silage. *Animal Nutrition*. 2. pp. 345-350. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.09.003>

- [39] Waldroup P. W., Hazen K. R. (1979): Examination of Corn Dried Steep Liquor Concentrate and Various Feed Additives as Potential Sources of a Haugh Unit Improvement Factor for Laying Hens. *Poultry Science*. 58. pp. 580-586. <https://doi.org/10.3382/ps.0580580>
- [40] Kennedy H. E., Speck M. L. (1955): Studies on Corn Steep Liquor in the Nutrition of Certain Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 38. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(55\)94960-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(55)94960-2)
- [41] Cardinal B. E. V., Hedrick L. R. (1948): Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *Journal of Biological Chemistry*. pp. 609-612. ([https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52747-8/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52747-8/pdf))
- [42] Jones S. W., Karpol A., Friedman S., Maru B. T., Tracy B. P. (2020): Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current opinion in Biotechnology*. 61. pp. 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.026>
- [43] Yang P., Li X., Song B., He M., Wu C., Leng X. (2021): The potential of *Clostridium autoethanogenum*, a new single cell protein, in substituting fish meal in the diet of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Growth, feed utilization and intestinal histology. *Aquaculture and Fisheries*. pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.03.003>
- [44] Claypool D. W., Church D. C. (1984): Single Cell Protein from Wood Pulp Waste as a Feed Supplement for Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*. 67:216-218. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81287-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81287-4)
- [45] Waldroup P. W., Payne J. R. (1974): Feeding Value of Methanol-Derived Single Cell Protein for Broiler Chicks. *Poultry Science*. 53:1039-1042. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0531039>
- [46] Olsen M. A., While S. G., Porcellato D., Kidane A., Skeie S. B. (2021): Feeding concentrates with different protein sources to high-yielding, mid-lactation Norwegian Red cows: Effect on cheese ripening. *Journal of Dairy Science*. 104: 4062-4073. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19226>
- [47] Jin S.-E., Lee S. J., Kim Y., Park C.-Y. (2020): Spirulina powder as a feed supplement to enhance abalone growth. *Aquaculture Reports*. 17:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100318>

Production of Single Cell Protein by the fermentation biotechnology for Animal Feeding

Keywords: Kwashiorkor, single cell protein, food by-products, animal feeding, fermentation, biotechnology

1. SUMMARY

Background: Fermentation is a sort of biotechnology that uses microorganisms to produce animal food through chemical process. In ancient times, wastes were treated with chemicals, but now companies convert wastes to valuable food, food ingredients or feed products such as single cell oils or single cell protein. The most used substrate is molasses and corn steep liquor which is a part of the fermentation process.

Aim: The aims of the manuscript is to provide an overview of the yeast strains and food by-products used in production of single cell proteins by fermentation process. Furthermore, the manuscript summarizes the role of single cell protein in animal feed.

Methods: Electronic searches were conducted on Google Scholar database Medline and PubMed. A further search was conducted on the Food and agricultural organisation FAO research article database.

Results: Single cell protein produced by these substrates and different microorganisms (algae, yeast, bacteria) play an important role in animal feeding. Furthermore, SCP is a high-quality protein, unsaturated fatty acids, vitamins and minerals sources for animals.

Conclusion: Production of single cell of protein through the fermentation has several significant benefits including sustainability, health and production efficacy.

¹ Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and Environmental Sciences

² SISAF Nanotechnology Drug Delivery, Ulster University

* Corresponding Author: Judit Molnár: Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and Environmental Sciences

Judit MOLNÁR
Dávid VASAS
Renátó KALOCSAI
Tamás SZAKÁL
Mukhtar H. AHMED

jmolnar1222@gmail.com
vasas.david@sze.hu
kalocsai.renato@sze.hu
szakal.tamas@sze.hu
ahmed-m@email.ulster.ac.uk

<https://orcid.org/0000-0001-7439-1153>
<https://orcid.org/0000-0002-9251-8493>
<https://orcid.org/0000-0002-5971-9939>
<https://orcid.org/0000-0002-7319-1018>
<https://orcid.org/0000-0003-0976-3007>

2. Introduction

In ancient times, wastes were treated by various chemicals, but this method wasn't the best. As the worldwide population grows, over recent decades, both animal and dairy production have been increasing steadily. The world now produces more than 350 million tonnes of animal-derived protein, and this value will rise up to around 1250 million tonnes by 2050, to meet global demand for animal-based protein [1]. Now, a lot of company convert various wastes into useful food, food ingredients or feed products for human nutrition and animal feeding. These products are also environment friendly and healthy such as biogas, biofuels, bioenergy. Therefore, different methods and techniques are providing opportunity to develop these products as single cell oils, single cell protein, chemicals, enzymes and many others.

Following the carbohydrate and fat, protein is the major macronutrient, which the body requires in large amount. It is an essential factor for growth, repair of the body and maintenance of health. All of the proteins are made up of the 20 amino acids, and they determine the nutrition values of protein. Some of amino acids cannot be synthesized by humans but are still essential (valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, tryptophan, lysine, histidine, methionine and threonine) and must be obtained from our diet. The general structure of amino acids is shown in the **Figure 1**.

Protein digestion begins in the stomach and continues in the lumen of the intestine and so the proteins are degraded into mono and di amino acids. Those amino acids are absorbed by specific transporters in the intestines, and then released into the blood for use by other tissues, that are considered as the fundamental building blocks of proteins in the body, and they serve as the nitrogenous backbones for compounds like neurotransmitters, enzymes and hormones [2, 3]. Although, both the plant and animal proteins are similar in components, both contain the nearly the same amino acids, but the animal protein contains all the essential amino acids [4].

In general, the human body needs between 1.0 g to 1.5g of protein for each kilogram of weigh in children and adults respectively [5]. If there is insufficient protein in diet chronically that could cause kwashiorkor disease, which is a severe form of malnutrition [6].

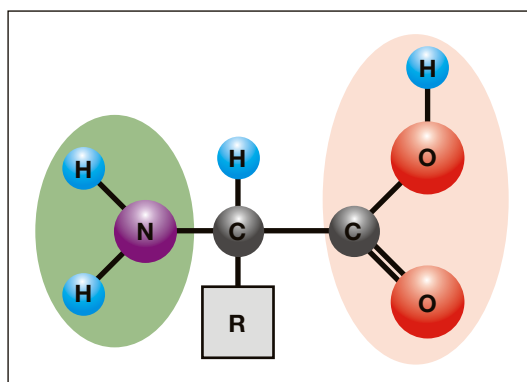


Figure 1. General formula for an amino acid: amino group ($-NH_2$), carboxyl group ($-COOH$) and replaceable group ($-R$) [7]

Single cell protein (SCP) is one of the high qualities and valuable dietary products from wastes [8, 9, 10, 11, 12]. SCP is a biomass which is produced by different microorganisms and it can also be termed as bio-protein, microbial protein or biomass. These microorganisms can be used as protein-rich ingredients in human and animal diet as well [8]. Furthermore, the SCP can be a good alternative to plant protein sources, and it can be produced throughout the year. In addition, they don't emit greenhouse gases. The most important thing is the selection of cheap and suitable substrates or agro-industrial by-products and valuable microorganisms to produce protein and reduce the production cost of single cell proteins [8, 13, 14, 15, 16, 17]. In order to achieve this, different substrates were used as apple pomace, yam peels, citrus pulp, potato peels, pineapple waste, papaya waste [8]. However, the most used by-products are molasses and corn steep liquor. It is also important to choose microorganisms for research and industrial purpose as well.

This manuscript focuses on single cell proteins produced by microorganisms (algae, yeast, bacteria) as an alternative protein source. Due to the favorable content values of the single cell protein produced by fermentation (protein, vitamin, mineral), it can be used in digestible form for human nutrition, especially with vitamin supplementation and this contributes to the protection and treatment of malnutrition as a functional food and functional food ingredient [10].

3. Material and method

Electronic searches were conducted on Google Scholar database, Medline and PubMed. A further search was conducted on internet. The search items included, nutrition, dietary, protein, single cell protein, immune system. This review was conducted to analyse the recent literature to show the impact of nutrition, and single cell protein on the dietary system.

4. Result

4.1. Single cell protein produced by fermentation

Single cell protein (SCP) is a protein from cultivated microbial biomass and it can be used for protein supplementation. The SCP fermentation process can be seen in **Figure 2**. Agricultural and industrial wastes used as substrate to yield SCP. Algae, fungi and bacteria are all the main sources of microbial protein that can be utilized as SCP (**Table 1**) [18]. In addition, the acceptability of species as food depends on the growth rate, substrate used, contamination, associated toxins. The produced biomass is rich in proteins, amino acids as lysine and methionine, unsaturated fatty acids, vitamins and minerals. Therefore, these are used as food, food supplements [18] and animal feed in the world.

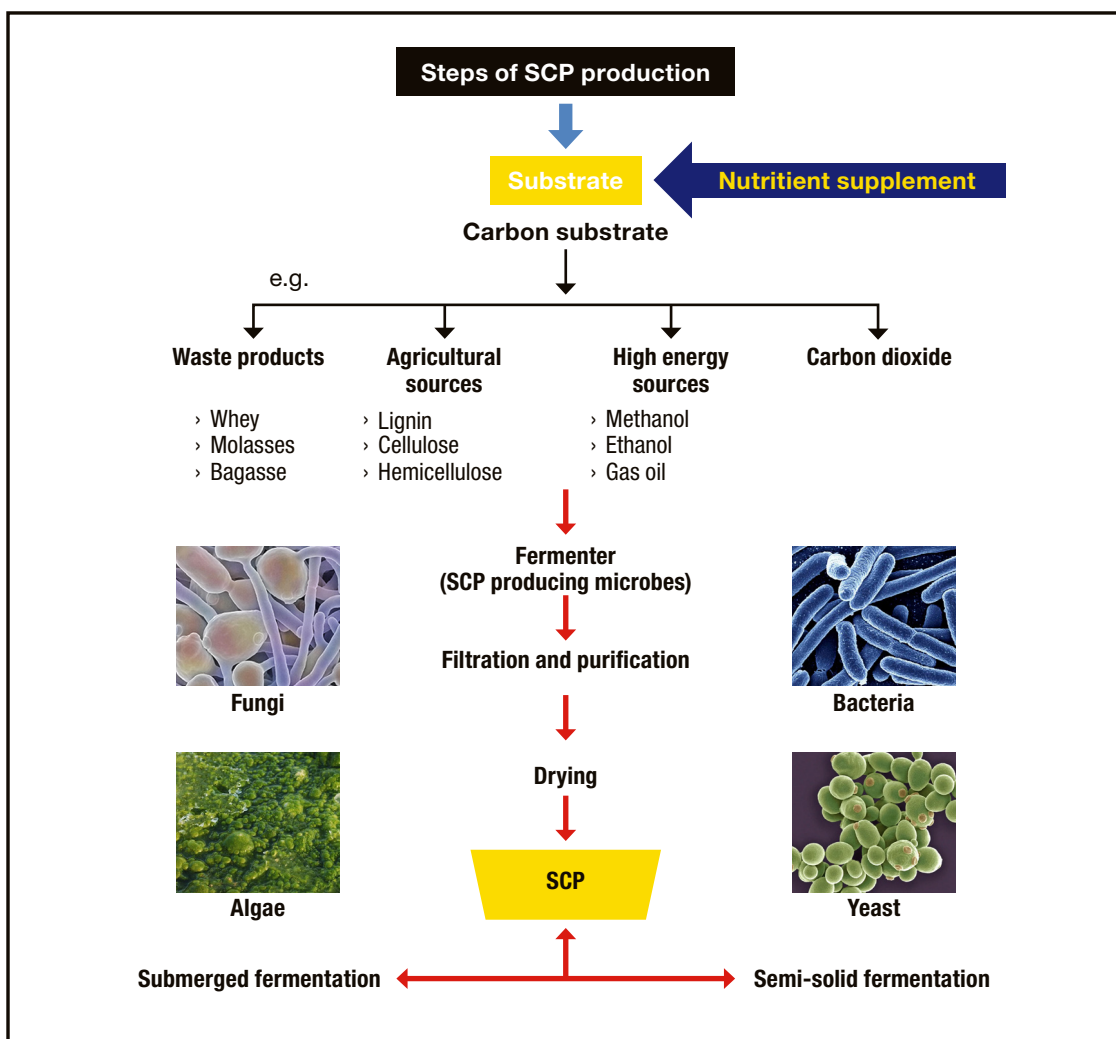


Figure 2. Producing single cell protein by fermentation technology (Modified scheme [8])

Table 1. Single cell protein (biomass) production from microorganisms and different substrates

Microorganisms	Substrate	References
Trichosporon cutaneum LOCK 0254 Candida tropicalis LOCK 0007 Pichia stipitis LOCK 0047 Candida guilliermondii ATCC 6260 Saccharomyces cerevisiae LOCK 0132	Sugar beet pulp	[19]
<i>Candida utilis</i>	Molasses	[20]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Fructose medium	[21]
<i>Spirulina platensis</i>	Beet vinasse	[22]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KV-25	Molasses Corn steep liquor	[23]
<i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli	Parboiled rice	[24]
<i>Candida utilis</i>	Rice	[25]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Candida crusei</i>	Whey	[26]
<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma viride</i>	Lemon pulps	[27]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Virgin grape marc	[28]
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Raw sugarcane juice Depolymerized bagasse	[29]

4.2. Use of food by-products for the production of biomass, in particular molasses and corn steep liquor

Food loss and waste reduction is an important way to reduce costs of production, increase the food system capacity and is also a way to join the environmental sustainability campaign. Food waste also contains several biodegradable components for pathogenic microorganisms that can cause communicable diseases. Thus, food loss and waste reductions also have a positive effect on the well-being and health of the consumers. Therefore, the European Union (EU) is promoting the reduction of food wastes and these food by-products from vegetables, fruits, beverages, sugar, meat, aquaculture and seafood also contain functional or bioactive components. The food by-products can be used in nutraceutical or pharmaceutical industries. These can be transformed by fermentation biotechnology into animal feed products [30]. One of the most used food by-products are molasses and corn steep liquor. Molasses (M) is a by-product of sugar cane and it contains several compounds for fermentation for example vitamins, minerals, sucrose and organic compounds. In addition, corn steep liquor (CSL) is a by-product of the corn wet milling industry and it is rich in several components such as vitamins, minerals, amino acids and proteins. Furthermore, the CSL is also an important source of nitrogen [31]. The used molasses and corn steep liquor as a substrate in the fermentation process can be seen in **Table 2**

Table 2. Summary of literature references of the beneficial effects of molasses and corn steep liquor

Substrate	The topic of the publications	References
Molasses	Characterization of molasses chemical composition	[32]
Molasses	Effect of molasses on the fermentation characteristics of mixed silage	[33]
Molasses	Molasses as by-product and raw material	[34]
Molasses	The water footprint assessment of ethanol production from molasses	[35]
Molasses	Effect of molasses products on productivity and milk fatty acid profile of cows	[36]
Corn steep liquor	Antidiabetic activity of corn steep liquor	[37]
Corn steep liquor	Effect of corn steep liquor of fresh rice straw silage	[38]
Corn steep liquor	Examination of corn dried steep liquor concentrate	[39]
Corn steep liquor	Studies of CSL in nutrition of lactic acid bacteria	[40]
Corn steep liquor	Microbiological assay of corn steep liquor	[41]

4.3. Role of single cell protein produced by fermentation in animal feeding

The high quality and high protein rich human food and animal feed important to increase with the global population grows. Single cell protein (SCP) products based on microbial biomass, have a potential ingredient to this need [42]. The SCP contains high quality omega-3 fatty acids, vitamins, micronutrients, protein and other useful component for animal body. These valuable components can be seen in **Table 3**.

Table 3. Valuable components in single cell protein from different microorganisms [42]

SCP sources	Protein content range	Special characteristics	Example of specific organisms
Microalgae	60-70 %	Production of omega-3 fatty acids	<i>Chlorella vulgaris</i>
Yeasts	30-50 %	Production of vitamins and micronutrients	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bacteria	50-80 %	High protein content	<i>Methylococcus capsulatus</i>
Protists	10-20 %	Production of omega-3 fatty acids	<i>Schizochytrium limacinum</i>

Single cell proteins in animal feed supplement protein requirements well in addition to conventional feeds. This can also affect the quality of products of animal origin. The role of single cell proteins in animal feed is confirmed by several manuscripts, which are shown in **Table 4**.

Table 4. The role of single cell proteins in animal feed

The tested animal	Positive effect of single cell protein on the animal	References
Largemouth bass (<i>Micropterus salmoides</i>)	Improved weight gain of Atlantic salmon	[43]
Cows	The positive effect during lactation is acceptable as part of a completely mixed ration	[44]
Broiler chicks	Improving feed consumption and weight gains	[45]
Norwegian Red cows	The microbial protein sources (<i>C. utilis</i>) has a positive effect of good quality of cheese	[46]
Abalone	The single cell protein increases the growth of abalone	[47]

5. References

- [1] Ritala A., Häkkinen Suvi T., Toivari M., Wiebe Marilyn G. (2017) Single Cell Protein State of the Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*. 8:1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
- [2] Dallas D. C., Sanctuary M. R., Qu Y., Khajavi S. H., Van Zandt A. E., Dyandra M., Frese S. A., Barile D., Germal J. B. (2017): Personalizing protein nourishment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(15):3313-3331. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1117412>
- [3] Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002): *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman Section 23.1, Proteins Are Degraded to Amino Acids. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22600/>
- [4] Lopez M. J, Mohiuddin S. S. (2021): *Biochemistry, Essential Amino Acids*. [Updated 2021 Mar 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
- [5] Delimaris I. (2013): Adverse Effects Associated with Protein Intake above the Recommended Dietary Allowance for Adults. *ISRN Nutrition*. 2013:1-6. <https://doi.org/10.5402/2013/126929>
- [6] Benjamin O, Lappin S. L. (2021): *Kwashiorkor*. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing, 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507876/>
- [7] Ahmed M., Ahmed W., Byrne J. (2013): Adsorption of Amino Acids Onto Diamond for Biomedical Applications: Deposition, Characterization and the Adsorption Behaviour of Amino Acids on Doped Diamond. *KS Omniscriptum Publishing*. 296. ISBN: 365947360X, 9783659473609
- [8] Sharif M., Zafar M. H., Aqid A. I., Saeed M., Farag M. R., Alagawany M. (2021): Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture*. 531:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885>
- [9] Spalvins K., Zihare L., Blumberga D. (2018): Single cell protein production from waste biomass: comparison of various industrial by-products. *Energy Procedia*. 147:409-418. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.07.111>
- [10] Reihani S. F. S., Khosravi-Darani K. (2019): Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 37:34-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.005>
- [11] Baidhe E., Kigozi J., Mukisa I., Muyanja C., Namubiru L., Kitarikawe B. (2021): Unearthing the potential of solid waste generated along the pineapple drying process line in Uganda: A review. *Environmental Challenges*. 2:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2020.100012>
- [12] Allegue L. D., Puyol D., Melero J. A. (2020): Novel approach for the treatment of the organic fraction of municipal solid waste: Coupling thermal hydrolysis with anaerobic digestion and photo-fermentation. *Science of the Total Environment*. 714. pp. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136845>
- [13] Buitrago Mora H. M., Pineros M. A., Espinosa Moreno D., Restrepo Restrepo S., Jaramillo Cardona J. E. C., Álvarez Salano Ó. A., Fernandez-Nino M., González Barrios A. F. (2019): Multiscale design of a dairy beverage model composed of *Candida utilis* single cell protein supplemented with oleic acid. *Journal of Dairy Science*. 102. pp. 9749-9762. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16729>
- [14] Lo C.-A., Chen B. E. (2019): Parental allele-specific protein expression in single cells *In vivo*. *Developmental Biology*. 454:66-73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.004>
- [15] Mahmoud M. M., Kosikowski F. V. (1982): Alcohol and single Cell Protein Production by *Kluyveromyces* in Concentrated Whey Permeates with Reduced Ash. *Journal of Dairy Science*. 65. pp. 2082-2087. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82465-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82465-X)
- [16] Dagher N. J., Sell J. L. (1981): Amino Acid Limitations of Yeast Single-Cell Protein for Growing Chickens. *Poultry Science*. 61. pp. 337-344. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0610337>
- [17] El-Samragy Y. A., Zall R. R. (1987): The Influence of Sodium Chloride on the Activity of Yeast in the Production of Single Cell Protein in Whey Permeate. *Journal of Dairy Science*. 71. pp. 1135-1140. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79666-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79666-6)
- [18] Anupama, Ravindra P. (2000): Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*. 18. pp. 459-479. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00045-8)
- [19] Patelski P., Berlowska J., Dziugan P., Pielechprzybylska K., Balcerek M., Dziekonska U., Kalinowska H. (2015): Utilisation of sugar beet bagasse for the biosynthesis of yeast SCP. *Journal of Food Engineering*. 167. pp. 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.031>
- [20] Lee B., Kim J. K. (2001): Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*. 25. pp. 111-124. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00075-9)

- [21] Kim J. K., Tak K., Moon J. (1998): A continuous fermentation of *Kluyveromyces fragilis* for the production of a highly nutritious protein diet. *Aquacultural Engineering*. 18. pp. 41-49. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00021-1)
- [22] Coca M., Barrocal V. M., Lucas S., Gonzálezbenito G., García-Cubero M. T. (2015): Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioproducts Processing*. 94. pp. 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.012>
- [23] Hanh V., Kim K. (2009): High-Cell-Density Fed-Batch Culture of *Saccharomyces cerevisiae* KV-25 Using Molasses and Corn Steep Liquor. *Journal of Microbiology and biotechnology*. 19. pp. 1603-1611. DOI: 10.4014/jmb.0907.07027
- [24] Zepka L. Q., Jacob-Lopes E., Goldbeck R., Souza-soares L. A., Queiroz M. I. (2010): Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*. 101. pp. 7107-7111. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.001
- [25] Rajoka M. I., Khan S. H., Jabbar M. A., Awan M. S., Hashmi A. S. (2006): Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*. 97. pp. 1934-1941. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.08.019
- [26] Yadav J. S. S., Bezawada J., Ajila C. M., Yan S., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. (2014): Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology*. 164. pp. 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.069>
- [27] De Gregorio, A., Mandalari, G., Arena, N., Nucita, F., Tripodo, M. M., Lo Curto, R. B. (2002): SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology*. 83. pp. 89-94. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00209-7)
- [28] Lo Curto, R. B., Tripodo M. M. (2001): Yeast production from virgin grape marc. *Bioresource Technology*. 78. pp. 5-9. DOI:10.1016/s0960-8524(00)00175-9
- [29] Fontana J. D., Czczuga B., Bonfim T. M. B., Chociai M. B., Oliveira B. H., Guimaraes M. F., Baron M. (1996): Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia Rhodozyma*. *Bioresource Technology*. 58. pp. 121-125. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00092-2)
- [30] Socas-Rodríguez B., Álvarez-Rivera G., Valdés A., Ibáñez E. (2021): Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization? *Trends in Food Science & Technology*. 114. pp. 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>
- [31] Amado I. R., Vázquez J. A., Pastrana L., Teixeira J. A. (2017): Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. *Biochemical Engineering Journal*. 117. pp. 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.017>
- [32] Palmonari A., Cavallini D., Sniffen C. J., Fernandes L., Holder P., Fagioli L., Fusaro I., Biagi G., Formigoni A., Mammi L. (2020): *Short communication*: Characterization of molasses chemical composition. *Journal of Dairy Science*. 103. pp. 6244-6249. DOI: 10.3168/jds.2019-17644
- [33] Wang J., Chen L., Yuan X.-J., Guo G., Li J.-F., Bai Y.-F., Shao T. (2017): Effects of molasses on the fermentation characteristics of mixed silage prepared with rice straw, local vegetable by-products and alfalfa in Southeast China. *Journal of Integrative Agriculture*. 16. pp. 664-670. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61473-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61473-9)
- [34] Sarka E., Bubnik Z., Hinkova A., Gebler J., Kadlec P. (2012): Molasses as a by-product of sugar crystallization and a perspective raw material. *Procedia Engineering*. 42. pp. 1219-1228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.514>
- [35] Chooyok P., Pumijumnog N., Ussawarujikulchai A. (2013): The Water Footprint Assessment of Ethanol Production from Molasses in Kanchanaburi and Supanburi Province of Thailand. *APCBEE Procedia*. 5. pp. 283-287. DOI: 10.1016/j.apcbee.2013.05.049
- [36] Siverson A., Vargas-Rodríguez C. F., Bradford B. J. (2014): *Short communication*: Effects of molasses products on productivity and milk fatty acid profile of cows fed diets high in dried distillers grains with solubles. *Journal of dairy Science*. 97. pp. 3860-3865. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7902>
- [37] Karigidi K. O., Olaiya C. O. (2020): Antidiabetic activity of corn steep liquor extract of *Curculigo pilosa* and its solvent fractions in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 10. pp. 555-564. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.06.005>
- [38] Li X., Xu W., Yang J., Zhao H., Xin H., Zhang Y. (2016): Effect of different levels of corn steep liquor addition on fermentation characteristics and aerobic stability of fresh rice straw silage. *Animal Nutrition*. 2. pp. 345-350. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.09.003>

- [39] Waldroup P. W., Hazen K. R. (1979): Examination of Corn Dried Steep Liquor Concentrate and Various Feed Additives as Potential Sources of a Haugh Unit Improvement Factor for Laying Hens. *Poultry Science*. 58. pp. 580-586. <https://doi.org/10.3382/ps.0580580>
- [40] Kennedy H. E., Speck M. L. (1955): Studies on Corn Steep Liquor in the Nutrition of Certain Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 38. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(55\)94960-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(55)94960-2)
- [41] Cardinal B. E. V., Hedrick L. R. (1948): Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *Journal of Biological Chemistry*. pp. 609-612. ([https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52747-8/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52747-8/pdf))
- [42] Jones S. W., Karpol A., Friedman S., Maru B. T., Tracy B. P. (2020): Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current opinion in Biotechnology*. 61. pp. 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.026>
- [43] Yang P., Li X., Song B., He M., Wu C., Leng X. (2021): The potential of *Clostridium autoethanogenum*, a new single cell protein, in substituting fish meal in the diet of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Growth, feed utilization and intestinal histology. *Aquaculture and Fisheries*. pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.03.003>
- [44] Claypool D. W., Church D. C. (1984): Single Cell Protein from Wood Pulp Waste as a Feed Supplement for Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*. 67:216-218. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81287-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81287-4)
- [45] Waldroup P. W., Payne J. R. (1974): Feeding Value of Methanol-Derived Single Cell Protein for Broiler Chicks. *Poultry Science*. 53:1039-1042. DOI: 10.3382/ps.0531039
- [46] Olsen M. A., While S. G., Porcellato D., Kidane A., Skeie S. B. (2021): Feeding concentrates with different protein sources to high-yielding, mid-lactation Norwegian Red cows: Effect on cheese ripening. *Journal of Dairy Science*. 104: 4062-4073. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19226>
- [47] Jin S.-E., Lee S. J., Kim Y., Park C.-Y. (2020): Spirulina powder as a feed supplement to enhance abalone growth. *Aquaculture Reports*. 17:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100318>

In vitro tesztrendszer alkalmazása probiotikus baktériumtörzsek szelektálására

Kulcsszavak: probiotikum, *Lactobacillus*, epesav, gyomorsav, RAPD-PCR, autoaggregáció

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink célja olyan *in vitro* módszerek értékelése volt, amelyekkel egyszerűen és hatékonyan lehet feltételezetten probiotikus baktériumtörzseket szelektálni. A szóba jöhető eljárások közül a következőket teszteltük: szelektív táptalajon való tenyésztés, Gram-festés, kataláz-próba, hemolízis-, klonalitás-, aggregációs képesség-, gyomorsavtűrés- és epesavtűrés-vizsgálat. Kísérleteinkbe Erdélyben előállított nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált, összesen 217 db baktériumtörzset vontunk be. A hemolizáló és a probiotikumokra nem jellemző Gram-negatív, valamint kataláz-pozitív fenotípust mutató izolátumokat kizártuk a vizsgálatokból. Az egyed szintű polimorfizmusok feltárására alkalmas RAPD-PCR vizsgálatok eredményei alapján összesen 34 klónosztályt és 57 egyedi RAPD mintázattal rendelkező törzset különböztettünk meg. Az így leszűkített 34 klónosztályból egy-egy törzset kiválasztottunk, majd teszteltük azok aggregációs képességét, továbbá sav-, és epesav-tűrését. Összesen hat izolátumnál mértük a probiotikus törzsekre jellemzően magas, 70% feletti aggregációs értéket. A savval vagy epesavval kiegészített szilárd táptalaj felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálatok során sikerült több, kimondottan sav- és epesav-tűrő törzset is szelektálnunk. Eredményeink alapján kiválasztottuk a további tesztekbe – pl. antibiotikum-rezisztencia és antimikrobiális aktivitás vizsgálatokba – bevonandó izolátumokat.

¹ Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.

² Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék

³ Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola

SÜLE Judit
VARGA László
HATVAN Zoltán
KERÉNYI Zoltán

jsule@mtki.hu
varga.laszlo@sze.hu
hatvanzoltan@gmail.com
kerenyiz68@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7202-9748>
<https://orcid.org/0000-0001-7431-852X>
<https://orcid.org/0000-0002-3885-4904>
<https://orcid.org/0000-0001-8665-5216>

2. Bevezetés

A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben alkalmazva jótékonyan befolyásolják a gazdaszervezet egészségét [1, 2]. Számos feltételnek kell eleget tenniük ahhoz, hogy a probiotikus jelzőt viselhessék. Egyebek mellett fokozott tűrőképességgel szükséges rendelkezniük a különféle testfolyadékokkal (gyomorsav, epesavak, emésztőenzimek) szemben és adhéziós képességük révén, a bélhámszövet sejtjeihez kötődve stabilizálniuk kell a bélmikrobiotát [3].

Az egészségre jótékony hatást kifejtő probiotikus termékek iránt világszerte növekvő igény mutatkozik, legyen szó akár humán táplálkozásról akár haszonállatok takarmányozásáról. Az Európai Unió 2006-tól betiltotta az antibiotikumok hozamfokozó célból történő alkalmazását [4], ezt követően kerültek még inkább a figyelem középpontjába a probiotikumok.

Évről-évre nagyszámú baktériumtörzset izolálnak azzal a céllal, hogy egészségre gyakorolt előnyös hatásait kiaknázzák. A komplex és költséges állatkísérleteket meg kell előznie egy *in vitro* vizsgálatokból álló szelektációs rendszernek, amellyel egyszerűen, gyorsan és költséghatékonyan kiválaszthatók azok a törzsek – a több száz vagy akár több ezer izolátum közül –, amelyek remélhetőleg probiotikusnak bizonyulnak majd az *in vivo* kísérletek során [5, 6, 7].

Az elmondottak alapján, munkánk célja olyan *in vitro* mérési módszerek kidolgozása és értékelése volt, amelyekkel gyorsan és hatékonyan lehet baktériumtörzsek klasszikus mikrobiológiai jellemzőit, klonalitását, aggregációs képességét, valamint gyomorsavval és epesavval szembeni ellenállóságát vizsgálni. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az általunk vizsgált nagyszámú izolátum között található-e klónok és potenciálisan előnyös (akár probiotikus) tulajdonságokkal rendelkező törzsek, melyeket érdemes további *in vitro* vizsgálatokba bevonni. Azt is vizsgáltuk, hogy a tesztrendszer jól működik-e, avagy az egyes lépéseket esetleg szükséges optimalizálni, továbbá, hogy milyen sav- és epesav-koncentrációkat képesek az egyes törzsek tolerálni, ill. az aggregáció-vizsgálat, a sav- és epesav-tűrés eredményei között van-e bármiféle összefüggés. Ennek megfelelően, az *in vitro* tesztek közül az alábbi vizsgálati módszerekkel kapott eredményeket mutatjuk be közleményünkben:

- Klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok (szelektív táptalajon történő tenyésztés és telepmorfológia megállapítása, Gram-festés és azt követő mikroszkópos vizsgálat, kataláz-próba, hemolízis-vizsgálat)
- Klonalitásvizsgálat RAPD-PCR módszerrel
- Autoaggregáció-vizsgálat
- Savval vagy epesavval kiegészített szilárd táptalaj felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálat

3. Anyagok és módszerek

3.1. Baktériumtörzsek izolálása, tenyésztése, tartósítása és tárolása

Vizsgálatainkat Erdélyben előállított nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált baktériumtörzsekkel végeztük. A termékek természetes mikrobiotával rendelkeztek, gyártásukhoz nem használtak fel kereskedelmi forgalomból származó starterkultúrákat. A sajtok előállításához borjúgyomorból készítették oltót a juhászok. A cél olyan, nagyhatékonyságú probiotikus törzsek izolálása volt, amelyek később felhasználhatók lesznek probiotikus termékek fejlesztéséhez. A 217 db izolátum és a kontroll törzsek felélesztése, ill. tenyésztése az **1. táblázat**ban közölt paraméterek szerint történt.

1. táblázat. A kísérletekbe bevont saját izolálású és kontroll baktériumtörzsek felélesztésének és tenyésztésének körülményei

Törzs	Tápleves	Táptalaj	Inkubálási körülmények
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRS leves (pH = 6,2)	MRS agar (pH = 6,2)	37 °C, 72 óra, anaerob
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	MRS leves (pH = 6,2)	MRS agar (pH = 6,2)	37 °C, 72 óra, anaerob
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 49775	CASO leves	CASO agar	37 °C, 24 óra, aerob
E1–E92 izolátumok	MRS leves (pH = 6,2)	MRS–CC agar [*]	37 °C, 72 óra, anaerob
E93–E217 izolátumok	MRS leves (pH = 5,4)	MRS agar (pH = 5,4)	37 °C, 72 óra, anaerob

^{*} Clindamycinnel és ciprofloxacinnal kiegészített De Man–Rogosa–Sharpe agar

Az izolátumok tartósítása és tárolása glicerines törzsoldatban történt. 3 ml táplevesbe belemostunk egy oltókacccsal, MRS–CC agar, ill. MRS pH 5,4 agar felületéről levett törzset, majd inkubáltuk a törzs igényeinek megfelelően. A felszaporított tenyészetből krio (fagyasztó) csőbe adagoltunk 300 µl-t, 900 µl 60%-os glicerindatát adtunk hozzá, vortexeltük és cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk kb. 30 mp-ig. A tárolás -80 °C-on történt, ultramély-fagyasztóban.

3.2. A szelektív tenyésztés körülményei, tápközegei és elkészítésük

3.2.1. Fiziológiás sóoldat

A decimális hígítási sor előállításához használt hígítófolyadékhoz 8,5 g NaCl-ot és 1 g triptont mértünk be, majd 1 L desztillált vízben feloldottuk. A kémcsövekbe 9,3 ml-t adagoltunk, majd 121 °C-on 15 percig autoklávban sterilizáltuk.

3.2.2. Foszfát-puffer (PBS) oldat

Egy liter desztillált vízhez analitikai mérlegen mértük be az alábbi anyagokat: 80 g nátrium-kloridot, 2 g kálium-kloridot, 14,4 g dinátrium-hidrogén-foszfát-12-hidrátot és 2,4 g kálium-dihidrogén-foszfátot. Mágneses keverővel segítettük az oldódást, majd, amikor az oldat szemcsementessé vált, 121 °C-on, 15 percen át autoklávban sterilizáltuk. Az így elkészült oldat tízszeres töménységű PBS-nek felelt meg, vagyis a további felhasználáshoz hígítani kellett az alábbiak szerint: 900 ml desztillált vízhez adunk 100 ml 10 × PBS oldatot. Megfelelő elegyítést követően használatra kész volt az 1 × PBS oldat.

3.2.3. De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar és leves (pH = 6,2)

Kereskedelmi forgalomban kapható MRS levesből (VWR, Radnor, PA, USA), ill. MRS agarból (VWR) a gyártó által ajánlott mennyiséget analitikai pontossággal bemértük, majd desztillált vízben feloldottuk, mágneses keverővel oldódásig kevertettük. A kívánt pH-értéket ($6,2 \pm 0,2$) 1 M HCl-oldattal állítottuk be. Ezt követően a tápközegeket autoklávban, 121°C-on, 15 percig sterilizáltuk.

3.2.4. MRS agar (pH = 5,4)

Az MRS agart (VWR) a gyártó utasításait követve előkészítettük, majd a pH-értékét 1 M HCl-oldattal beállítottuk 5,4-re, végül autoklávban sterilizáltuk standard paraméterek mellett (121 °C, 15 perc).

3.2.5. Clindamycinnel és ciprofloxacinnal kiegészített MRS agar (MRS–CC)

Az MRS–CC agar az alap MRS agaron kívül két, autoklávban nem sterilizálható antibiotikum-törzsoldatot is tartalmazott. Az egyik törzsoldat elkészítéséhez 10 ml desztillált vízben 2,0 mg clindamycin-hydrocloridot (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), a másikhoz pedig 10 ml mennyiségű desztillált vízben 20,0 mg ciprofloxacín-hydrocloridot (Sigma Aldrich) oldottunk fel. Ezután 0,22 µm pórusátmérőjű membránszűrőn (Millipore, Burlington, MA, USA) átszűrtük az antibiotikum-törzsoldatokat steril, csavaros kupakkal ellátott Erlenmeyer lombikokba. A 45 °C-ra lehűtött MRS agarhoz aseptikus körülmények között 0,1 ml clindamycin- és 1,0 ml ciprofloxacín-törzsoldatot adtunk steril, egyszer használatos pipettával (Greiner Bio-One Hungary, Mosonmagyaróvár, Magyarország). Így a clindamycin végleges koncentrációja az alap MRS agarban 0,1 mg/l, a ciprofloxaciné pedig 10,0 mg/l lett.

3.2.6. CASO agar

A CASO-agart (VWR) és CASO-levest (VWR) a gyártó utasításait követve készítettük el. A sterilizálás standard paraméterek mellett, 121 °C-on 15 percig, autoklávban történt.

3.2.7. Anaerob tenyésztés

Az anaerob körülményeket a következőképpen biztosítottuk a vizsgálatok során: AnaeroPack Rectangular tégelyben (Merck, Darmstadt, Németország), GENbox anaerob só (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország) hozzáadásával inkubáltuk az agarlemezeket. Az anaerob körülmények fennállásáról a Microbiologic Aerotest indikátor (Merck) fehérről kék színre való változása adott tájékoztatást.

3.3. Klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok

3.3.1. Telepmorfológia vizsgálata

A felélesztett törzsek makromorfológiai jellemzőit feljegyeztük. Megfigyeltük többek között a telepek méretét, színét, felületi tulajdonságait (fényes, matt) és a telepek szélének kialakítását (szabályos, szabálytalan, csipkézett).

3.3.2. Gram-festés

Zsírtalanított tárgylemezre egy csepp desztillált vizet cseppentettünk, amiben egy szoliter telepet elszuszpendáltunk. A megszáradt kenetet 2 percig kristályibolya oldattal festettük, majd 1 percig lugol-oldattal kezeltük. Ezt követően desztillált vízzel öblítettük, majd fél percig dekolorizáló oldattal kezeltük a mintát, amely a Gram-negatív sejtekből kivonta a festéket a Gram-pozitívokból viszont nem. Ismét desztillált vizes öblítés következett, majd szafraninnal kontrasztfestést végeztünk 1 percen keresztül. Azután desztillált vizes öblítés következett és hagytuk megszáradni a keneteket, melyeket fénymikroszkóppal (Axio Scope, Carl Zeiss, Oberkochen, Németország), különböző nagyításokban vizsgáltunk meg. A Gram-festés elvégzése azért fontos, mert a potenciális probiotikus tulajdonságokkal bíró tejsavbaktérium törzsek a Gram-pozitív mikrobák közé tartoznak.

3.3.3. Kataláz-próba

Vannak kataláz enzimet termelő mikroorganizmusok, amelyek a mérgező hatású hidrogén-peroxidot vízre és oxigénre képesek bontani ($2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk izolátumaink kataláz-termeléséről, a tárgylemezre egy kacsnyit tettünk az egy telepre szélesztett friss tenyészetekből, és ezekre 3%-os H_2O_2 -t cseppentettünk. Pozitív esetben a telepek elkezdtek jól láthatóan pezsegni. Pozitív kontrollnak *S. aureus* ATCC 49775 törzset használtunk, amely erős pezsgéssel jelezte a kataláz működését. A kataláz-pozitív törzsek biztosan nem alkalmas probiotikumnak.

3.3.4. Hemolízis-vizsgálat

A hemolízis-vizsgálatok során a frissen felélesztett törzsekből egy-egy telepet vittünk tovább Columbia véres agarra (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország). 37 °C-on végzett 24 órás anaerob inkubáció után értékeltük az eredményeket. Pozitív kontrollnak ebben az esetben is *S. aureus*-t használtunk, amely 5% juhvéres táptalajon β -hemolízist mutat.

3.4. Klonalitásvizsgálat

A baktériumtörzsekből Chelex 100 Resin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) felhasználásával bakteriális DNS-t izoláltunk, a gyártó által megadott protokoll alapján. A polimeráz-lánreakcióhoz 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe összemértük a reakcióelegyet, amely tartalmazta a Red Taq 2 mM MgCl_2 Master Mixet (VWR), az általunk választott, 1254 nevű primert (Bio-Science, Budapest, Magyarország), a molekuláris biológiai tisztaságú AccuGENE vizet (Lonza, Basel, Svájc) és a mintát (baktériumtörzsek DNS templátja). A minták vizsgálatát RAPD-PCR módszerrel végeztük, Mastercycler PCR (Eppendorf, Hamburg, Németország) berendezés RAPD_03 programjával, melynek paraméterei a **2. táblázat**ban láthatók.

2. táblázat. A RAPD-PCR módszer paraméterei

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő
1.	95	2 min
2.	94	20 sec
3.	38	20 sec
4.	72	1 min
5.	72	5 min
6.	10	∞

A 2. és a 4. lépés közötti folyamat 40 alkalommal játszódott le. A program lefutását követően, a felszorzott DNS-molekulákat gélelektroforézissel tettük láthatóvá és értékelhetővé. A gélelektroforézishez 1%-os agarózgél készítettünk. Bemértünk 0,6 g agarózt (VWR) és 60 ml 1×TBE TRIS-bórecetsav-oldatban feloldottuk. Az oldatot a teljes elegyedésig forraltuk. Kézzel melegre hűtöttük és hozzáadtunk 6 μl DNS ECO Safe festékoldatot (Pacific Image Electronics, Torrance, CA, USA). Közben mágneses keverőn kevertettük, majd gélt öntöttünk. A visszahűlt és festékkel ellátott gélt a tálcába öntöttük. Megszilárdulás után a tálcát behelyeztük az elektroforézis tankba, amelyet előzőleg feltöltöttünk gélelektroforézis pufferrel (1×TBE-oldat), majd eltávolítottuk a gélfésűt. Az egyes zsebekbe vittük fel a RAPD-PCR reakciótermékeket.

3.5. Autoaggregáció vizsgálata

Az alkalmazott vizsgálati módszer DEL RE és mtsai [8] kutatásain alapult, kisebb módosításokkal. A saját izolátumokat és a kontroll törzseket 37 °C-on, 18 óráig, anaerob körülmények között inkubáltuk, 6,2 pH-értékű MRS levesben. Ezután a mintákat centrifugáltuk (Eppendorf Centrifuge 5804 R) 2426 × g-n, 6 percig.

A felülúszót leöntöttük, 1×PBS-oldatból 50 ml-t mértünk a baktériumpelletekre, majd vortexeltük őket (10 sec). Ismét centrifugálás, a felülúszó leöntése és a pellet visszavétele következett 1×PBS-oldatba. Vortexelés után szűkített (semi-micro) küvetákba (Greiner Bio-One Hungary) mértünk 900 µl 1×PBS-t és 100 µl sejtuszpenziót. Az optikai denzitást 600 nm-es hullámhosszon mértük, BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA), majd az OD₆₀₀ értékeket standardizáltuk, 0,2-re állítottuk minden egyes mintánál, hogy a mérési eredmények összehasonlíthatóak legyenek. A beállított értékeket OD₆₀₀ méréssel visszaellenőriztük. Megfelelő értékek esetén 4–4 ml baktériumsuszpenziót adagoltunk ki steril Wassermann-csövekbe, melyeket mintánként A, B és C jellel láttunk el annak érdekében, hogy a három technikai ismétlés biztosítva legyen. Az így elkészített mintákat Wassermann-csövekben, szobahőmérsékleten, aerob módon inkubáltuk a vizsgálat ideje alatt. Az optikai denzitás méréseket a 0., az 5. és a 24. órában végeztük. Az egyes mérési időpontokban 200–200 µl-t vettünk ki a baktériumsuszpenzió felső részéből széles végű pipettaheggyel (Axygen, Union City, CA, USA), majd 800 µl 1×PBS-oldattal hígítottuk, szűkített küvetában. Mindhárom mérési időpontban mindegyik betűjellel ellátott minta OD₆₀₀ értékét háromszor mértük, majd ezekből számoltunk aggregációs százalékot, a García-Cayuela és mtsai [9] által megadott képlet alapján:

$$[1 - (A_{\text{mérési időpont}} / A_0) \times 100],$$

ahol: $A_{\text{mérési időpont}}$: a sejtuszpenzió abszorbancia-értéke az adott mérési időpontban (5 h, 24 h); A_0 : a sejtuszpenzió abszorbancia-értéke 0 h időpontban.

Az autoaggregáció értékelésére jelenleg nincs egységesen kialakított rendszer. Del Re és mtsai [8] vizsgálataik során a >80% aggregációs értékkel rendelkező törzseket jól aggregálódó izolátumoknak minősítették, míg a <10% értéket mutató törzseket nem aggregálódónak tekintették.

3.6. Sav- és epesav-tűrés vizsgálata

3.6.1. A vizsgálathoz szükséges savas és epés táptalajok

A savtűrés vizsgálatához az MRS táptalajt (VWR) előírás szerint előkészítettük, majd 121 °C-on, 15 percig, autoklávban sterilizáltuk. Ezt követően, aszeptikus körülmények között, 1 M HCl-oldattal a következő értékekre állítottuk be a pH-t: 6,0; 5,5; 5,0; 4,0; 3,0. A 45 °C-ra visszahűtött steril táptalajokkal négyzet alakú Petri-csészékbe (Greiner Bio-One Hungary) lemezeket öntöttünk. A 6,0-os pH-értékű MRS táptalaj töltötte be a kezelés nélküli tápközeg szerepét.

Az epesavtűrés teszteléséhez az MRS táptalajt (VWR) a gyártó utasításai alapján készítettük elő. A sterilizálás (121 °C-on, 15 perc) után 45 °C-ra visszahűtött alap agarokhoz a sertésepet (Sigma Aldrich) 0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrővel (Thermo Fisher Scientific) sterilre szűrve adagoltuk. A kiegészítést úgy hajtottuk végre, hogy a táptalajban az epe végleges koncentrációja 0%, 0,1%; 0,2% és 0,5% legyen. Az epét nem tartalmazó MRS agar töltötte be a negatív kontroll szerepét.

3.6.2. Törzsesztés és optikai denzitás (OD) mérés

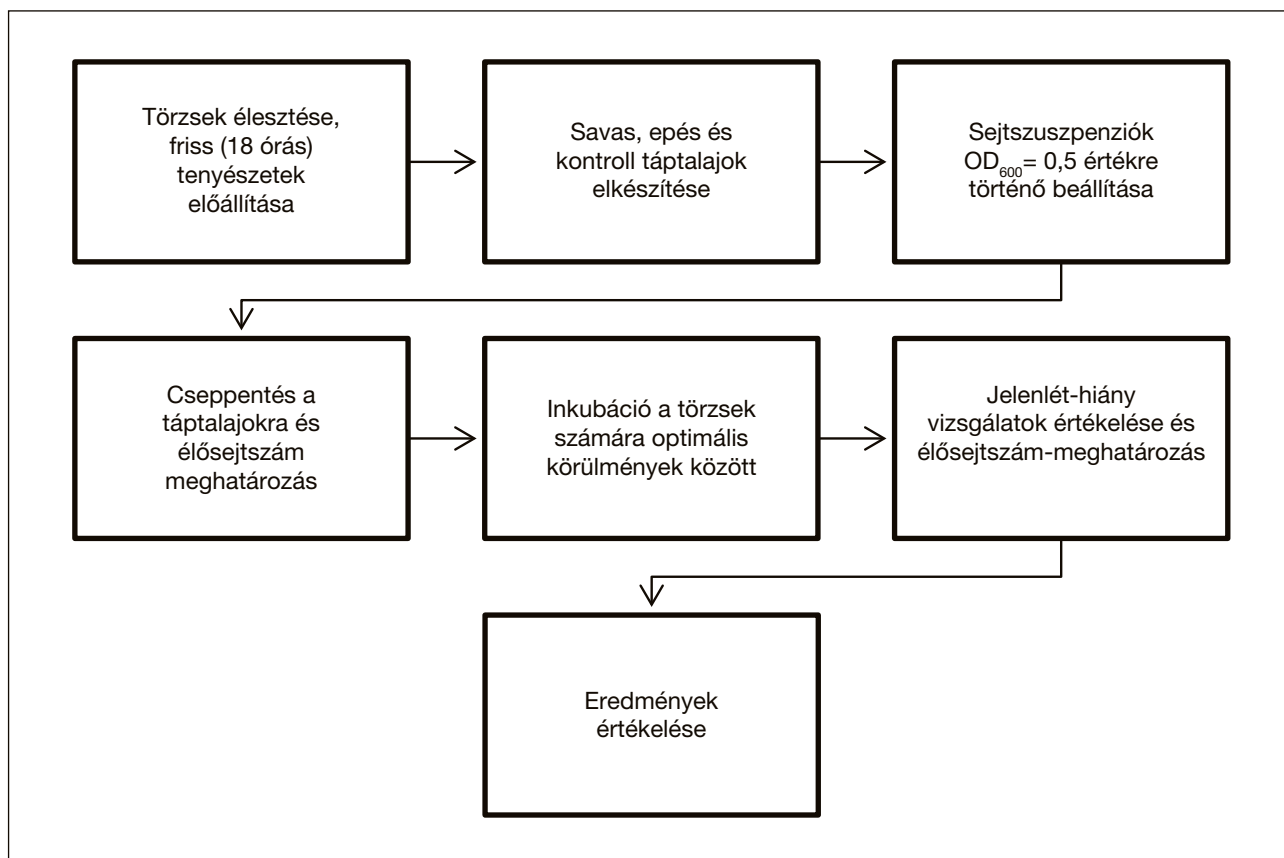
A baktériumtörzseket 6,2-es pH-értékű MRS levesben élesztettük fel, 37 °C-os, 18 órás, anaerob inkubáció eredményeként. A felszaporodott tenyészetek a Falcon cső alján több-kevesebb pelletet képeztek, mindezt értékeltük. A tenyészeteket centrifugáltuk (2426 × g, 6 perc, szobahőmérséklet) (Eppendorf Centrifuge 5804 R). A felülúszót leöntöttük és 1×PBS-oldatba vettük vissza a mintákat. Rövid (10 sec) vortexelés után újra centrifugálás és a felülúszó ismételt leöntése következett. Az 1×PBS oldatba való visszavétel után 10 sec vortexelés következett, majd a szuszpenzió tízszeres hígításának optikai denzitás értékét mértük meg BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific), 600 nm-en. A mérést követően egységesen 0,5-es OD₆₀₀ értékű szuszpenziókat készítettünk. A pontosság érdekében visszamértük a beállított sejtűrűségű szuszpenziók OD₆₀₀ értékeit.

3.6.3. Jelenlét-hiány vizsgálat

Az OD₆₀₀ = 0,5 értékű sejtuszpenziókból 18 (9 technikai × 2 biológiai ismétlés) × 10 µl-t cseppentettünk az eltérő pH-értékű és epesav-tartalmú táptalajok felületére, majd a 3.2.7. alfejezetben ismertetettek szerint 37°C-on, 48 óráig inkubáltuk a lemezeket.

3.6.4. Epesav- és sósavkezelés folyamata

A vizsgált baktériumtörzseket a táptalajhoz hozzáadott ágensek alapján epesav- és sósav-kezelésnek vetettük alá. Negatív kontrollként epét és sósavat sem tartalmazó, 6,0-os pH-értékű MRS táptalajok szolgáltak. A vizsgálatok menetét az **1. ábra** szemlélteti.



1. ábra. Epesav- és sósavkezelés folyamatábrája

3.6.5. Leoltás és élősejtszám-meghatározás

A saját izolátumok és a kontroll baktériumtörzsek tenyészeiből is decimális hígítási sort készítettünk, majd az egyes hígítási tagokból 100–100 µl-t szélesztettünk el 6,0-os pH-értékű MRS agarlemezek felületén. Az így elkészített lemezeket 37 °C-on, 72 óráig, anaerob körülmények között inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után telepszámlálást végeztünk.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok

A klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok célja az volt, hogy a Gram-negatív, a kataláz-pozitív és a hemolizáló törzseket kiszelektáljuk. E módszerek alkalmazásával a 217 db izolátumból ki tudtunk szűrni olyanokat, amelyek nem feleltek meg a probiotikumok kritériumainak. A teljesség igénye nélkül, a **3. táblázat**ban látható a klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok eredményei alapján megfelelő jellemzőkkel rendelkező néhány törzs, melyeket a későbbi vizsgálatokba (aggregáció, savtűrés és epesavtűrés vizsgálata) is bevontunk.

3. táblázat. Törzsek főbb jellemzői, klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok eredményei alapján

Törzs	Telepmorfológia*	Gram-festés	Kataláz-próba	Hemolízis-vizsgálat
E10	Apró, fehér, krémes felületű, szabálytalan telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E15	Nagy, fehér, hópehelyszerű telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E66	Nagy, fehér, csipkés szélű, szabálytalan, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E92	Nagy, fehér, szabályos, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E173	Nagy, fehér, csipkés szélű, szabálytalan, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E198	Nagy, fehér, vajszerű, szabálytalan, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E216	Apró, fehér, krémes felületű, vajszerű, szabálytalan telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
LA-5	Nagy, fehér, szabályos, krémes felületű telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív

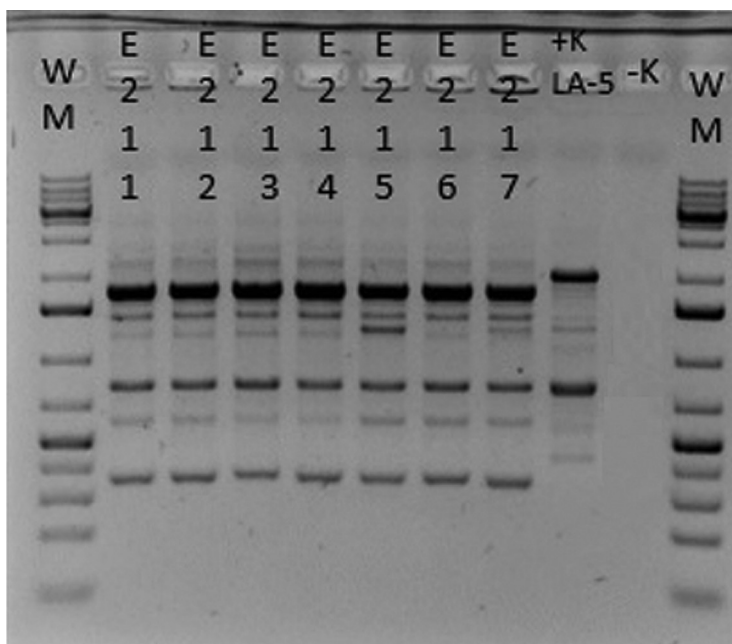
*A telepmorfológia vizsgálata 6,2-es pH-értékre beállított MRS agaron kifejlődött törzsekkel történt.

A 217 db izolátum közül 25 db kataláz-pozitív és 29 db Gram-negatív törzset azonosítottunk. Ezeket a klonalitásvizsgálat után a klónosztályokból és a klónosztályba nem illő egyedi törzsek közül is kizártuk. Egyetlen törzs sem hemolizált véresagaron, így jöllehet ez a vizsgálat nem segített szűkíteni a nagy mintaszámot, a probiotikus törzsek biztonságosságának megítéléséhez feltétlenül szükséges volt elvégezni.

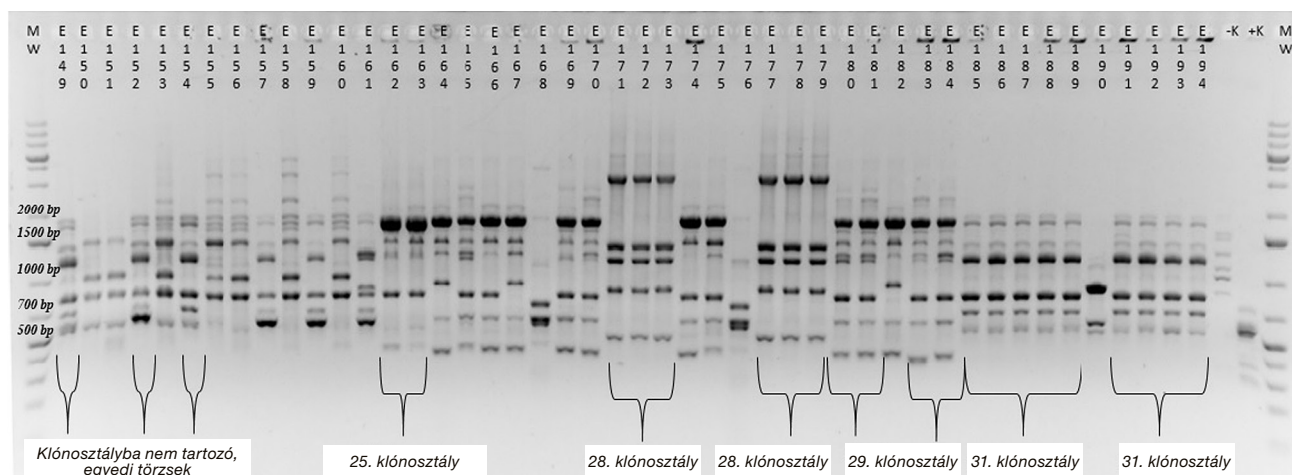
Sedlačková és mtsai [10] a mi munkacsoportunk gyakorlata szerint szintén csak a Gram-pozitív, pálcika alakú és kataláz-negatív izolátumokat vonták be további *in vitro* vizsgálataikba. Tanulmányukban összesen 59 db Gram-pozitív és kataláz-negatív törzset különítettek el, melyek közül 7 db-ot nyerstejből, 12 db-ot pedig nyers tehéntejből készített sajtból izoláltak. A telep morfológia hasonlóan bizonyult a *L. acidophilus* LA-5 alkotta telepekéhez.

4.2. Klonalitásvizsgálat

A RAPD-PCR vizsgálatok párhuzamosan zajlottak a klasszikus mikrobiológiai vizsgálatokkal. Az egyedi RAPD mintázatok alapján a 217 db törzset 34 klónosztályba soroltuk, ezek közül a 34. klónosztály gélfotója látható a **2. ábrán**; a **3. ábrán** pedig több klónosztályt és egyedi törzseket is bemutatunk.



2. ábra. A 34. klónosztály tagjainak klonalitásvizsgálata
(minták: E211–E217, pozitív kontroll: *Lactobacillus acidophilus* LA-5, negatív kontroll: desztillált víz, molekuláris marker: WM; Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder)



3. ábra. Több klónosztály és egyedi törzsek gélfotója
(minták: E149–E194, pozitív kontroll: E31, negatív kontroll: desztillált víz, molekuláris marker: WM; Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder)

A vizsgálatok során 57 db egyedi törzset találtunk, amelyek nem voltak klónosztályokba sorolhatók, így az izolátumok köre 91 db-ra szűkült a klonalitásvizsgálatok eredményei alapján. A klasszikus mikrobiológiai vizsgálati módszerekkel kizártuk a Gram-negatív és a kataláz-pozitív izolátumokat, így összesen 34 db klónosztály és 37 db klónosztályba nem sorolható, egyedi törzs maradt, összesen 71 db izolátumra szűkítve a kiindulási elemszámot. Ez nagyban segítette a preszelekciót, hiszen a törzseknek csak kevesebb mint a harmada (32,7%) maradt fenn a szűrőn. Mivel a RAPD-PCR vizsgálatok eredményei erősen függenek a laboratóriumi körülményektől, a módszer precíz kivitelezése kiemelt fontosságú az eredmények reprodukálhatósága szempontjából [11]. Az alkalmazott 1254-es primer lehetővé tette a RAPD-PCR vizsgálatok során a hasonló mintázatú izolátumok összehasonlítását. Ez egybecseng Torriani és mtsai [12] állításával, miszerint az 1254-es primer kiválóan alkalmazható *L. delbrueckii* törzsek közötti polimorfizmusok felderítésére.

4.3. Autoaggregáció vizsgálata

A további vizsgálatok során a klónosztályba nem sorolható egyedi törzsekkel (37 db) nem foglalkoztunk, ezért az aggregáció-vizsgálathoz a 34 db klónosztály mindegyikéből egy-egy baktériumtörzset kiválasztva folytattuk az *in vitro* tesztsorozatot. Célunk az volt, hogy jól aggregálódó (5 órás inkubáció után: >70%, ill. 24 órás inkubációt követően: >80%) és nem aggregálódó (<25%) törzseket találjunk, melyeket a további sav- és epesav-tűrési kísérletekbe be tudunk vonni. Azt feltételeztük, hogy a jól aggregálódó törzsek nagyobb valószínűséggel lehetnek probiotikusak, így esetlegesen a sav- és epesav-kezelést is jobban tolerálják.

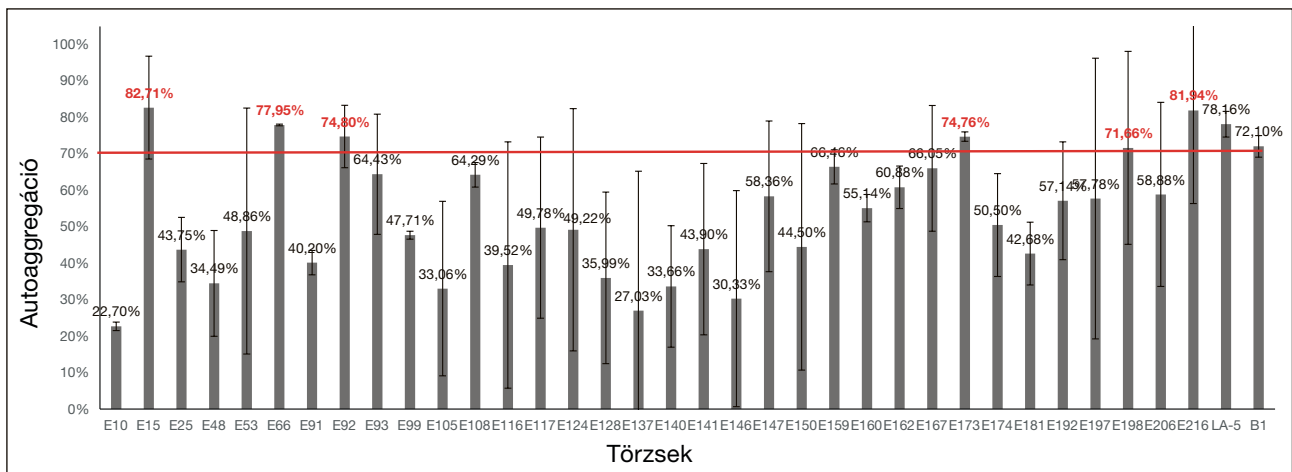
Az aggregációs vizsgálat méréseit 0, 5 és 24 óra elteltével végeztük. Az 5. óra utáni vizsgálat mellett Kos és mtsainak [13] eredményei alapján döntöttünk, akik azt tapasztalták, hogy már 5 óra elteltével erősen autoaggregálódott a *L. acidophilus* M92. A szerzők MRS-levesben tenyésztették tesztörzsüket, mert így megmaradtak az aggregációt lehetővé tevő egyes sejtfelszíni fehérjék [13].

A 34 db törzset két biológiai ismétléssel vizsgáltuk. Találtunk a kezelés 5. órájában 70% feletti aggregációs értéket mutató izolátumokat, szám szerint 6 db-ot (E15, E66, E92, E173, E198, E216). A pozitív kontrollként alkalmazott *L. acidophilus* LA-5 és ATCC 4356 törzsek szintén jól aggregálódtak (rendre 78,2%, ill. 72,1%) (4. ábra).

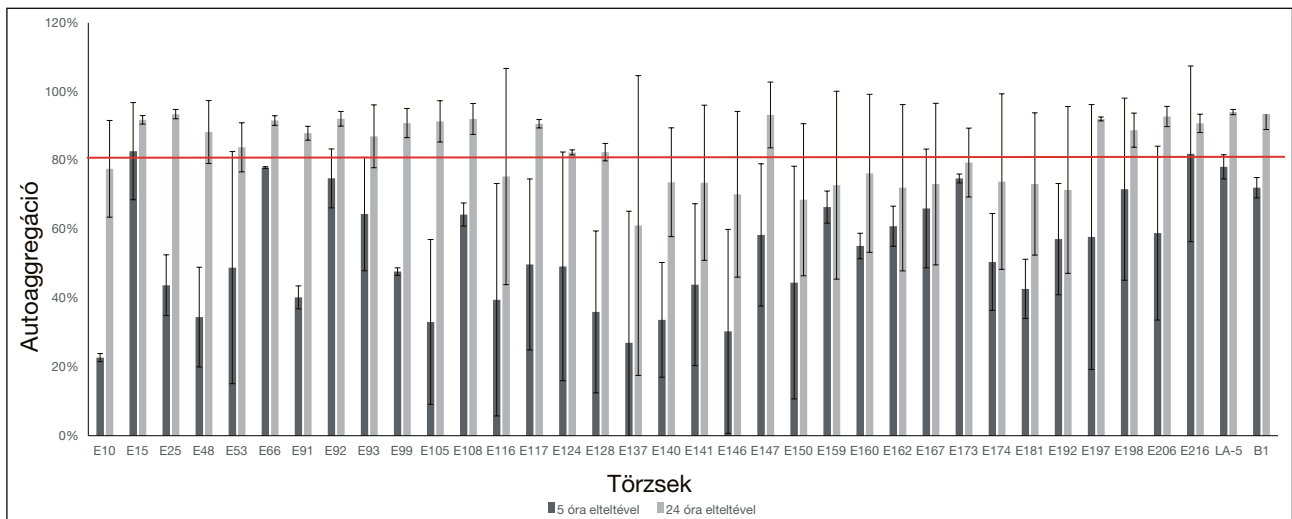
Említést érdemel, hogy a jól aggregálódó törzsek szabad szemmel is tisztán látható pelletet képeztek a Wassermann-csövek alján, a szuszpenzió felső része pedig kitisztult. Ugyanerre a megállapításra jutottak García-Cayuela és mtsai [9], akik 126 db *L. plantarum* törzset izoláltak nyerstejből készített sajtminiókból, és MRS levesben előzetesen szabad szemmel értékelték a törzsek aggregációs (szedimentációs) képességét, melynek alapján hópehelyszerű aggregátumok megjelenéséről számoltak be. Az autoaggregációs vizsgálatba 14 db törzset vontak be, az optikai denzitás méréseket 2, 6, 20 és 24 óra után végezték. A legnagyobb autoaggregációs értékeket (28,5–59,5%) 1 nap elteltével észlelték. Az értékek az idő előrehaladtával növekedtek, azonban törzsenként eltérő módon. Az általuk közölt aggregációs százalékokhoz képest mi nagyobb értékeket (>75%) mértünk 5 órás inkubálás után.

Xu és mtsai [14] probiotikus és patogén törzsek önaggregációs képességét tesztelték. A 2 órás inkubáció után kapott eredmények arról tanúskodtak, hogy három törzs (*Bifidobacterium longum* B6, *L. rhamnosus* GG és *L. brevis* KACC 10553) teljesített jól, 40-50% közötti aggregációs százalékokkal. Tuo és mtsai [15] 22 db *Lactobacillus* törzs aggregációs képességét vizsgálták 5 órás, 37 °C-os inkubációt követően, és 24,2-41,4%-os értékeket kaptak. Pozitív kontrollként *L. rhamnosus* GG-t használtak, amely 41,4%-os aggregációs értékével a legjobban teljesítő törzs volt.

Az erdélyi és a kontroll törzsek autoaggregációs vizsgálatának összesített (5 és 24 órás inkubálás utáni) eredményeit a 5. ábra szemlélteti. Megállapítottuk, hogy 24 órás inkubálás után minden egyes törzs nagyobb értéket ért el az 5 órás eredményéhez képest. A kontrollként használt probiotikus *L. acidophilus* LA-5 és a jól aggregálódó fenotípussal rendelkező *L. acidophilus* ATCC 4356, szakirodalmi adatokkal egyezően, 24 óra után is kiválóan teljesített (94,1% ill. 93,5%). A 34 db klónosztályba tartozó törzsek közül 19 db 80% felett aggregálódott. A beállított módszerünk tehát alkalmasnak bizonyult a jól és a nem jól aggregálódó izolátumok elkülönítésére. Prabhurajeshwar és Chandrakanth [16] joghurtokból izolált laktobacillus törzsek 24 órás autoaggregációs vizsgálata során a mi eredményeinknél kisebb értékeket (39,4-52,0%) mértek.



4. ábra. A saját izolátumok és a kontroll törzsek autoaggregáció-vizsgálatának eredménye, 5 órás inkubálás után [Az adatok 2 biológiai × 3 technikai ismétlés átlag ± szórás értékeit jelölik; a vízszintes piros vonal a jól aggregálódó (>70%) törzsek kiszűrését teszi lehetővé]



5. ábra. A saját izolátumok és a kontroll törzsek autoaggregáció-vizsgálatának eredménye, 5 órás és 24 órás inkubálás után [Az adatok 2 biológiai × 3 technikai ismétlés átlagértékeit jelölik; a vízszintes piros vonal a jól aggregálódó (>80%) törzsek kiszűrését teszi lehetővé]

4.4. Sav- és epesav-tűrés vizsgálata

A sav- és epesav-tűrés vizsgálatához az 5 óra inkubáció után jól aggregálódó 6 db törzset (E15, E66, E92, E173, E198, E216) használtuk, pozitív kontrollként pedig a *L. acidophilus* LA-5 szolgált, mely utóbbi törzs probiotikus, megfelelőek az aggregációs mutatói és korábban hasonló vizsgálatokban már jól szerepelt [17]. Ezen kívül, a saját izolátumok közül az E10-es, kevésbé jó aggregációs képességgel (22,7%) rendelkező törzset is bevontunk vizsgálatainkba, hogy megállapíthassuk, van-e összefüggés a jó aggregálódás, ill. a sav- és epesav-tűrés között.

Az eredményeket 48 órás inkubálást követően olvastuk le. A táptalaj felületére inokulált 10 µL térfogatú baktériumszuszpenzió-cseppek helyén telepek növekedését vagy a szaporodás hiányát észleltük. Azt bíráltuk el szabad szemmel, hogy a törzsek képesek voltak-e a savval, ill. epével kiegészített és a kontroll táptalajok felületén jól látható mértékben elszaporodni (jelenlét-hiány vizsgálat). Arra kerestük a választ, hogy egyrészt mekkora sav- és epesav-koncentrációt képesek tolerálni az egyes törzsek, másrészt van-e összefüggés az aggregálódó képesség és a sav-, ill. epesav-tűrés között. Eredményeinket a 4. és az 5. táblázatban szemléltetjük.

4. táblázat. Savval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálat eredményei*

Törzs	MRS agar pH-értéke				
	6,0	5,5	5,0	4,0	3,0
E10 izolátum	+++	++	++	++	0
E15 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E66 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E92 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E173 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E198 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E216 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	+++	+++	+++	++	0

* n = 18 (9 párhuzamos × 2 ismétlés).

0: nincs szaporodás, +: gyenge szaporodás, ++: közepes mértékű szaporodás, +++: jól látható, erőteljes szaporodás.

5. táblázat. Epesavval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálat eredményei*

Törzs	MRS agar			
	0%	0,1%	0,2%	0,5%
	sertésepevével kiegészítve			
E10 izolátum	+++	+	0	0
E15 izolátum	+++	+++	+++	+++
E66 izolátum	+++	+++	+++	+++
E92 izolátum	+++	+++	+++	+++
E173 izolátum	+++	+++	+++	+++
E198 izolátum	+++	+++	+++	+++
E216 izolátum	+++	++	++	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	+++	+++	++	+

* n = 18 (9 párhuzamos × 2 ismétlés).

0: nincs szaporodás, +: gyenge szaporodás, ++: közepes mértékű szaporodás, +++: jól látható, erőteljes szaporodás.

Látható, hogy a *L. acidophilus* LA-5 a 6,0-os, 5,5-es, 5,0-ös és 4,0-es pH-értékű MRS táptalajokon és a 0,1%, valamint 0,2% epesav-tartalmú MRS táptalajokon megfelelően szaporodott, tehát jó sav- és közepes epesav-tűrőnek bizonyult. A 0,5% epét tartalmazó táptalajon már gyenge növekedést mutatott a kontrolltörzs. A legsavasabb (pH = 3,0) MRS tápközegen se a kontroll, se a vizsgált erdélyi törzsek nem képeztek telepeket, előszelekczióra tehát a 4,0-es és a 3,0-as pH-értékű szilárd tápközégek bizonyultak megfelelőnek.

Pan és mtsai [18] csecsemők székletéből izolált *L. acidophilus* NIT törzset tartottak glicin-sósav pufferben (pH: 2,0; 3,0; 4,0) 1, 2, ill. 3 órán keresztül. A kezelés után a baktériumpelletet reszuszpendálták és a megfelelő hígítási tagokból MRS agarlemezek felületén 20 µL szuszpenziót szélesztettek el. Azt tapasztalták, hogy 3 óra kezelés után a *L. acidophilus*-sejteknek mindössze 10%-a maradt életben. Jóllehet a mi vizsgálatunk nem ugyanebben a kísérleti elrendezésben zajlott, az eredmények magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy a *L. acidophilus* a 3,0-as pH-értékű táptalajunkon miért nem képzett telepeket. Vargas és mtsai [19] 3% savófehérje-izolátum adagolásával érték el, hogy a *Streptococcus thermophilus* ST-M5 és a *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB-12 maximális számban élje túl a savkezelést. Valente és mtsai [20] célja az volt, hogy felmérjék tradicionális brazil sajtokból izolált tejsavbaktérium-törzsek (*L. plantarum* B7 és *L. rhamnosus* D1) *in vitro* és *in vivo* probiotikus potenciálját. Mindkét törzs közepes mértékben tolerálta a 0,3% ökörepét 12 óra inkubáció elteltével. A mesterséges emésztőnedvekkel (pH: 2,0 és 3 g/L pepszin) szemben a B7 és a D1 izolátum is ellenállóknak bizonyult [20].

Az epesavas sók fiziológiás koncentrációja 0,3% és 0,5% között változik az emésztőtraktusban [21], ezért választottuk legnagyobb epekoncentrációnak a 0,5%-ot. A nevezett szerző szintén hozzáadott táptalajához 0,3, 0,5, 1,0, ill. 2,0% epesavas sót, majd a törzskultúra 10 µL-ét juttatta a tápközeg felületére. Ugyan nem *Lactobacillus*, hanem nyers tehén- és kecsketejből, valamint tradicionális kefirből izolált *Lactococcus* törzsekkel dolgozott, vizsgálati rendszere mégis hasonlított a miénkhez. A *Lactococcus lactis* törzsek nem tolerálták az alkalmazott epesav-koncentrációk egyikét sem.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kiválasztott izolátumok többnyire jól tolerálták a 0,5%-os epesav-jelenlétet, ami viszont nem volt igaz az E10 jelű törzsrre, amely még a legkisebb (0,1%) epekoncentráció mellett is csak alig szaporodott. Az E10 izolátum gyenge aggregációs képessége jó savtűréssel és gyenge epesavtűréssel társult. A *L. acidophilus* LA-5 kontrolltörzs gyengén ugyan, de még a 0,5% epét tartalmazó táptalajon is szaporodott. Az alkalmazott eljárás során a törzsek nemcsak pár óráig voltak kitéve a pusztító hatású összetevőknek, hanem 48 órán keresztül érintkeztek azokkal. Említést érdemel, hogy a destruktív ágensek negatív hatásait a tápközeghez adagolt savófehérjeporral lehet mérsékelni [19]. A savval és epesavval kiegészített szilárd táptalaj felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálat viszonylag gyors módszernek tekinthető, mert a szükséges táptalajok könnyen elkészíthetők, a táptalaj felületére történő cseppentés gyorsan kivitelezhető, így az eredmények rövid időn belül rendelkezésre állnak.

5. Következtetések

A probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas *in vitro* tesztrendszer néhány elemének kidolgozására irányuló törekvésünk sikeresnek bizonyult. Az itt bemutatott lépéseket nem feltétlenül szükséges tovább finomítani, mert jelenleg is képesek nagy elemszámú izolátumhalmazok előszelektálására. Noha az 1254-es primer jó választásnak bizonyult, a későbbi klonalitásvizsgálatok során érdemes lesz más primerekkel is elvégezni a RAPD-PCR reakciót. Az aggregációs vizsgálatok, valamint a sav- és epesav-tűrés tesztek eredményei között pozitív összefüggés mutatkozott, mindazonáltal az izolált törzsek probiotikus tulajdonságainak tényszerű megállapításához további *in vitro* vizsgálatokra és *in vivo* állatkísérletekre van szükség. A jelenleginél is nagyobb szelekció érdekében érdemesnek tűnik a tesztrendszert egyéb elemekkel kiegészíteni, pl. antibiotikumrezisztencia- vagy antimikrobiális aktivitás-vizsgálatokkal.

6. Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 azonosítószámú, „Innovatív tudományos műhelyek a hazai agrár felsőoktatásban” című projekt és az EFOP-3.6.1-16-2016-00024 azonosítószámú, „Intelligens szakosodást szolgáló fejlesztések az Állatorvostudományi Egyetem és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Karának együttműködésében” című projekt anyagi támogatását.

7. Irodalom

- [1] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11 pp. 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [2] Fijan, S., Frauwallner, A., Varga, L., Langerholc, T., Rogelj, I., Lorber, M., Lewis, P., Povalej-Bržan, P. (2019): Health professionals' knowledge of probiotics: an international survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 pp. 3128. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173128>
- [3] Szakály, S. (2004): Probiotikumok és Humánegészség. *Vissza a Természethez! Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, Mosonmagyaróvár.*
- [4] European Parliament, Council of the European Union (2003): Regulation (EC) no. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union L268 pp. 29-43.*
- [5] Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Folligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015): Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* 6 pp. 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
- [6] Williams, C.F., Walton, G.E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G.R. (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual Review of Food Science and Technology* 6 pp. 329-350. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015429>
- [7] Antal, O., Némethné Szerdahelyi, E., Takács, K. (2020): *In vitro* humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén (Application of *in vitro* human digestion models in the field of nutrition science). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 66 pp. 3141-3157.
- [8] Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000): Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31 pp. 438-442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
- [9] García-Cayueta, T., Korany, A.M., Bustos, I., de Cadiñanos, L.P.G., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C. (2014): Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International* 57 pp. 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>

- [10] Sedláčková, P., Horáčková, Š., Shi, T., Kosová, M., Plocková, M. (2015): Two different methods for screening of bile salt hydrolase activity in *Lactobacillus* strains. *Czech Journal of Food Sciences* 33 pp. 13-18. <https://doi.org/10.17221/299/2014-CJFS>
- [11] Pereszlenyi, K. (2019): Tejsavbaktériumok genetikai azonosságának vizsgálata molekuláris markerekkel. Szakdolgozat. Széchenyi István Egyetem, Mosonmagyaróvár.
- [12] Torriani, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F. (1999): Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 pp. 4351-4356. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4351-4356.1999>
- [13] Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003): Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94 pp. 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- [14] Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., Ahn, J. (2009): Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology* 49 pp. 434-442. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x>
- [15] Tuo, Y.F., Yu, H.L., Ai, L.Z., Wu, Z.J., Guo, B.H., Chen, W. (2013): Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science* 96 pp. 4252-4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
- [16] Prabhurajeshwar, C., Chandrakanth, K. (2019): Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in vitro by probiotic lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental* 23 pp. 97-115. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.10.001>
- [17] Süle, J., Varga, L., Varga, K., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) Probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas kísérleti rendszer egyes elemeinek kidolgozása (Developing basic elements of an experimental system for selection of probiotic bacterial strains). *Magyar Állatorvosok Lapja* 144 (közlésre benyújtva).
- [18] Pan, X.D., Chen, F.Q., Wu, T.X., Tang, H.G., Zhao, Z.Y. (2009): The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20 pp. 598-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.019>
- [19] Vargas, L.A., Olson, D.W., Aryana, K.J. (2015): Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12. *Journal of Dairy Science* 98 pp. 2215-2221. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8869>
- [20] Valente, G.L.C., Acurcio, L.B., Freitas, L.P.V., Nicoli, J.R., Silva, A.M., Souza, M.R., Penna, C.F.A.M. (2019): Short communication: In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese. *Journal of Dairy Science* 102 pp. 5957-5961. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15938>
- [21] Yerlikaya, O. (2019): Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science* 102 124-134. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14983>

Application of an in vitro test system for the selection of probiotic bacterial strains

Keywords: probiotic, *Lactobacillus*, bile acid, gastric acid, RAPD-PCR, autoaggregation

1. SUMMARY

The aim of our studies was to evaluate *in vitro* methods for the simple and efficient selection of putative probiotic bacterial strains. Of the possible methods, the following were tested: culturing on selective media, Gram staining, catalase assay, hemolytic, clonality and aggregation ability, gastric acid tolerance and bile acid tolerance. A total of 217 bacterial strains isolated from raw sheep's milk, curdled milk and sheep's cheese samples produced in Transylvania were included in our experiments. Isolates with hemolytic activity, as well as those exhibiting Gram-negative or catalase-positive phenotypes not characteristic of probiotics were excluded from our studies. Based on the results of RAPD-PCR studies suitable for the detection of individual-level polymorphisms, a total of 34 clone classes and 57 strains with unique RAPD patterns were identified. From each of the 34 clone classes thus narrowed, one strain was selected and tested for its aggregation ability, as well as its gastric acid and bile acid tolerance. High aggregation values above 70%, typical of probiotic strains, were measured in the case of a total of six isolates. In the course of the presence-absence studies conducted on the surface of solid media supplemented with acid or bile acid, it was possible to select several strains specifically tolerant to acid or bile acid. Based on our results, isolates to be included in further tests, e.g., in antibiotic resistance and antimicrobial activity assays, were selected.

¹ Hungarian Dairy Research Institute Ltd.

² Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Food Science

³ Széchenyi István University, Wittmann Antal Multidisciplinary Doctoral School in Plant, Animal, and Food Sciences

Judit SÜLE
László VARGA
Zoltán HATVAN
Zoltán KERÉNYI

jsule@mtki.hu
varga.laszlo@sze.hu
hatvanzoltan@gmail.com
kerenyiz68@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7202-9748>
<https://orcid.org/0000-0001-7431-852X>
<https://orcid.org/0000-0002-3885-4904>
<https://orcid.org/0000-0001-8665-5216>

2. Introduction

Probiotics are living organisms that, when used in appropriate amounts, have a beneficial effect on the health of the host organism [1, 2]. They must meet a number of conditions in order to be allowed to display the probiotic designation. Among other things, they need to have an increased tolerance to various body fluids (gastric acid, bile acids, digestive enzymes) and they must stabilize the intestinal microbiota by binding to intestinal epithelial cells through their ability to adhere [3].

There is a growing worldwide demand for probiotic products that have a beneficial effect on health, both in terms of human consumption and the feeding of farm animals. The use of antibiotics for yield enhancement has been banned in the European Union since 2006 [4], and the focus has been even more on probiotics since that date.

Year after year, a large number of bacterial strains are isolated in order to exploit their beneficial effects on health. Complex and costly animal studies must be preceded by a selection system of in vitro experiments that allows the simple, rapid and cost-effective selection of strains, from hundreds or even thousands of isolates, that will hopefully prove probiotic in in vivo studies [5, 6, 7].

Based on the above, the aim of our work was to develop and evaluate in vitro measurement methods that can be used to quickly and efficiently investigate the classical microbiological characteristics, clonality, aggregation ability, as well as the resistance to gastric acid and bile acid of bacterial strains. We sought to answer the question whether the large number of isolates studied by us included clones and strains with potentially beneficial (even probiotic) properties that should be included in further in vitro studies. It was also examined whether the test system was working well or whether it was necessary to optimize the individual steps, as well as what acid and bile acid concentrations the different strains were able to tolerate, and whether there was any correlation between the results of the aggregation test and the acid and bile acid tolerance. Accordingly, of the in vitro tests, the results obtained by the following test methods are presented in our publication:

- Classical microbiological tests (culturing on selective media and determination of colony morphology, Gram staining and subsequent microscopic examination, catalase test, hemolysis test)
- Clonality assay by RAPD-PCR method
- Autoaggregation test
- Presence-absence studies conducted on the surface of solid media supplemented with acid or bile acid

3. Materials and methods

3.1. Isolation, culturing, preservation and storage of bacterial strains

Our studies were conducted with bacterial strains isolated from raw sheep's milk, curdled milk and sheep's cheese samples produced in Transylvania. The products had a natural microbiota and no commercially available starter cultures were used for their production. For the preparation of the cheeses, rennet was made by the shepherds from veal stomachs. The goal was to isolate highly efficient probiotic strains that would be later used in the development of probiotic products. Restoration and culturing of the 217 isolates and the control strains were performed under the conditions listed in **Table 1**.

Table 1. Restoration and culturing conditions of the isolated and control bacterial strains included in the experiments

Strain	Broth	Culture medium	Incubation conditions
Lactobacillus acidophilus ATCC 4356	MRS broth (pH = 6.2)	MRS agar (pH = 6.2)	37 °C, 72 hours, anaerobic
Lactobacillus acidophilus LA-5	MRS broth (pH = 6.2)	MRS agar (pH = 6.2)	37 °C, 72 hours, anaerobic
Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 49775	CASO broth	CASO agar	37 °C, 24 hours, aerobic
E1–E92 isolates	MRS broth (pH = 6.2)	MRS–CC agar*	37 °C, 72 hours, anaerobic
E93–E217 isolates	MRS broth (pH = 5.4)	MRS agar (pH = 5.4)	37 °C, 72 hours, anaerobic

* De Man–Rogosa–Sharpe agar supplemented with clindamycin and ciprofloxacin

Isolates were preserved and stored in glycerol stock solutions. A strain taken from the surface of MRS–CC agar or MRS pH 5.4 agar was washed into 3 ml of broth with an inoculating loop, and then it was incubated according to the needs of the strain. 300 µl of the grown culture was added to a cryo (freezer) tube, 900 µl of a 60% glycerol solution was added, it was vortexed and frozen in liquid nitrogen for ca. 30 seconds. Storage was conducted at -80 °C in an ultra-freezer.

3.2. Selective culture conditions, its media and their preparation

3.2.1. Physiological saline solution

For the preparation of the diluent used to prepare the decimal dilution series, 8.5 g of NaCl and 1 g of tryptone were weighed and dissolved in 1 L of distilled water. 9.3 ml was added to the test tubes, and they were sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes.

3.2.2. Phosphate buffer solution (PBS)

For one liter of distilled water, the following substances were weighed on an analytical balance: 80 g of sodium chloride, 2 g of potassium chloride, 14.4 g of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate and 2.4 g of potassium dihydrogen phosphate. Dissolution was aided by a magnetic stirrer and when the solution became particle-free, it was sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes. The solution thus prepared corresponds to PBS with a tenfold concentration, i.e., for further use it has to be diluted as follows: 100 ml of 10× PBS solution is added to 900 ml of distilled water. After proper mixing, the 1× PBS solution is ready for use.

3.2.3. De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar and broth (pH = 6.2)

Of commercially available MRS broth (VWR, Radnor, PA, USA) or MRS agar (VWR), the quantity recommended by the manufacturer was weighed to analytical accuracy and ten dissolved in distilled water, using a magnetic stirred until dissolved. The pH was adjusted to the desired value (6.2 ± 0.2) with 1 M HCl. Following this, the culture media were sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes.

3.2.4. MRS agar (pH = 5.4)

MRS agar (VWR) was prepared according to the manufacturer's instructions, its pH value was adjusted to 5.4 with 1 M HCl, and then it was sterilized in an autoclave under standard conditions (121 °C, 15 minutes).

3.2.5. MRS agar supplemented with clindamycin and ciprofloxacin (MRS–CC)

In addition to the basic MRS agar, MRS–CC agar also contained two antibiotic stock solutions that could not be sterilized in an autoclave. For the preparation of one of the stock solutions, 2.0 mg of clindamycin hydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 10 ml of distilled water, while for the other, 20.0 mg of ciprofloxacin hydrochloride (Sigma Aldrich) was dissolved in 10 ml of distilled water. The antibiotic stock solutions were then filtered through a 0.22 µm pore size membrane filter (Millipore, Burlington, MA, USA) into sterile screw-capped Erlenmeyer flasks. 0.1 ml of clindamycin and 1.0 ml of ciprofloxacin stock solutions were added to the MRS agar cooled to 45 °C under aseptic conditions, using sterile, disposable pipettes (Greiner Bio-One Hungary, Mosonmagyaróvár, Hungary). Thus, the final concentration of clindamycin in the basic MRS agar was 0.1 mg/l, while that of ciprofloxacin was 10.0 mg/l.

3.2.6. CASO agar

CASO agar (VWR) and CASO broth (VWR) were prepared according to the manufacturer's instructions. Sterilization was performed in an autoclave under standard conditions, at 121 °C for 15 minutes.

3.2.7. Anaerobic culturing

Anaerobic conditions in the course of our studies were ensured as follows: agar plates were incubated in an AnaeroPack Rectangular jar (Merck, Darmstadt, Germany), with the addition of GENbox anaerobic salt (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Information on the existence of anaerobic conditions was provided by the color change of the Microbiologic Aerotest indicator (Merck) from white to blue.

3.3. Classical microbiological tests

3.3.1. Examination of colony morphology

Macromorphological characteristics of the restored strains were recorded. Among other things, the size, color, surface properties (glossy, matte) of the colonies, as well as the design of the edges of the colonies (regular, irregular, jagged) were observed.

3.3.2. Gram staining

One drop of distilled water, in which a solitary colony was suspended, was added to a degreased slide. The dried smear was stained with crystal violet solution for 2 minutes, then it was treated with lugol solution for 1 minute. Following this, the sample was rinsed with distilled water, then treated with a decolorizing solution for half a minute, which extracted the dye from the Gram-negative cells but not the Gram-positive ones. After another rinsing with distilled water, contrast staining was carried out with safranin for 1 minute. This was followed by rinsing with distilled water, the smears were allowed to dry, and then they were examined under a light microscope (Axio Scope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at various magnifications. Performing Gram staining is important because lactic acid bacterial strains with potential probiotic properties are among Gram-positive microbes.

3.3.3. Catalase test

There are microorganisms that produce catalase enzymes that can break down toxic hydrogen peroxide into water and oxygen ($2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). In order to confirm the catalase production of our isolates, colonies of fresh cultures were placed on slides using an inoculation loop, and a drop of 3% H_2O_2 was added. In positive cases, colonies began to visibly bubble. *S. aureus* strain ATCC 49775 was used as a positive control, which indicated catalase activity with strong effervescence. Catalase-positive strains are not suitable as probiotics for sure.

3.3.4. Hemolysis test

In the course of our hemolysis studies, one colony of each freshly restored strain was transferred to Columbia blood agar (Biolab Zrt., Budapest, Hungary). Results were evaluated after 24 hours of anaerobic incubation at 37 °C. *S. aureus*, which exhibits β -hemolysis on 5% sheep blood culture medium, was again used as a positive control.

3.4. Clonality test

Bacterial DNA was isolated from the bacterial strains using Chelex 100 Resin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), according to the protocol provided by the manufacturer. For the polymerase chain reaction, the reaction mixture containing the Red Taq 2 mM MgCl_2 Master Mixet (VWR), the primer named 1254 chosen by us (Bio-Science, Budapest, Hungary), molecular biology grade AccuGENE water (Lonza, Basel, Switzerland) and the sample (DNA template of the bacterial strains) were measured into a 1.5 ml Eppendorf tube. The samples were analyzed by RAPD-PCR, using the RAPD_03 program of a Mastercycler PCR (Eppendorf, Hamburg, Germany) instrument, the parameters of which are shown in **Table 2**.

Table 2. Parameters of the RAPD-PCR method

Step	Temperature (°C)	Time
1.	95	2 min
2.	94	20 sec
3.	38	20 sec
4.	72	1 min
5.	72	5 min
6.	10	∞

Steps 2 through 4 were carried out 40 times. Following the completion of the program, the amplified DNA molecules were made visible and evaluated by gel electrophoresis. A 1% agarose gel was prepared for the gel electrophoresis. 0.6 g of agarose (VWR) was weighed and dissolved in 60 ml of 1×TBE TRIS-boroacetic acid solution. The solution was boiled until completely homogenized. It was cooled to lukewarm temperature and 6 μl of DNS ECO Safe dye solution (Pacific Image Electronics, Torrance, CA, USA) was added. Meanwhile, it was agitated on a magnetic stirrer, and then the gel was poured. The cooled gel with the dye was poured into the tray. After setting, the tray was placed in the electrophoresis tank, previously filled with gel electrophoresis buffer (1×TBE solution), then the gel comb was removed. The RAPD-PCR reaction products were then added to the individual pockets.

3.5. Investigation of autoaggregation

The test method used was based on the research of DEL RE et al. [8], with minor modifications. Our own isolates and control strains were incubated at 37 °C for 18 hours under anaerobic conditions in MRS broth at pH 6.2. The samples were then centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5804 R) at 2426 \times g for 6 minutes.

The supernatant was discarded, 50 ml of 1×PBS solution was measured onto the bacterial pellets, and they were vortexed (10 sec). They were centrifuged again the supernatant was discarded and the pellet was redissolved in 1×PBS solution. After vortexing, 900 µl of 1×PBS and 100 µl of cell suspension were measured into semi-micro cuvettes (Greiner Bio-One Hungary). Optical density was measured at a wavelength of 600 nm with a BioMate 160 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA), and the OD₆₀₀ values were standardized to 0.2 for each sample for the measurement results to be comparable. The set values were checked by OD₆₀₀ measurements. In the case of appropriate values, 4 ml each of bacterial suspension was dispensed into sterile Wassermann tubes, labeled A, B and C for each sample, to ensure three technical replicates. The samples thus prepared were aerobically incubated in Wassermann tubes at room temperature during the assay. Optical density measurements were performed at 0, 5 and 24 hours. At each measurement time point, 200 µl was removed from the top of the bacterial suspension with a wide-tip pipette tip (Axygen, Union City, CA, USA), and it was diluted with 800 µl of 1×PBS solution in a semi-micro cuvette. At each of the three measurement times, the OD₆₀₀ value of each lettered sample was measured three times and the percentage of aggregation was calculated according to the formula given by GARCÍA-CAYUELA et al. [9]

$$[1 - (A_{\text{measurement time}} / A_0) \times 100],$$

where: $A_{\text{measurement time}}$: the absorbance value of the cell suspension at the given measurement time (5 h, 24 h); A_0 : the absorbance value of the cell suspension at time 0 h.

Currently, there is no uniform system for the assessment of autoaggregation. In the course of their studies, DEL RE et al. [8] rated strains with an aggregation value of >80% as well aggregating isolates, while strains with a value of <10% were considered non-aggregating.

3.6. Analysis of acid and bile acid tolerance

3.6.1. Acid and bile acid culture media required for the test

To test for acid tolerance, MRS culture medium (VWR) was prepared as described, and it was sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes. Next, the pH was adjusted with 1 M HCl under aseptic conditions to the following values: 6.0; 5.5; 5.0; 4.0; 3.0. The sterile culture media were cooled back to 45 °C, and plates were poured into square Petri dishes (Greiner Bio-One Hungary). The MRS culture medium with a pH of 6.0 served as the untreated medium.

To test for bile acid tolerance, the MRS culture medium (VWR) was prepared according to the manufacturer's instructions. After sterilization (at 121 °C, 15 min), sterile-filtered porcine bile (Sigma Aldrich) was added to the basic agar cooled back to 45 °C, using a 0.45 µm pore size membrane filter (Thermo Fisher Scientific). Supplementation was performed to achieve final bile concentrations of 0%, 0.1%, 0.2% and 0.5% in the culture medium. MRS agar containing no bile served as a negative control.

3.6.2. Strain restoration and optical density (OD) measurement

Bacterial strains were restored in a pH 6.2 MRS broth as a result of anaerobic incubation at 37 °C for 18 hours. The multiplied cultures formed more or less pellets at the bottom of the Falcon tube, which was evaluated. The cultures were centrifuged (2426 × g, 6 min, room temperature) (Eppendorf Centrifuge 5804 R). The supernatant was discarded, and the samples were redissolved in 1×PBS solution. After a short (10 sec) vortexing, centrifugation was repeated, and the supernatant was discarded again. After redissolution in 1×PBS solution, vortexing was performed for 10 sec, and the optical density of a 10-fold dilution of the suspension was measured with a BioMate 160 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) at 600 nm. Following the measurement, suspensions with a uniform OD₆₀₀ value of 0.5 were prepared. For accuracy, the OD₆₀₀ values of the suspensions with adjusted cell densities were remeasured.

3.6.3. Presence-absence test

Of the cell suspensions with an OD₆₀₀ = 0.5, 18 (9 technical × 2 biological replicates) × 10 µl were applied to the surface of culture media with different pH values and bile acid contents, and then the plates were incubated at 37 °C for 48 hours, as described in Section 3.2.7.

3.6.4. Process of bile acid and hydrochloric acid treatment

The tested bacterial strains were treated with bile acid and hydrochloric acid, according to the agents added to the culture media. MRS culture media with a pH of 6.0 with no bile or hydrochloric acid served as negative controls. The procedure of the tests is illustrated in **Figure 1**.

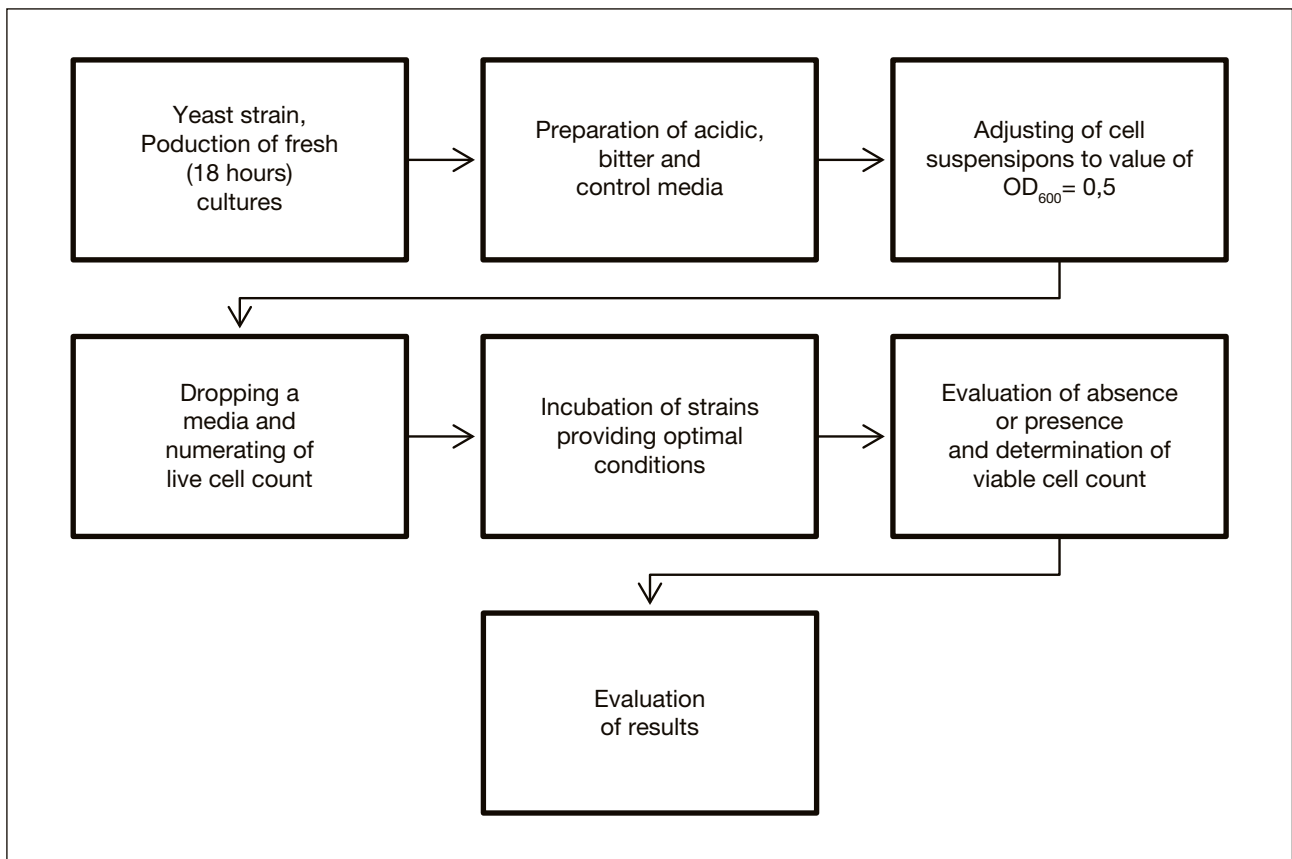


Figure 1. Flow chart of bile acid and hydrochloric acid treatment

3.6.5. Inoculation and viable cell count determination

Decimal dilution series were prepared from the cultures of both our own isolates and the control bacterial strains, and then 100 µl of each dilution member was spread on the surface of MRS agar plates with a pH value of 6.0. The plates thus prepared were incubated at 37 °C for 72 hours under anaerobic conditions. At the end of the incubation period, the colonies were counted.

4. Results and evaluation

4.1. Classical microbiological tests

The aim of classical microbiological tests was to select Gram-negative, catalase-positive and hemolyzing strains. Using these methods, we were able to eliminate out of the 217 isolates those that did not meet the criteria for probiotics. **Table 3** shows a non-exhaustive list of strains with appropriate characteristics based on the results of classical microbiological tests, which were included in subsequent studies (aggregation, acid tolerance and bile acid tolerance studies).

Table 3. Main characteristics of strains based on the results of classical microbiological tests

Strain	Colony morphology*	Gram staining	Catalase test	Hemolysis test
E10	Tiny, white, irregular colony with creamy surface	Gram+ rods	Negative	Negative
E15	Large, white, snowflake-like colony	Gram+ rods	Negative	Negative
E66	Large, white, irregular, matte colony with jagged edge	Gram+ rods	Negative	Negative
E92	Large, white, regular, matte colony	Gram+ rods	Negative	Negative
E173	Large, white, irregular, matte colony with jagged edge	Gram+ rods	Negative	Negative
E198	Large, white, buttery, irregular, matte colony	Gram+ rods	Negative	Negative
E216	Tiny, white, buttery, irregular colony with creamy surface	Gram+ rods	Negative	Negative
LA-5	Large, white, regular colony with creamy surface	Gram+ rods	Negative	Negative

*Colony morphology was examined with strains developed on MRS agar adjusted to a pH value of 6.2.

Of the 217 isolates, 25 catalase-positive and 29 Gram-negative strains were identified. These were also excluded from the clone classes and from individual strains that did not fit into the clone classes after the clonality test. None of the strains hemolyzed on blood agar, so although this test did not help to narrow down the large sample number, it was absolutely necessary to perform it to assess the safety of the probiotic strains.

According to the practice of our group, Sedláčková et al. Also included only Gram-positive, rod-shaped and catalase-negative isolates in their further in vitro studies [10]. In their study, a total of 59 Gram-positive and catalase-negative strains were isolated, of which 7 were isolated from raw milk and 12 from cheese prepared from raw cow's milk. The colony morphology was found to be similar to that of the colonies of *L. acidophilus* LA-5.

4.2. Clonality test

RAPD-PCR assays were carried out in parallel with classical microbiological tests. Based on the unique RAPD patterns, the 217 strains were classified into 34 clone classes, of which a gel photograph of clone class 34 is shown in **Figure 2**; **Figure 3** shows several clone classes and individual strains.

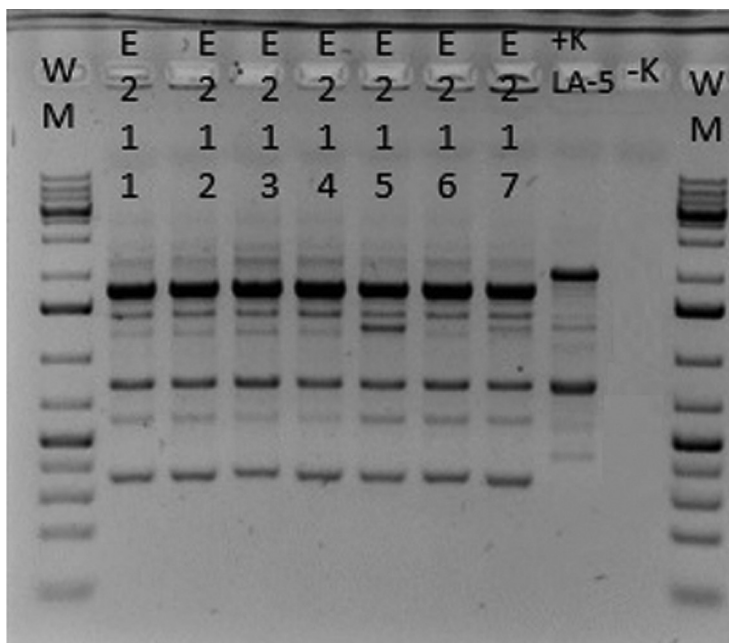


Figure 2. Clonality test of members of clone class 34 (samples: E211–E217, positive control: *Lactobacillus acidophilus* LA-5, negative control: distilled water, molecular marker: WM; Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder)

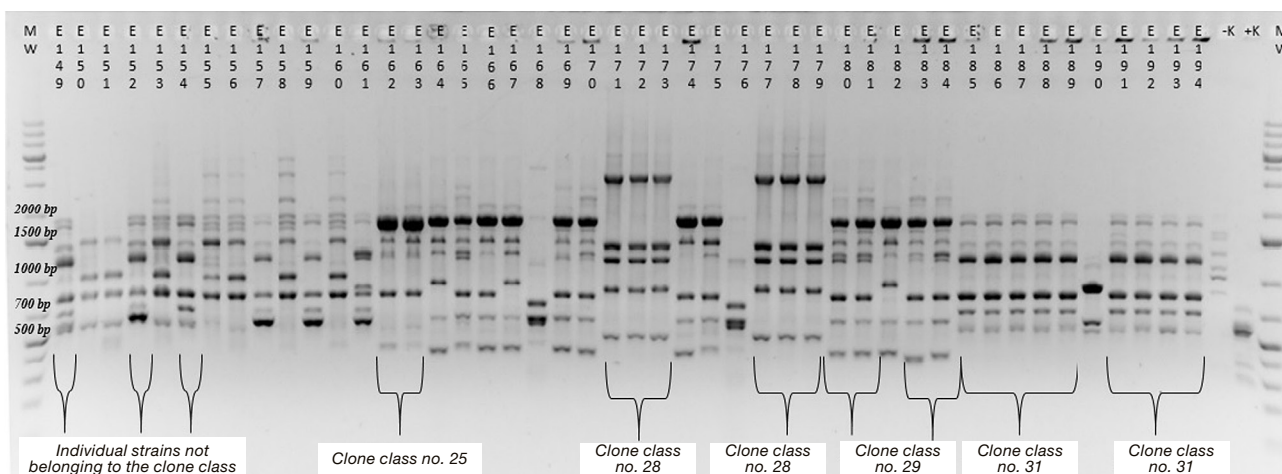


Figure 3. Gel photograph of several clone classes and individual strains (samples: E149–E194, positive control: E31, negative control: distilled water, molecular marker: WM; Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder)

In the course of our studies, 57 individual strains were found, which could not be classified into clone classes, so the range of isolates was narrowed down to 91 based on the results of the clonality tests. Gram-negative and catalase-positive isolates were excluded by classical microbiological methods, leaving a total of 34 clone classes and 37 individual strains that could not be classified into clone classes, reducing the starting number to 71 isolates. This greatly aided preselection, as less than one third (32.7%) of the strains remained. As the results of the RAPD-PCR assays are highly dependent on laboratory conditions, precise execution of the method is of paramount importance for the reproducibility of the results [11]. The 1254 primer used allowed the comparison of isolates with similar patterns in the course of the RAPD-PCR assays. This is consistent with the statement of Torriani et al. [12] that primer 1254 is eminently suitable for detecting polymorphisms among *L. delbrueckii* strains.

4.3. Examination of autoaggregation

In our further studies, the 37 individual strains that could not be classified into clone classes were not included, so the in vitro test series were continued by selecting one bacterial strain from each of the 34 clone classes for the examination of autoaggregation. Our goal was to find well-aggregating (>70% after 5 hours of incubation, >80% after 24 hours of incubation) and non-aggregating (<25%) strains, which then could be included in further acid and bile acid tolerance experiments. It was hypothesized that well-aggregating strains would be more likely to be probiotic, and thus they may also be able to better tolerate acid and bile acid treatment.

Aggregation assay measurements were carried out after 0, 5 and 24 hours. It was decided to perform measurements after 5 hours on the basis of the results of Kos et al. [13], who found that *L. acidophilus* M92 was already highly autoaggregated after 5 hours. The authors cultured their test strains in MRS broth to preserve some of the cell surface proteins that allow aggregation [13].

The 34 strains were tested in two biological duplicates. Isolates with an aggregation value over 70% were found after 5 hours of treatment, namely the following six E15, E66, E92, E173, E198 and E216. *L. acidophilus* LA-5 and ATCC 4356 strains used as positive controls also aggregated well (78.2% and 72.1%, respectively) (Figure 4).

It should be mentioned that the well-aggregating strains formed pellets visible to the naked eye at the bottom of the Wassermann tubes, and the upper part of the suspension became clear. The same finding was made by García-Cayuela et al. [9], who isolated 126 *L. plantarum* strains from cheese samples made from raw milk and carried out preliminary evaluation of the aggregation (sedimentation) ability of the strains in MRS broth with the naked eye, on the basis of which the appearance of snowflake-like aggregates has been reported. Fourteen strains were included in the autoaggregation study, and optical density measurements were performed after 2, 6, 20 and 24 hours. The highest autoaggregation values (28.5-59.5%) were observed after 1 day. Values increased over time, however, they varied from strain to strain. Compared to the aggregation percentages reported by them, we measured higher values (>75%) after 5 hours of incubation.

Xu et al. [14] tested the ability of probiotic and pathogenic strains to self-aggregate. The results obtained after 2 hours of incubation showed that three strains (*Bifidobacterium longum* B6, *L. rhamnosus* GG and *L. brevis* KACC 10553) performed well, with aggregation percentages between 40 and 50%. Tuo et al. [15] examined the aggregation ability of 22 *Lactobacillus* strains after 5 hours of incubation at 37 °C, and values of 24.2 to 41.4% were obtained. They used *L. rhamnosus* GG as a positive control, which proved to be the best performing strain with an aggregation value of 41.4%.

Cumulative results of the autoaggregation study of Transylvanian and control strains (after 5 and 24 hours of incubation) are shown in Figure 5. It can be stated that each strain achieved a higher value after 24 hours compared to its result after 5 hours. The probiotic *L. acidophilus* LA-5 used as a control and *L. acidophilus* ATCC 4356, which has a well-aggregating phenotype, performed excellently after 24 hours, as reported in the literature (94.1% and 93.5%, respectively). Of the strains belonging to the 34 clone classes, 19 aggregated above 80%. This means that the method developed by us proved to be suitable to distinguish between well and poorly aggregating isolates. In a 24-hour autoaggregation study of *Lactobacillus* strains isolated from yogurts, Prabhurajeshwar and Chandrakanth [16] measured values that were lower than our results (39.4-52.0%).

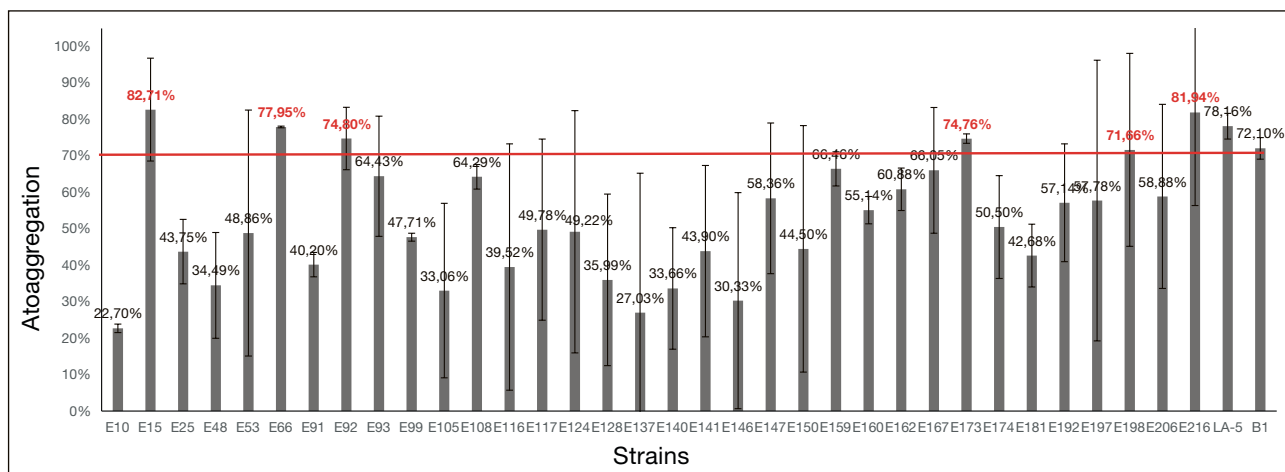


Figure 4. Results of autoaggregation studies of our own isolates and control strains after 5 hours of incubation [Data represent mean \pm standard deviation of 2 biological \times 3 technical replicates; the horizontal red line allows the visualization of well-aggregating (>70%) strains]

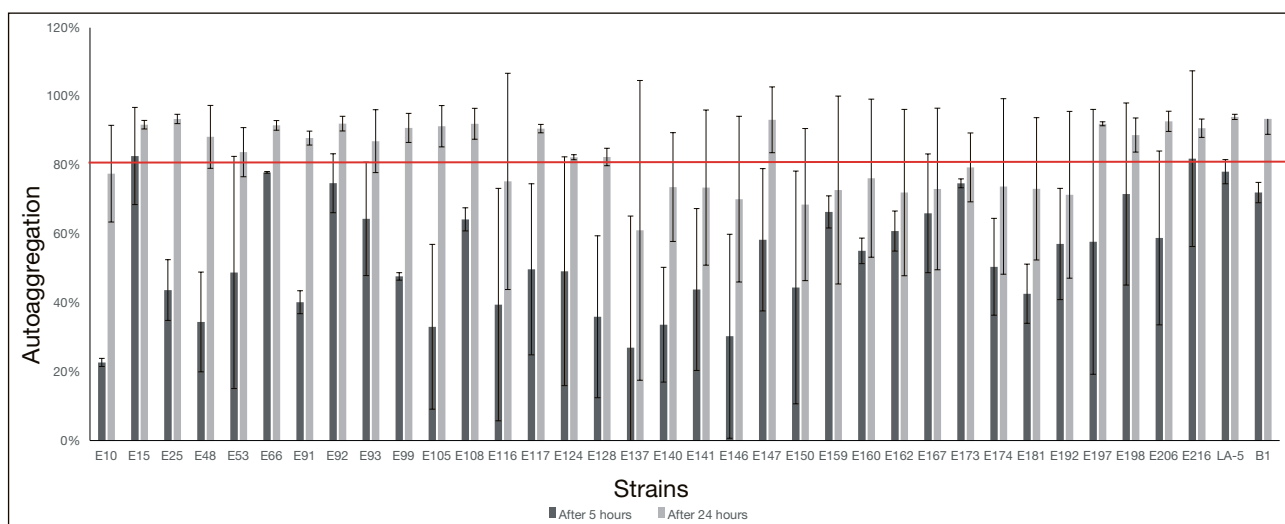


Figure 5. Results of autoaggregation studies of our own isolates and control strains after 5 and 24 hours of incubation [Data represent mean \pm standard deviation of 2 biological \times 3 technical replicates; the horizontal red line allows the visualization of well-aggregating (>80%) strains]

4.4. Examination of acid and bile acid tolerance

Acid and bile acid tolerance was studied using 6 strains (E15, E66, E92, E173, E198, E216) that aggregated well after 5 hours of incubation, and *L. acidophilus* LA-5 was used as a positive control, the latter strain being probiotic, having adequate aggregation indices and having displayed excellent properties in similar studies in the past [17]. In addition, from our own isolates, strain E10 with less favorable aggregation ability (22.7%) was also included in our studies in order to determine whether there is a correlation between good aggregation and between acid and bile acid tolerance.

Results were recorded after 48 hours of incubation. At the site of the bacterial suspension droplets with a volume of 10 μ L inoculated onto the surface of the culture medium, colony growth or the absence of proliferation was observed. It was judged with the naked eye whether the strains were able to visibly proliferate on the surface of the culture media supplemented with acid or bile acid, as well as on the surface of the control culture media (presence-absence test). On the one hand, we were looking to answer the question what acid and bile acid concentrations the individual strains were able to tolerate and, on the other hand, whether there is a correlation between the aggregating ability and the acid or bile acid tolerance. Our results are shown in **Tables 4** and **5**.

Table 4. Results of the presence-absence test performed on the surface of solid culture medium supplemented with acid*

Strain	PH value of MRS agar				
	6.0	5.5	5.0	4.0	3.0
E10 isolate	+++	++	++	++	0
E15 isolate	+++	+++	+++	+++	0
E66 isolate	+++	+++	+++	+++	0
E92 isolate	+++	+++	+++	+++	0
E173 isolate	+++	+++	+++	+++	0
E198 isolate	+++	+++	+++	+++	0
E216 isolate	+++	+++	+++	+++	0
Lactobacillus acidophilus LA-5	+++	+++	+++	++	0

* n = 18 (9 parallels × 2 replicates).

0: no proliferation, +: poor proliferation, ++: moderate proliferation, +++: clearly visible, strong proliferation.

Table 5. Results of the presence-absence test performed on the surface of solid culture medium supplemented with bile acid*

Strain	MRS agar supplemented with			
	0%	0.1%	0.2%	0.5%
	porcine bile			
E10 isolate	+++	+	0	0
E15 isolate	+++	+++	+++	+++
E66 isolate	+++	+++	+++	+++
E92 isolate	+++	+++	+++	+++
E173 isolate	+++	+++	+++	+++
E198 isolate	+++	+++	+++	+++
E216 isolate	+++	++	++	++
Lactobacillus acidophilus LA-5	+++	+++	++	+

* n = 18 (9 parallels × 2 replicates).

0: no proliferation, +: poor proliferation, ++: moderate proliferation, +++: clearly visible, strong proliferation.

It can be seen that *L. acidophilus* LA-5 grew well on MRS culture media with pH values of 6.0, 5.5, 5.0 and 4.0, as well as on MRS culture media containing 0.1% and 0.2% bile acid, thus it proved to be well tolerant of acid and moderately tolerant of bile acid. The control strain showed only a weak growth on culture media containing 0.5% bile acid. Neither the control, nor the Transylvanian strains formed colonies on the most acidic (pH = 3.0) MRS culture medium, so solid culture media with pH values of 4.0 and 3.0 proved to be suitable for pre-selection.

Pan et al. [18] maintained a *L. acidophilus* NIT strain isolated from infant feces in a glycine–hydrochloric acid buffer (pH: 2.0; 3.0; 4.0) for 1, 2 or 3 hours. After the treatment, the bacterial pellet was resuspended, and 20 µL of the suspension of the appropriate dilution members was spread on the surface of MRS agar plates. It was found that after 3 hours of treatment, only 10% of *L. acidophilus* cells survived. Although our studies were not performed in the same experimental setup, the results may explain why *L. acidophilus* did not form colonies on a culture medium with a pH value of 3.0. By the addition of 3% whey protein isolate, Vargas et al. [19] achieved that *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-12 survived acid treatment in maximum numbers. The aim of Valente et al. [20] was to assess the in vitro and in vivo probiotic potential of lactic acid bacterial strains (*L. plantarum* B7 and *L. rhamnosus* D1) isolated from traditional Brazilian cheeses. Both strains were moderately tolerant of 0.3% of ox bile after 12 hours of incubation. Both isolates B7 and D1 have been shown to be resistant to artificial digestive juices (pH: 2.0 and 3 g/L pepsin) [20].

The physiological concentration of bile acid salts varies between 0.3% and 0.5% in the gastrointestinal tract [21], this is why 0.5% was chosen as the highest bile concentration.

The author mentioned also added to his culture medium 0.3, 0.5, 1.0 or 2.0% bile acid salt, and then 10 µL of the stock culture was applied to the surface of the culture medium. Although he worked not with *Lactobacillus*, but with *Lactococcus* strains isolated from raw cow's and goat's milk and from traditional kefir, his experimental system was similar to ours. *Lactococcus lactis* strains did not tolerate any of the bile acid concentrations used.

Based on our results, it was found that the selected isolates generally well tolerated the presence of 0.5% bile acid, which in turn was not true for strain E10, which barely proliferated even at the lowest (0.1%) bile concentration. The poor aggregation ability of isolate E10 was accompanied by good acid tolerance and poor bile acid tolerance. The control strain *L. acidophilus* LA-5, although poorly, but still proliferated on the culture medium containing 0.5% bile. During the procedure used, the strains were exposed to the destructive ingredients not only for a few hours, but they were in contact with them for 48 hours. It is worth mentioning that the negative effects of the destructive agents can be mitigated by the addition of whey protein powder to the culture medium [19]. Presence-absence testing on the surface of the solid culture medium supplemented with acid or bile acid can be considered a relatively fast method, because the required culture media can be prepared easily, dropping onto the surface of the culture medium can be performed quickly, so the results are available in a short time.

5. Conclusions

Our efforts to develop some elements of an in vitro test system for the selection of probiotic bacterial strains have proven to be successful. The steps presented here do not necessarily need to be further refined, because they are already capable of the pre-selection of large sets of isolates. Although primer 1254 has been shown to be a good choice, it will be worth performing the RAPD-PCR reaction with other primers in subsequent clonality assays. There was a positive correlation between the results of the aggregation studies and those of the acid and bile acid tolerance tests, however, to factually establish the probiotic properties of the isolated strains, further in vitro studies and in vivo animal experiments are needed. In order to have an even more efficient selection than at present, it seems worthwhile to supplement the test system with other elements, e.g., antibiotic resistance or antimicrobial activity assays.

6. Acknowledgment

The authors would like to thank the financial support of the project titled "Innovative scientific workshops in Hungarian agricultural higher education", ID no. EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008, and of the project titled "Developments for intelligent specialization in cooperation between the University of Veterinary Medicine and the Faculty of Agricultural and Food Sciences of Széchenyi István University", ID no. EFOP-3.6.1-16-2016-00024.

7. Literature

- [1] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11 pp. 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [2] Fijan, S., Frauwallner, A., Varga, L., Langerholc, T., Rogelj, I., Lorber, M., Lewis, P., Povalej-Bržan, P. (2019): Health professionals' knowledge of probiotics: an international survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 pp. 3128. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173128>
- [3] Szakály, S. (2004): *Probiotikumok és Humánegészség. Vissza a Természethez! Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, Mosonmagyaróvár.*
- [4] European Parliament, Council of the European Union (2003): Regulation (EC) no. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union* L268 pp. 29-43.
- [5] Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Folligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015): Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* 6 pp. 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
- [6] Williams, C.F., Walton, G.E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G.R. (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual Review of Food Science and Technology* 6 pp. 329-350. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015429>
- [7] Antal, O., Némethné Szerdahelyi, E., Takács, K. (2020): In vitro humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén (Application of in vitro human digestion models in the field of nutrition science). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 66 pp. 3141-3157.

- [8] Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000): Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31 pp. 438-442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
- [9] García-Cayuela, T., Korany, A.M., Bustos, I., de Cadiñanos, L.P.G., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C. (2014): Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International* 57 pp. 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>
- [10] Sedláčková, P., Horáčková, Š., Shi, T., Kosová, M., Plocková, M. (2015): Two different methods for screening of bile salt hydrolase activity in *Lactobacillus* strains. *Czech Journal of Food Sciences* 33 pp. 13-18. <https://doi.org/10.17221/299/2014-CJFS>
- [11] Pereszlenyi, K. (2019): Tejsavbaktériumok genetikai azonosságának vizsgálata molekuláris markerekkel. Szakdolgozat. Széchenyi István Egyetem, Mosonmagyaróvár.
- [12] Torriani, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F. (1999): Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 pp. 4351-4356. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4351-4356.1999>
- [13] Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003): Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94 pp. 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- [14] Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., Ahn, J. (2009): Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology* 49 pp. 434-442. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x>
- [15] Tuo, Y.F., Yu, H.L., Ai, L.Z., Wu, Z.J., Guo, B.H., Chen, W. (2013): Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science* 96 pp. 4252-4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
- [16] Prabhurajeshwar, C., Chandrakanth, K. (2019): Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in vitro by probiotic lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental* 23 pp. 97-115. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.10.001>
- [17] Süle, J., Varga, L., Varga, K., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) Probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas kísérleti rendszer egyes elemeinek kidolgozása (Developing basic elements of an experimental system for selection of probiotic bacterial strains). *Magyar Állatorvosok Lapja* 144 (közlésre benyújtva).
- [18] Pan, X.D., Chen, F.Q., Wu, T.X., Tang, H.G., Zhao, Z.Y. (2009): The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20 pp. 598-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.019>
- [19] Vargas, L.A., Olson, D.W., Aryana, K.J. (2015): Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12. *Journal of Dairy Science* 98 pp. 2215-2221. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8869>
- [20] Valente, G.L.C., Acurcio, L.B., Freitas, L.P.V., Nicoli, J.R., Silva, A.M., Souza, M.R., Penna, C.F.A.M. (2019): Short communication: In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese. *Journal of Dairy Science* 102 pp. 5957-5961. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15938>
- [21] Yerlikaya, O. (2019): Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science* 102 124-134. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14983>

Összetett bio-tartósítószer hatása a friss sertéskaraj mikrobiológiai mutatóira és eltarthatóságára

Kulcsszavak: tartósítószer, antioxidáns, friss húskészítmények, összcsíraszám, élesztő, eltarthatóság, tárolás, mikrobiológia

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Cikkünk egy összetett tartósítószer hatásának vizsgálatával foglalkozik friss sertés-hús termékek mikrobiológiai mutatóira és eltarthatóságára. Vizsgáltuk a különböző tartósítószer hatását az összcsíraszámra és az élesztőszámra friss húspan tárolás során. Kísérleti tanulmányok azt mutatták, hogy az összetett tartósítószer keverék* aktívan gátolja a mikroorganizmusok növekedését a friss sertéskaraj tárolása során. A kontrollmintában a mikroorganizmusok száma a tárolás hetedik napján $12 \cdot 10^4$ CFU/g volt, míg a hozzáadott összetett tartósítószer keveréket tartalmazó mintában $0,1 \cdot 10^4$ CFU/g volt. A felhasználásra kész tartósítószer keverék alkalmazása lehetővé teszi a durvára vágott friss sertéshústermékek hosszú távú (hét napos) tárolása során az élesztő szaporodásának aktív visszaszorítását (250 CFU/g).

Meghatároztuk a tartósítószer alkalmazásának optimális módját friss sertéskaraj esetén. A tartósítószer alkalmazásának legkézenfekvőbb módja ennek a mintatípusnak az esetén a durvára vágott friss hússal történő egyszerű összekeverése és masszírozása (fűszerekkel vagy pácokkal együtt). Kísérleteink során figyelembe vettük az elsődleges és másodlagos lipid bomlástermékeket, valamint meghatároztuk a friss húskészítmények peroxid- és savszámát a 30 napos tárolás során.

A 30 napos tárolás után a kontrollmintában az oxidációs folyamatok érzékelhető növekedése volt megfigyelhető, aminek alapján meghatároztuk a durvára vágott friss sertéshústermékek eltarthatósági idejét.

*A reklámokra vonatkozó törvény értelmében a tartósítószer keverék nevét nem közölhetjük (A szerk.)

¹ Dél-uráli Állami Egyetem

² Dél-uráli Állami Agráregyetem

³ Antey Kft.

2. Bevezetés

Az élelmiszerek és nyersanyagok hatékony tartósításának problémája előállításuk, tárolásuk, szállításuk és kereskedelmük minden szakaszában, beleértve az otthoni élelmiszer-tartósítást is, napjainkban aktuális kérdés. Egyes becslések szerint a világon megtermelt élelmiszer akár 25%-a is érzékeny lehet csak a penész károsító hatásaira [1].

Az élelmiszerek tartósításának és mikrobiológiai romlásuk megelőzésének jelenlegi módszerei három csoportra oszthatók: fizikai, kémiai és biológiai módszerek. A fizikai módszerek közé tartozik a hőmérsékleti expozíció (melegítés és hűtés), a szárítás, a vákuumozás stb. A kémiai módszerek közé tartozik a sózás, a füstölés, a sós vizes kezelés, a tartósítószer használata stb. A biológiai módszerek a starter és bioprotektív kultúrákkal történő kezeléssel, baktericidok és enzimek alkalmazásából állnak [2, 3]. Ezen módszerek mindegyikének vannak bizonyos korlátai egy adott termék előállítása során az érzékszervi tulajdonságokra és tápértékre gyakorolt hatásuk, valamint műszaki megvalósíthatóságuk miatt (például a szükséges felszerelés igénye, vagy a felhasznált anyagok és készítmények szűkössége). A mikrobiológiai romlás megelőzésének összes ismert módszere közül a kémiai tartósítószereket tartják a legkönnyebben alkalmazhatónak, gyorsan megvalósíthatónak, amelyek nem igényelnek speciális felszerelést és/vagy gyártási módot [4, 5]. A húspár azonban meglehetősen konzervatív az élelmiszer-adalékanyagok felhasználását illetően, mivel a kémiai tartósítószer csak korlátozottan engedélyezett a húskészítmények gyártása során, elsősorban a kocsonyás termékek gyártásában és a felületkezelésben [6]. Emellett a fogyasztók túlnyomó többsége elutasítónak viszonyul a tartósítószert tartalmazó címkézett húshoz. E tekintetben a kémiai tartósítószer felhasználása a húskészítmények előállítása során jelentősen korlátozott, és nem tekinthető a mikrobiológiai romlás megelőzése univerzális eszközének.

Oroszországban a sertéshús fogyasztási szintje és termelése az utóbbi időben gyorsan növekedett. Elmondható, hogy a sertéshús manapság uralja a húspárt. 2020-ban a sertéshústermelés 23%-kal nőtt.

A sertéshús teljes értékű állati fehérje forrása is, és magas tápértékkel rendelkezik. Ezenkívül a sertéshús az emberi szervezet átfogó fejlődéséhez szükséges vitaminokat, makro- és mikroelemeket tartalmaz [7].

Ahhoz, hogy az egészségre gyakorolt kedvező tulajdonságokat egészében megőrizzük, be kell tartani a hús feldolgozási, szállítási és tárolási szabályait. A Sanitary Rules and Norms SanPiN 2.3.2.1078-01 és a Technical Regulations of the Customs Union TRCU 034/2013 „On the safety of meat and meat products” szerint a sertéshús a romlandó áruk kategóriájába tartozik.

A tárolási körülményeket és feltételek megsértése esetén jelentősen felgyorsul a mikroorganizmusok növekedése és szaporodása a friss sertéshúsban, ami a bakteriális szennyeződés fokozódásához vezet. Kedvező körülmények között a mikroorganizmusok a felületen felhalmozódnak és fokozatosan behatolnak a hús mélyére, ami a termék megromlását okozza. Tárolás során a hús elveszti értékes tulajdonságait, érzékszervi, fizikai és kémiai paraméterei jelentősen romlanak, és a patogén mikrobiális flóra élettevékenysége miatt megnő az emberi egészség károsodásának kockázata. A húsromlásnak többféle típusa van: rothadás, nyálkaképződés, penészképződés, savas erjedés (hússavanyodás) stb. Ezeknek a folyamatoknak az intenzitása a hőmérséklettől, a relatív páratartalomtól, a mikroorganizmus típusától és a hús kezdeti szennyezettségének mértékétől függ [8].

Rothadásos romlás leggyakrabban a helyes tárolási feltételek sérülése esetén fordul elő. A rothasztó mikroflóra a hús romlását okozza. A rothasztó mikroorganizmusok lehetnek akár aerobok, akár anaerobok. Képesek olyan proteáz enzimeket kiválasztani, amelyek lebontják a fehérjéket. Ezen mikroorganizmusok között vannak aerob bacillusok (*B. pyocyaneum*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. megatherium*), anaerob clostridiumok (*Cl. putrificus*, *Cl. histolyticus*, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*) és fakultatív anaerob coccusok. Az aerob rothadás végtermékei az ammónia, a szén-dioxid, a kén-hidrogén és a merkaptánok. Ezen vegyületek mindegyike károsíthatja az emberi szervezetet, ami súlyos mérgezésben nyilvánulhat meg [9].

A sertéshús anaerob rothadása oxigén nélkül következik be. Emiatt még a vákuumcsomagolás sem védi meg a húst a romlástól, ha a tárolási hőmérsékletre vonatkozó követelményeket megsértik. Az anaerob rothadás végtermékei az aminosavak dekarboxilezésének termékei, amelyek kellemetlen szagú anyagok képződését okozzák, mint például az indol, a szkatol, a fenol, a krezol és a diaminok. Származékaik hullámérges (kadaverin, putreszcin stb.); mérgezőek az emberre, és halált is okozhatnak [10].

A nyálkaképződés nyálkaképző mikroorganizmusok (tejsavbaktériumok, élesztőgombák és mikrococcusok) elszaporodásának és részleges elhalásának eredménye a sertéshús felületén. A hús 18-25 °C-on történő tárolása és a magas páratartalom hozzájárul a nyálkaképződéshez. Azonban egyes nyálkaképző mikroorganizmusok akár fagypontra alatti hőmérsékleteken is kifejlődhetnek. A nyálkaképződés során a hús felülete ragacsossá válik, szürkés-zöld árnyalatot és visszataszító szagot kap, a hús felületi rétegeinek pH-ja 5,2-5,3 lesz. Fontos különbséget tenni a nyálkaképződés és a rothadás kezdeti szakasza között, mivel ezeket teljesen más mikroflóra okozza [11].

A húsromlás egy másik, hasonlóan veszélyes típusa a penészképződés, amely akkor következik be, amikor a termék hosszan tartó tárolása során mikroszkopikus gombák fejlődnek ki annak felületén. A penészesedés során a hús minősége a fehérjék hidrolízise és az aminosavak dezaminációja miatt romlik. A húsfelületeken leggyakrabban előforduló gombák, a *Mucor*, a *Penicillium*, az *Aspergillus* és a *Cladosporium*, alacsony hőmérsékleten (hűtőszekrényben) is képesek növekedni. Ezek a gombák mikotoxinokat termelnek, élelmiszerromlást, allergiás reakciókat és különféle betegségeket okoznak az emberi szervezetben [12, 13].

Dolgozatunk célja a tartósítószer keverékben lévő élelmiszer adalékanyagok vegyületei hatásának vizsgálata (részletesebben lásd a 3.1. szakaszt) a friss sertéshús tárolás közbeni mikrobiológiai romlással szembeni ellenálló képességére.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kutatás tárgyai

A cikkben szereplő kutatási tárgyak a következők:

- Durvára vágott friss sertéshús (legfeljebb 15 tömegszázalék zsírtartalommal)
- Egy tartósítószerként alkalmazott élelmiszer-adalékanyag vegyületei. A felhasználásra kész keverék a következőket tartalmazza: kálium-szorbát (E202), nátrium-acetát (E262), nátrium-benzoát (E211), glicerin (E422), karboximetil-cellulóz (E466) és egy antioxidáns (dihidrokvercetin). Az adalékanyagot egy oroszországi kutató és gyártó társulás állítja elő.
- Tejsav
- Ecetsav
- Nátrium-acetát (E262)

3.2. Kutatási módszertan

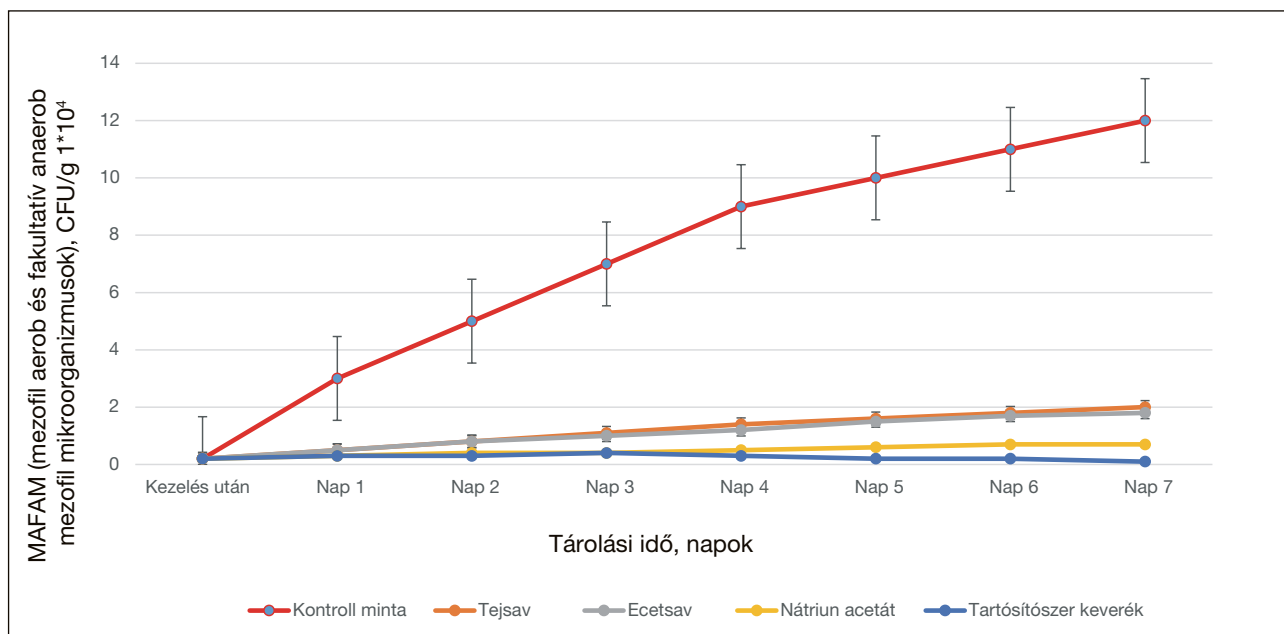
Az összcsíraszámot és az élesztő mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy a terméket táptalajt tartalmazó agarlemezekre szélesztettük, hagytuk a mikroorganizmusokat kinőni, majd megszámláltuk az összes különálló telepet.

A peroxid- és savszámot standard módszerekkel határoztuk meg [14, 15]. A peroxidszám meghatározásának módszere az állati zsírok oxidációs termékeinek (peroxidok és hidroperoxidok) kálium-jodiddal való reakcióján alapul ecetsav és izooktán vagy kloroform oldatában, amit a felszabaduló jód mennyiségi meghatározása követ nátrium-tioszulfát-oldattal titrimetriás módszerrel. A savszám meghatározásának módszere a minta oldószerkeverékben történő feloldásán, és a szabad zsírsavak kálium-hidroxid-oldattal történő titrálásán alapul.

Minden vizsgálatot három párhuzamosban végeztünk el, hacsak másképp nem jelezzük, és kiszámoltuk az átlagértékeket. Az eredményeket átlagérték \pm szórás formában fejeztük ki. Az átlagértékek közti szignifikáns különbségeket $p < 0,05$ szignifikanciaszinten egytényezős varianciaanalízis és Student-teszt segítségével azonosítottuk. Statisztikai elemző szoftverként a Microsoft Excel 2010-es verzióját alkalmaztuk.

4. Eredmények és diszkusszió

A tartósítószer keverék funkcionális tulajdonságainak azonosítására hűtött sertéshúsokon végeztük vizsgálatokat, összehasonlítva kontrollmintákkal és a leggyakoribb tartósító hatású anyagokkal (tejsav, ecetsav és nátrium-acetát). Elvégeztük a húskészítmények mikrobiológiai mutatóinak összehasonlító értékelését, melynek során 7 napon keresztül, 8-10 °C-os hőmérsékleten monitoroztuk a mezofil aerob és a fakultatív anaerob mikroorganizmusok (MAFAM) mennyiségét. A kísérleti eredményeket az **1. ábra** mutatja.



1. ábra. Különböző tartósítószer hatása friss sertéskaraj összcsíraszámára tárolás során

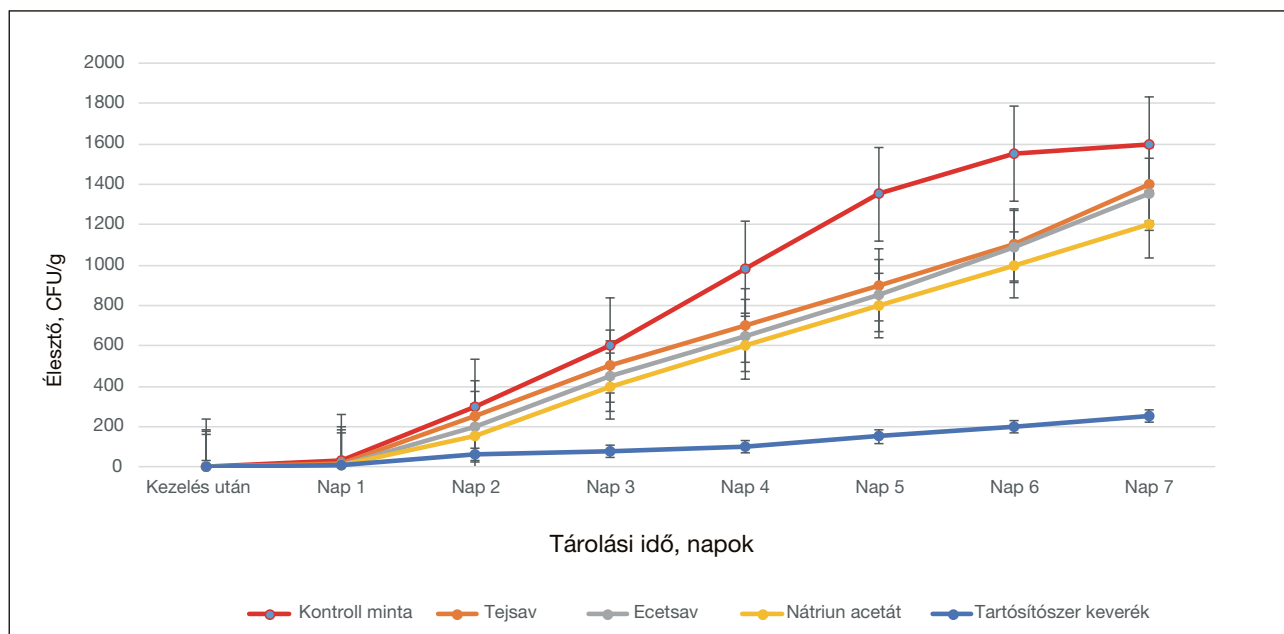
A húsdarabok romlásának leggyakoribb mutatója a természetes savas erjedés. A glikogénben gazdag izomszövetben rendszerint savas fermentáció alakul ki. A folyamat fő jelei a savanyú szag, a szürke vagy zöldes árnyalat, a szövetek rugalmasságának csökkenése, és ennek következtében egy laza konzisztencia. A hiba okozói pszichotróf tejsavbaktériumok és élesztőgombák, amelyek a szénhidrátokat szerves savakká, valamint gázokká (szén-dioxid és esetenként hidrogén) erjesztik. A hús szénhidrátjain kívül az apróra vágott hústermékek olyan szénhidrátokat is tartalmaznak, amelyek hagymából, pácokból és egyéb összetevőkből származnak. Ezek a sertéshúsdarabok közötti sós lében található szénhidrátok kedvező táptalajt jelentenek a savas erjedés kórokozóinak növekedéséhez.

Kísérleti vizsgálataink kimutatták, hogy a kiválasztott tartósítószer a tárolás során aktívan gátolja a mikrobiális növekedést. Így a hetedik napon a mikróbatartalom a kontrollmintában $12 \cdot 10^4$ CFU/g¹ volt, a tejsavat tartalmazó mintában $2 \cdot 10^4$ CFU/g, az ecetsavat tartalmazó mintában $1,8 \cdot 10^4$ CFU/g, a nátrium-acetátot tartalmazó mintában $0,7 \cdot 10^4$ CFU/g, a tartósítószer keverék vegyületeit tartalmazó mintában pedig $0,1 \cdot 10^4$ CFU/g.

Az élesztőgombák kifejlődésének megakadályozása a húsdarabokban a nyers hústermékek gyártói sikerének fontos eleme, mivel ez közvetlen kapcsolatban van a termék eltarthatóságával, és garantálja a fogyasztó felé a termék biztonságosságát [16].

A húskészítmények szennyeződése a dolgozók szennyezett kezétől, szennyezett tárolóedényektől, nem sterilizált fűszerektől és hagymától származik. A 2. ábra a különböző tartósítószer hatását mutatja az élesztő növekedésére nyers húskészítményekben a tárolás során.

1 CFU/g = telepképző egység grammonként

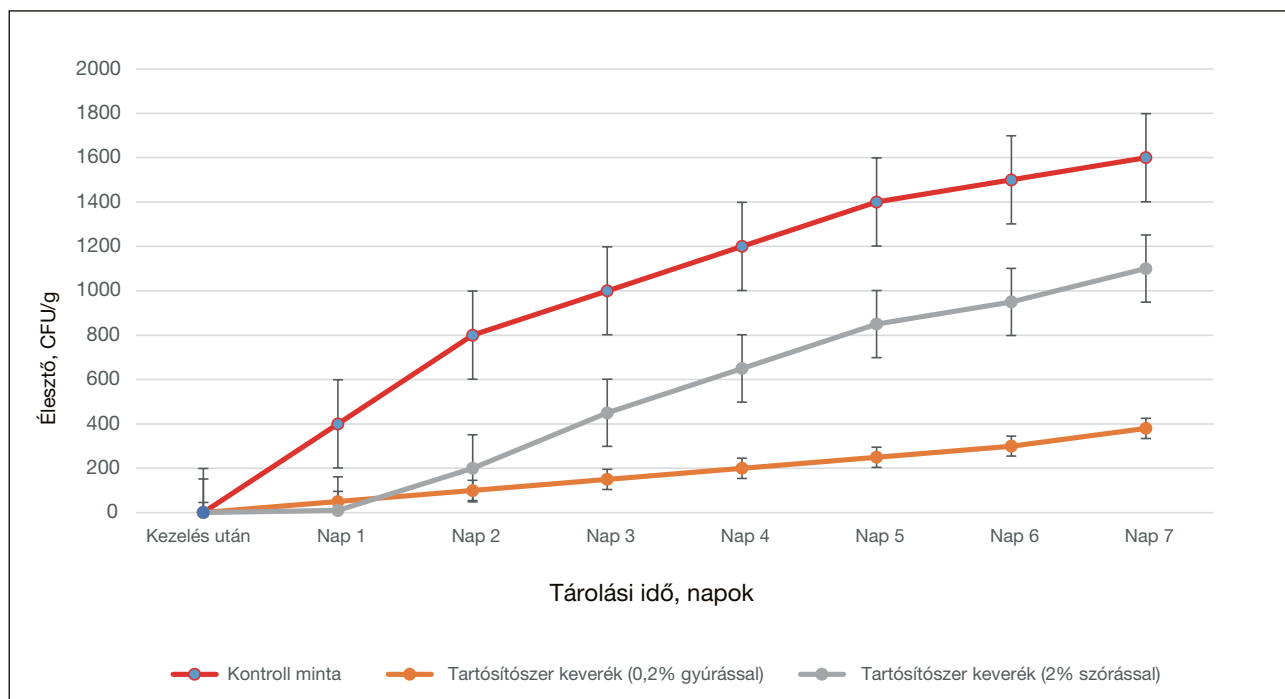


2. ábra. Különbféle tartósítószer hatása az élesztő növekedésére friss sertéskarajban a tárolás során

Kutatási eredményeink szerint a klasszikus tartósítószer (tejsav, ecetsav és nátrium-acetát) gyenge hatással bírnak az élesztő növekedésére és szaporodására a nyers sertéshús tárolása során. Az élesztő gyors szaporodása friss sertéskarajban a 2. napon indul meg, és a 7. napon éri el csúcserősségét, 1.600 CFU/g-ot (kontrollminta). A tartósítószer keverék vegyületeinek alkalmazása azonban lehetővé teszi az élesztő szaporodásának aktív visszaszorítását a friss sertéshúsból készült termékek hosszú távú tárolása során (250 CFU/g).

A kapott adatok megerősítik, hogy a tartósítószer keverék nemcsak hatékonyan gátolja az élesztőgombák szaporodását, hanem egyértelmű antimikrobiális aktivitást is mutat a mikroorganizmusok széles körével szemben.

A durvára vágott friss sertéshús mikrobiológiai mutatóinak tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a sós lében áztatott hússzeletek felületén az élesztőtartalom több százszorosa a belső szövetekben mért értékeknek. Ennek ismeretében nyilvánvaló, hogy leginkább a hús felületét, valamint a sós lében lévő összetevőket kell kitenni a tartósítószer hatásának. Ennek az állításnak az igazolására azonos receptúra szerint készített nyers sertéshúsok mikrobiológiai mutatóit hasonlítottuk össze, amelyek a tartósítószer alkalmazásának módjában különböztek. Az egyik mintában a tartósítószer oldat formájában fecskendővel alkalmazták, egy másikban pedig folyadék formában, összekeverve hagymával és páclével, majd a húsba masszírozva. A kontrollmintát tartósítószer nélkül készítettük el. A kísérleti eredményeket a **3. ábra** mutatja.



3. ábra. A tartósítószer alkalmazási módjának hatása az élesztő növekedésére friss sertéskarajban

A masszírozást „Metat master” húspácoló gépben végeztük, a kiválasztott keverőprogram szerint. A keverési paraméterek az **1. táblázatban** láthatók.

1. táblázat. Keverési paraméterek

Paraméter	Érték
Keverés időtartama	2–3 óra
Keverési mód (forgás / szünet)	20/10 perc
A henger forgási sebessége	8 rpm
Érlelés	10 óra
A keverő terhelési tényezője	0,6
Vákuum mélység	80–90%

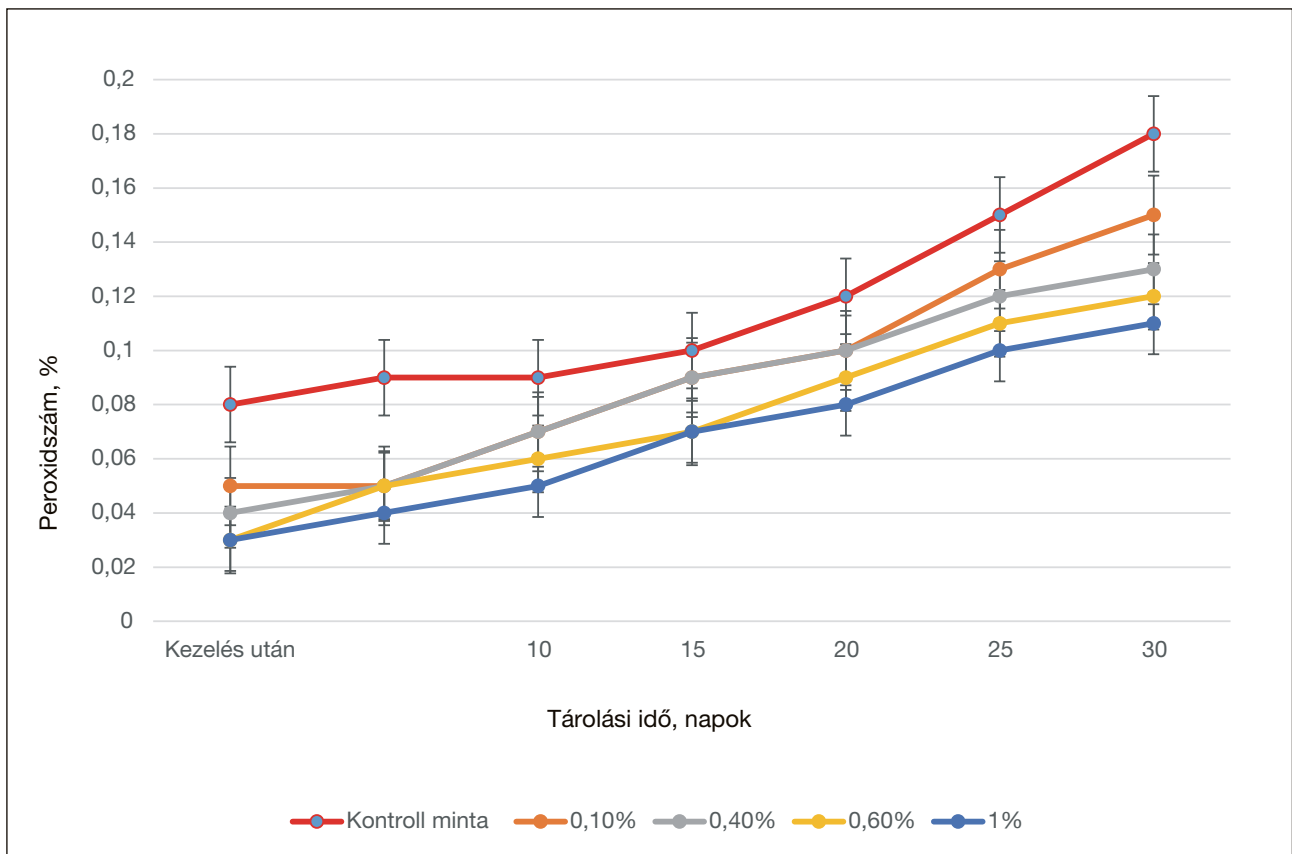
Így ennél a mintatípusnál a legracionálisabb módszer a tartósítószer alkalmazására a nyers hússzeletekkel történő összekeverés és bemasszírozás (például fűszerekkel vagy pácokkal együtt). Ebben az esetben egyszerre két pozitív hatás érhető el: az élesztő által érintett területeken nő a tartósítószer koncentrációja, és a tartósítószer össz mennyisége a termékben csökken, ami mind a fogyasztók egészségére vonatkozó termékbiztonság, mind gazdasági szempontból előnyt jelent.

A tartósítószer keverékkel tartósított termék eltarthatósági ideje növekedésének vizsgálatát különböző időpontokban végeztük el (5-30 nap) úgy, hogy 5 naponta megmértük az elsődleges és másodlagos lipidbomlási termékeket, valamint meghatároztuk a peroxid- és savszámot [17].

Az élelmiszer-adalékanyagot különböző koncentrációkban alkalmaztuk (0,1%, 0,4%, 0,6% és 1%).

A kapott adatok alapján meghatároztuk a minták peroxidszám (PN) értékének függését a termék tárolási időtartamától (**4. ábra**).

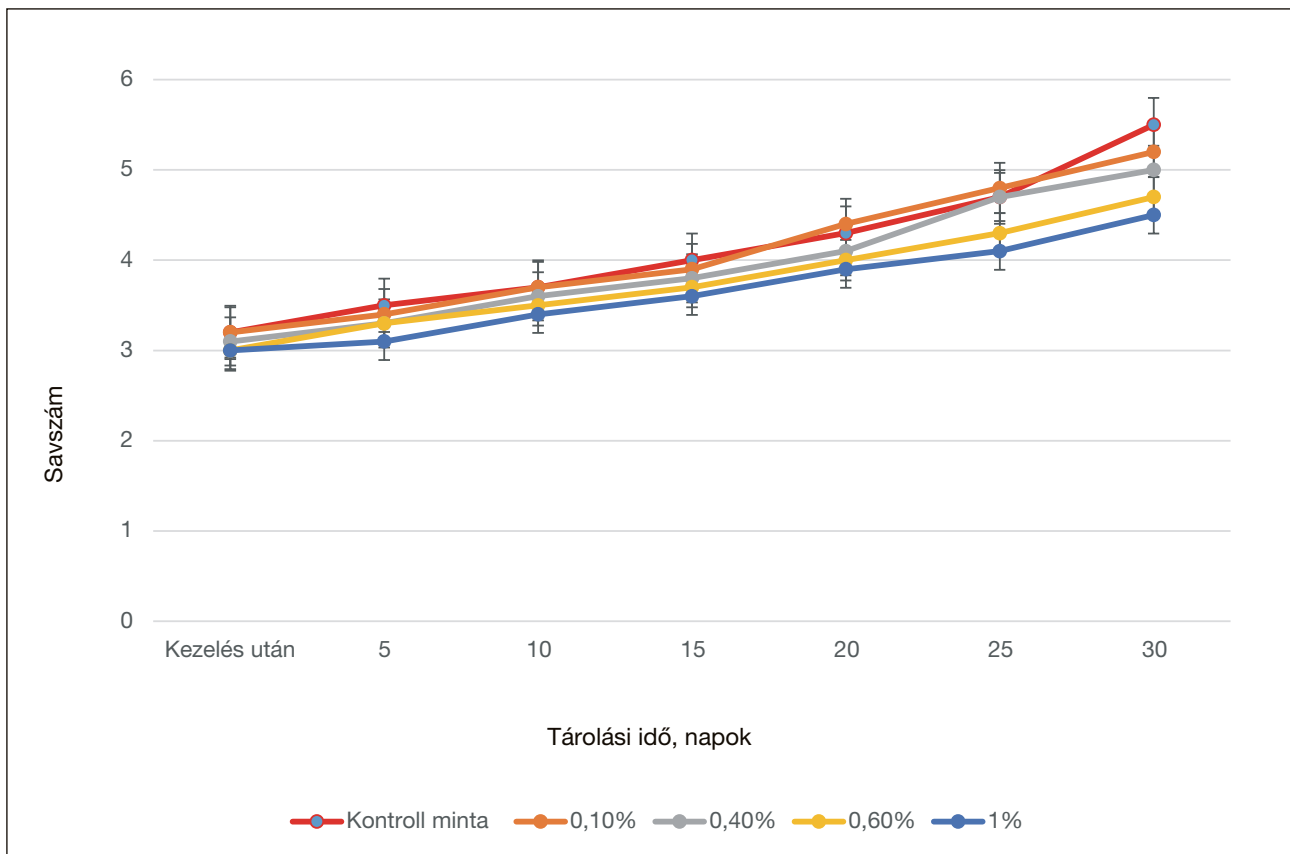
A tartósítószer keverék dózisától függően a PN értékek változnak, de minden esetben az idő múlásával növekvő tendencia figyelhető meg. A legmagasabb mértéket a kontrollmintában mutattuk ki. Az oxidációs folyamatok legalacsonyabb arányát a 0,6% illetve 1% tartósítószerrel tartalmazó mintákban figyeltük meg, és ezek szignifikáns eltérést mutattak a kontrollmintától.



4. ábra. Elsődleges oxidációs termékek felhalmozódása friss sertéskarajban a tárolás során

A 10. napon minden tartósítószer keveréket tartalmazó minta PN értéke meredek (átlagosan 1,6-szeres) emelkedést mutatott, ami a pácban található ecetsav és az antioxidáns (dihidrokvercetin) kölcsönhatását idézi elő, ami a savasság eltolódásával jár együtt a lúgos tartomány felé. A tárolás 15. napján a PN érték fokozatosan tovább növekszik, és az élelmiszer-adalékanyag hatóanyaga a teljes tárolási idő alatt gátolni kezdi a lipid peroxidációt, szignifikáns eltéréseket mutatva a kontrollmintától. 30 nap tárolás után a kontrollmintában az oxidációs folyamatok észrevehető növekedése figyelhető meg, így ezt választottuk a friss hús eltarthatóságának végpontjává. Az antioxidáns aktivitás azonban lehetővé teszi a termék tárolási stabilitásának növelését.

Hasonló dinamika figyelhető meg a savszám változásában (5. ábra).



5. ábra. A savszám változása a termék teljes eltarthatósága alatt

A túlzott savasságú oxigéntartalmú termékek a nedvességveszteség miatt rontják a hús minőségét. A húskészítmények mérsékelt savassága viszont kisebb mértékben rontja a termék minőségét, így az lédús marad. Ezenkívül a tartósítószer keverékben található antioxidáns lehetővé teszi az eltarthatóság növelését.

5. Következtetések

Kutatásunk újszerűségét elméletileg igazoltuk, és kísérletileg megerősítettük az élelmiszer-adalékanyag tartósítószer keverék vegyületeinek magas teljesítményét a nyers sertéshús gyártása során. Az adalékanyag alkalmazása lehetővé teszi a húskészítmények hőkezelése és tárolása során fellépő veszteségek csökkentését, a hozam növelését és az állag javítását, valamint az előállítási költségek csökkentését és az eltarthatósági idő növelését akár 30 napra. Ezt az eredményt a legújabb, széles spektrumú antimikrobiális tartósítószer keverék alkalmazása biztosítja. A készítmény jelentős baktériumölő hatással rendelkezik, gátolja az élesztőgombák növekedését és fejlődését. A készítmény alkalmazásának legracionálisabb módja egy húsrendszerben az, ha összekeverjük a termékkel, és belemasszírozzuk abba (például fűszerekkel vagy pácokkal). Mivel a tartósítószer tartalmazza a természetes antioxidáns dihidrokvercint, a készítmény előnyösen alkalmazható magas zsírtartalmú termékek esetén a lipidfrakció tárolás közbeni oxidációjának megelőzésére. A készítmény optimális koncentrációja a húsrendszerben 0,6-1 tömegszázalék. Magasabb koncentrációk a végtermék magasabb árához vezetnek. Ugyanakkor a bio-tartósítószer 0,6 tömegszázaléknál kisebb koncentrációja csökkenti a termék tárolási stabilitását és ellenállást a mikrobiális romlással szemben.

6. Összeférhetetlenség

Kijelentjük, hogy nincsen olyan pénzügyi és személyes kapcsolatunk más személyekkel vagy szervezetekkel, amelyek elfogadhatatlan módon befolyásolhatnák munkánkat, és semmilyen termékhez, szolgáltatáshoz és/vagy céghez nem fűződik semmilyen szakmai vagy egyéb személyes érdekünk, amely befolyásolhatná ennek a cikknek a tartalmát.

7. Köszönetnyilvánítás

A munkát az Oroszországi Föderáció kormányának 211. számú törvénye támogatta, szerződészsám: 02.A03.21.0011.

8. Irodalom

- [1] Saucier, L. (2016): Microbial spoilage, quality and safety within the context of meat sustainability. *Meat Science*, 120, pp. 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.027>
- [2] Huffman, R. D. (2002): Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Science*, 62, pp. 285–294. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00120-1](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00120-1)
- [3] Zhang, H. Z., Wu, J., Guo, X. (2015): Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*, 5, pp. 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.11.003>
- [4] Chen, J. H., Ren, Y., Seow, J., Liu, T., Bang, W. S., Yuk, H. G. (2012): Intervention Technologies for Ensuring Microbiological Safety of Meat: Current and Future Trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, pp. 119–132.
- [5] Naveena, B. M., Sen, A. R., Vaithyanathan, S., Babji, Y., Kondaiyah, N. (2008): Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80, pp. 1304–1308. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.005>
- [6] Aymerich, T., Picouet, P. A., Monfort, J. M. (2008): Meat decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, pp. 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.007>
- [7] Lucera, A., Costa, C., Conte, A., Del Nobile, M. A. (2012): Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3, pp. 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>
- [8] Russell, S. M. (2009): *Understanding poultry spoilage*. Available at: <http://www.wattagnet.com/articles/4207-understanding-poultry-products-spoilage>. Last accessed 14th April 2017.
- [9] Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G. E. (2012): Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *The International Journal of Food Microbiology*, 157, pp. 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- [10] Soladoye, O. P., Juárez, M. L., Aalhus, J. L., Shand, P., Estévez, M. (2015): Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, pp. 106–122. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12127>
- [11] Thomas, C. J., O'Rourke, R. D., McMeekin, T. A. (1987): Bacterial penetration of chicken breast muscle. *Food Microbiology*, 4(1), pp. 87–95. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(87\)90022-0](https://doi.org/10.1016/0740-0020(87)90022-0)
- [12] Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., Griffin, P. M. (2011): Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, pp. 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- [13] Waites, W. M. (1998): The microbiology of meat and poultry. *Meat Science*, 50(1), p. 137. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(98\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00009-6).
- [14] Antipova, L. V., Glotova, I. A., Rogov, I. A. (2001): *Meat and meat products research methods*, Moscow, Kolos, pp. 376.
- [15] Skurikhin, I. M., Tutelyan, V. A. (1998): *Guide to methods for analysis of food quality and safety*. Moscow, Brandes, Medicine, pp. 342.
- [16] Viljoen, B. C., Geornaras, A., Lamprecht, A., Holy, A. (1998): Yeast populations associated with processed poultry. *Food Microbiology*, 15, pp. 113–117. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0137>
- [17] Aminzare, M., Hashemi, M., Ansarian, E., Bimkar, M., Azar, H. H., Mehrasbi, M. R., Daneshamooz, S., Raeisi, M., Jannat, B., Afshari, A. (2019): Using Natural Antioxidants in Meat and Meat Products as Preservatives: A Review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7, pp. 417–426.

Effect of a compound bio-preservative on microbiological indicators and shelf life of fresh pork chops

Keywords: preservative, antioxidant, fresh meat products, total viable count, yeast, shelf life, storage, microbiology

1. SUMMARY

The article deals with the study of the effect that a compound preservative produces on microbiological indicators and shelf life of fresh pork products. The effect of various preservatives on the total viable count and yeast growth in fresh meat during storage was studied. Experimental studies have shown that the compounds of additive a preservative mixture* actively inhibits microorganism growth during the fresh pork chops storage. In the control sample, the number of microorganisms on the seventh day of storage was $12 \cdot 10^4$ CFU/g, and, in the sample with the compound additive preservative mixture added, it amounted to $0.1 \cdot 10^4$ CFU/g. The usage of the ready to use preservative mixture allows actively suppressing the yeast reproduction during long-term storage (seven days) of coarsely chopped fresh pork products (250 CFU/g). The optimal method for applying the preservative to fresh pork chops has been determined. Applying the preservative to coarsely chopped fresh meat by simply mixing and massaging (for example, together with spices or marinades) is the most rational method for this product type. Primary and secondary lipid degradation products are considered, and the peroxide and acid numbers of fresh meat products during 30-day storage are determined. After 30 days of storage, a noticeable increase in oxidative processes in the control sample is observed, whereby the end point of the shelf life of coarsely chopped fresh pork products has been chosen.

**We have to negligate the trade mark name of the preservative mixture by the law of advertisement (The Ed.)*

¹ South Ural State University

² South Ural State Agrarian University

³ LLC "Antey"

2. Introduction

The problem of efficient preservation of food and raw materials at all stages of their production, storage, transportation and trade, including home food preservation, appears highly relevant today. According to some estimates, up to 25% of the world's food produced is susceptible to the damaging effects of mold alone [1].

Current methods for preserving food products and preventing their microbiological spoilage are divided into three groups: physical, chemical, and biological ones. Physical methods include temperature (thermal and refrigeration) exposure, drying, vacuuming, etc. Chemical methods comprise salting, smoking, brining, the use of preservatives, etc. Biological ones consist in the treatment with starter and bioprotective cultures, the use of bactericides, enzyme preparations, etc [2, 3]. Each of these methods has certain limitations in the production of a particular product due to their impact on organoleptic properties and nutritional values as well as technical feasibility (for example, need for the required equipment, scarcity of the substances or preparations used). Of all the known methods for preventing microbiological spoilage, chemical preservatives are considered the most easily applicable, quickly feasible, not requiring special equipment and/or changing the manufacturing method [4, 5]. However, the meat industry is rather conservative in terms of the use of food additives, due to the fact, that chemical preservatives are allowed in the production of meat products only in limited quantities, mainly in the manufacture of jellied products and for surface treatment [6]. In addition, consumers overwhelmingly have a negative attitude to meat, labelled as containing preservatives. In this regard, the use of chemical preservatives in the production of meat products is significantly limited and cannot be regarded as universal means to prevent microbiological spoilage.

In Russia, the consumption level and production of pork has been growing rapidly recently. At that, the meat industry is dominated by pork nowadays. Pork production increased by 23% in 2020.

Pork is also a source of complete animal protein and has a high nutritional value. In addition, pork meat contains vitamins, macro- and microelements necessary for a comprehensive development of the human body [7].

For all health benefit properties to be maximally preserved, the rules of processing, transportation and storage of meat have to be observed. According to the Sanitary Rules and Norms SanPiN 2.3.2.1078-01 and Technical Regulations of the Customs Union TRCU 034/2013 "On the safety of meat and meat products", pork belongs to the category of perishable goods.

If the storage conditions and terms are violated, the growth and reproduction of microorganisms in fresh pork significantly accelerates, which leads to an increase in bacterial contamination. Under favorable conditions, microorganisms accumulate on the surface and gradually penetrate deep into the meat, causing the product spoilage. During storage, meat loses its positive properties, its organoleptic, physical and chemical parameters deteriorate significantly, and the risk of harm to human health increases due to the vital activity of pathogenic microbial flora. There are several types of meat spoilage: putrefaction, slime production, mold formation, acid fermentation (meat souring), etc. The intensity of these processes depends on temperature, relative humidity, microorganism type, and the degree of initial meat contamination [8].

Putrid spoilage is most often found when storage conditions are violated. Putrefactive microflora causes meat spoilage. Putrefactive microorganisms can be both aerobic and anaerobic. They are able to secrete protease enzymes that break down proteins. These microorganisms include aerobic bacilli (*B. pyocyaneum*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. megatherium*), anaerobic clostridia (*Cl. putrificus*, *Cl. histolyticus*, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*) and facultative anaerobic cocci. The end products of aerobic putrefaction are ammonia, carbon dioxide, hydrogen sulfide, and mercaptans. Each of these compounds can cause harm to a human body, which manifests as a serious intoxication [9].

Anaerobic putrefaction of pork can occur without oxygen. Therefore, even vacuum packing will not protect the meat from spoilage if storage temperature requirements are violated. The end products of anaerobic putrefaction are the products of decarboxylation of amino acids causing the formation of off-odour substances, such as indole, skatol, phenol, cresol, diamines. Their derivatives are cadaveric poisons (cadaverine, putrescine, etc.); they are toxic to humans and can cause death [10].

Slime production is a result of slime-forming microorganisms (lactic acid bacteria, yeast, and micrococci) proliferating and partially dying off on the pork meat surface. The meat storage at a temperature of 18 to 25 °C and high humidity contribute to slime production. However, some microorganisms that cause slime formation can develop even at sub-zero temperatures. During sliming, the meat surface becomes sticky, acquires a gray-green hue and a stale off-odour, the pH of the meat surface layers is 5.2 to 5.3. It is important to distinguish between slime production and the initial stage of putrefaction, as each is caused by a completely different microflora [11].

Another equally dangerous type of meat spoilage is mold formation, which occurs when microscopic fungi develop on the surface during long-term storage of the product. When mold grows, the meat quality decreases because of protein hydrolysis and deamination of amino acids. The fungi most often found on the meat surface are *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium*. They are able to grow at low temperatures (in the refrigerators). These fungi produce mycotoxins, cause food spoilage, allergic reactions and various diseases in humans [12, 13].

The goal of this paper is investigating the effect of the compounds of food additives in the preservative mixture (detailed in the section 3.1.) on the resistance of fresh pork to microbiological spoilage during storage.

3. Materials and methods

3.1. Research objects

The research objects in this paper are the follow items:

- Coarsely chopped fresh pork (with a fat content of not more than 15% by weight)
- The compounds of food additive preservative mixture. The content of ready to use mixture are potassium sorbate (E202), sodium acetate (E262), sodium benzoate (E211), glycerin (E422), carboxymethylcellulose (E466) and an antioxidant (dihydroquercetin). The additive is manufactured by a research and manufacturing association Russia
- Lactic acid
- Acetic acid
- Sodium acetate (E262)

3.2. Research methodology

The total viable count and the amount of yeast were determined by plating the product onto agar plates with culture media, allowing microorganisms to grow and counting all individual colonies.

The peroxide value and acid value were found using the standard methods [14, 15]. Method for determining the peroxide value is based on the reaction of the oxidation products of animal fats (peroxides and hydroperoxides) with potassium iodide in a solution of acetic acid and isooctane or chloroform, followed by quantitative determination of the released iodine with a solution of sodium thiosulfate using a titrimetric method. The method for determining the acid value is based on the dissolution of a sample in a mixed solvent, and titration of free fatty acids with a solution of potassium hydroxide.

All analyses were repeated in triplicate unless otherwise stated and the average values were calculated. The results are expressed as the mean value \pm standard deviation. Significant differences between the mean values at significance level $p < 0.05$ were identified using the one-way analysis of variance and Student's test. Microsoft Excel version 2010 was used as the statistical analysis software.

4. Results and discussion

To identify the functional properties of preservative mixture, tests were carried out on chilled pork in comparison with control samples and the most common substances having a preservative effect (lactic acid, acetic acid and sodium acetate). A comparative assessment of microbiological indicators in meat products was carried out, wherefore the quantities of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (MAFAM) were monitored for 7 days at a temperature of 8 to 10 °C. The experimental results are shown in **Figure 1**.

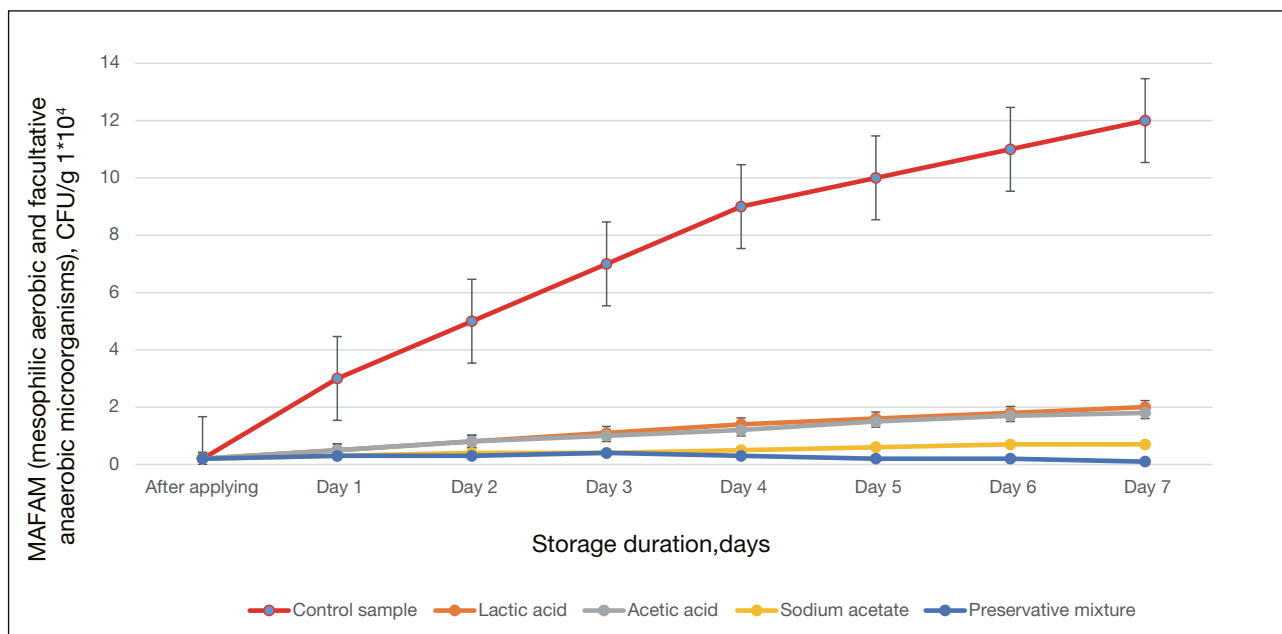


Figure 1. Effect of various preservatives on the total viable count of fresh pork chops during storage

The most common indicator of meat chops spoilage is natural acid fermentation. As a rule, acid fermentation develops in muscle tissue rich in glycogen. The main signs of the process are a sour off odour, gray or greenish hue, a decrease in the tissue elasticity and, as a result, a loose consistency. The causative agents of the defect are psychrotrophic lactic acid bacteria and yeast fungi, which ferment carbohydrates to form organic acids, as well as gases (carbon dioxide and, in some cases, hydrogen). In addition to meat carbohydrates, chopped meat products also contain carbohydrates that come from onions, marinades and other ingredients. These carbohydrates located in the brine between pork cuts are a favorable medium for pathogens of acid fermentation to develop.

Our experimental studies have shown that the selected preservatives actively inhibit microbial growth during storage. Thus, on day 7, the microbial content in the control sample was $12 \cdot 10^4$ CFU/g¹, in the sample with lactic acid added was $2 \cdot 10^4$ CFU/g, in the sample with acetic acid added was $1.8 \cdot 10^4$ CFU/g, in the sample with sodium acetate added was $0.7 \cdot 10^4$ CFU/g, and in the sample with the compounds of preservative mixture added was $0.1 \cdot 10^4$ CFU/g.

Preventing the yeast development in meat chops is an important component of raw meat manufacturers' success, as it directly relates to the shelf life of the product and guarantees its safety for the consumer [16]. The contamination of meat products results from contaminated workers' hands, storage containers, unsterilized spices and onions. **Figure 2** shows the effect that various preservatives produce on the yeast growth in raw meat during storage.

1 CFU/g = a colony-forming unit per gram

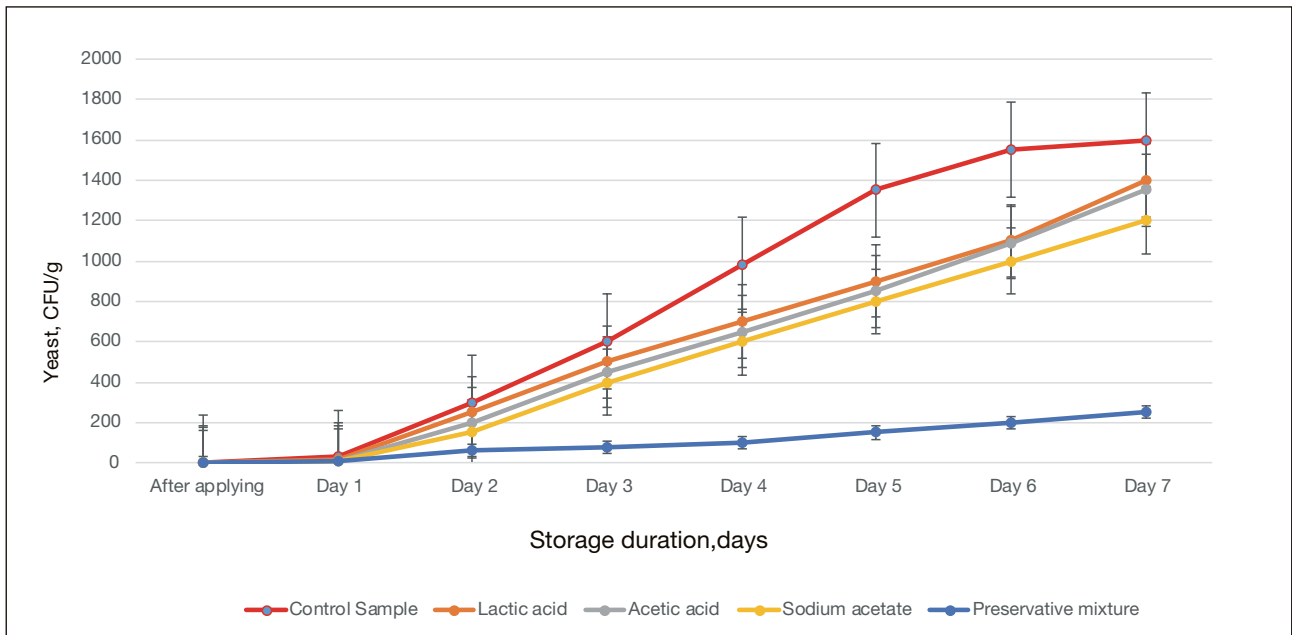


Figure 2. Effect of various preservatives on the yeast growth in fresh pork chops during storage

According to the research results, the classical preservatives (lactic acid, acetic acid and sodium acetate) have a weak effect on the growth and reproduction of yeast during raw pork storage. The fast growth of yeast in fresh pork chops starts on day 2 and reaches its peak value of 1600 CFU/g (control sample) on day 7. However, the use of the compounds of the preservative mixture allows actively suppressing the yeast reproduction during long-term storage of fresh pork products (250 CFU/g).

The data obtained confirm that the preservative mixture not only effectively inhibits the growth of yeast, but also exhibits a clear antimicrobial activity against a wide range of microorganisms.

On studying the microbiological indicators of coarsely chopped fresh pork, it was found that the yeast content on the brined meat cuts surface is hundreds of times higher than in the internal tissue. Given this fact, it is obviously the meat surface as well as the ingredients in the brine that should mostly be exposed to preservatives. In order to verify this statement, the microbiological indicators of raw pork prepared according to the same recipe, but using different methods for applying the preservative, were compared. In one sample, the preservative was applied with a syringe solution; in another one, it was added in a liquid form, being mixed with onions and marinade and then massaged. The control sample was prepared without any preservatives. The experimental results are shown in **Figure 3**.

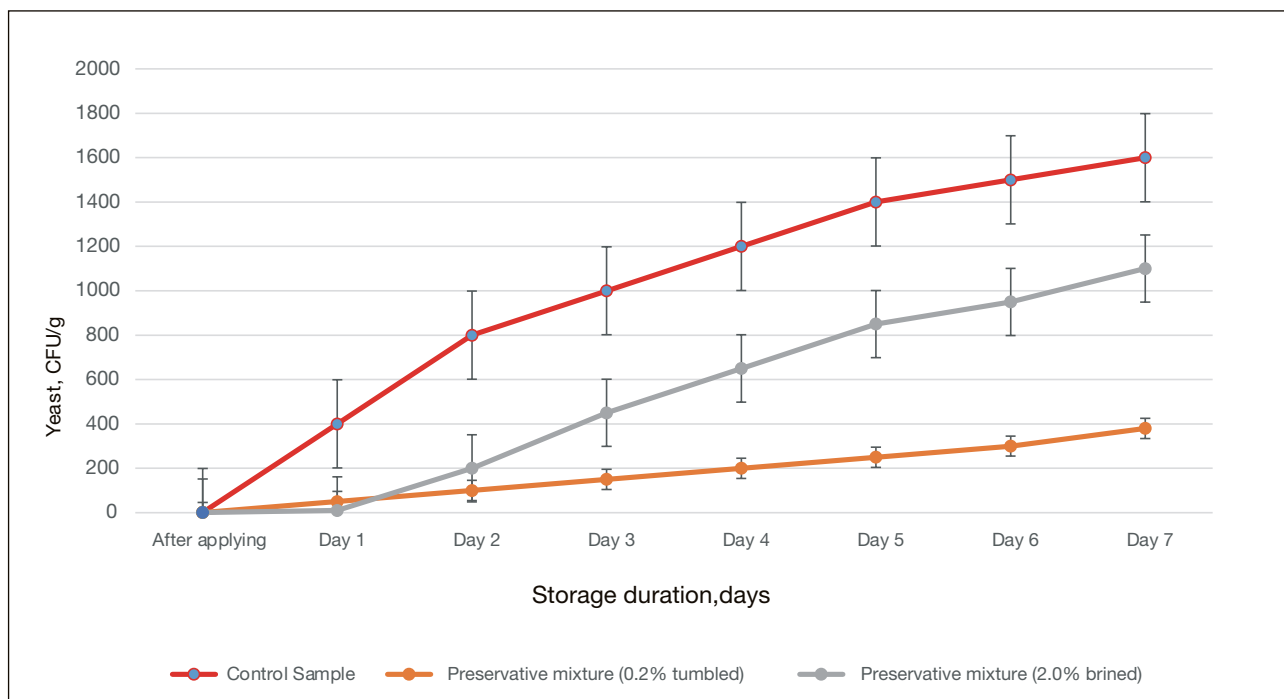


Figure 3. Effect of the method of applying a preservative on the yeast growth in fresh pork chops

Massaging was carried out in a meat tumbler “Metat master” in accordance with the tumbling program selected. Tumbling parameters are shown in **Table 1**.

Table 1. Tumbling parameters

Parameter	Value
Tumbling duration	2–3 hours
Tumbling mode (rotation / pause)	20/10 min
Cylinder rotation rate	8 rpm
Maturation	10 hours
Load factor of the tumbler	0.6
Vacuum depth	80–90%

Thus, applying a preservative to raw meat chops by simply mixing and massaging (for example, together with spices or marinades) is the most rational method for this product type. In this case, two positive effects are achieved simultaneously: the preservative concentration in the area affected by yeast increases and the total amount of the preservative in the product decreases, which provides advantages from the points of view of both product safety for consumer health and economic benefit.

The study of the increase in the shelf life of the product preserved using the preservative mixture was carried out at various time periods (from 5 to 30 days), every 5 days the amounts of primary and secondary lipid degradation products being measured and peroxide and acid numbers being determined [17].

The food additive was applied with different mass concentrations (0.1%, 0.4%, 0.6% and 1%).

Based on the data obtained, the dependence of the peroxide number (PN) values of the samples on the product storage duration was determined (**Figure 4**).

Depending on the dosage of the preservative mixture, the PN values vary, but in all options the increasing dynamics is observed over time. The highest rate is detected in the control sample. The lowest oxidative processes are observed in the samples containing 0.6% and 1% of the preservative and having significant differences with the control sample.

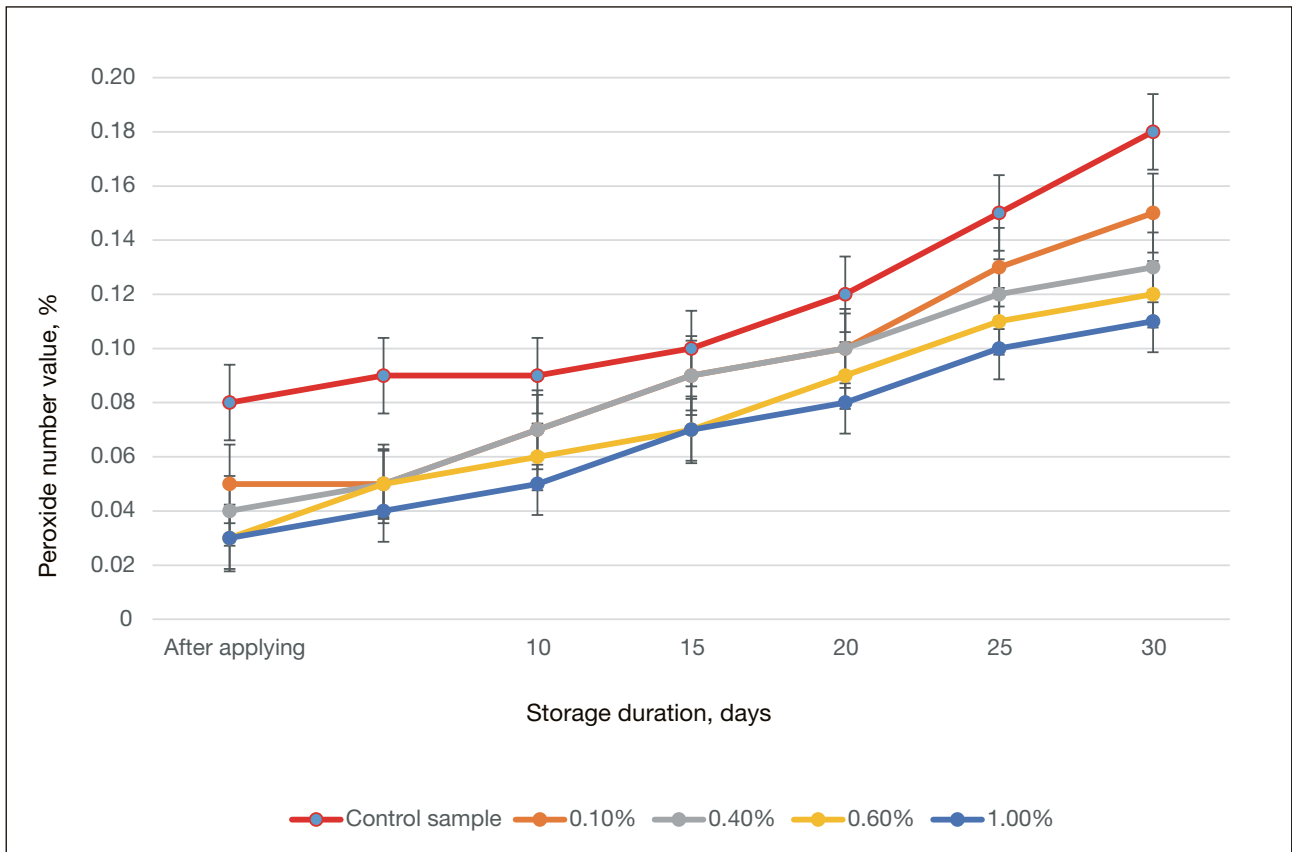


Figure 4. Accumulation of primary oxidation products in fresh pork chops during storage

On day 10, all samples containing preservative mixture exhibit a sharp increase in the PN values (1.6 times on average), which causes the interaction of acetic acid contained in the marinade with the antioxidant (dihydroquercetin), accompanied by a shift in acidity towards the alkaline side. On day 15 of storage, the PN value continues to gradually increase, and the active substance of the food additive begins inhibiting lipid peroxidation throughout the storage period, demonstrating significant differences with the control sample. After 30 days of storage, a noticeable increase in oxidative processes in the control sample is observed, whereby the end point of the shelf life of fresh meat has been chosen. However, the antioxidant activity allows increasing the product storage stability.

Similar dynamics are observed in the acid number variation (**Figure 5**).

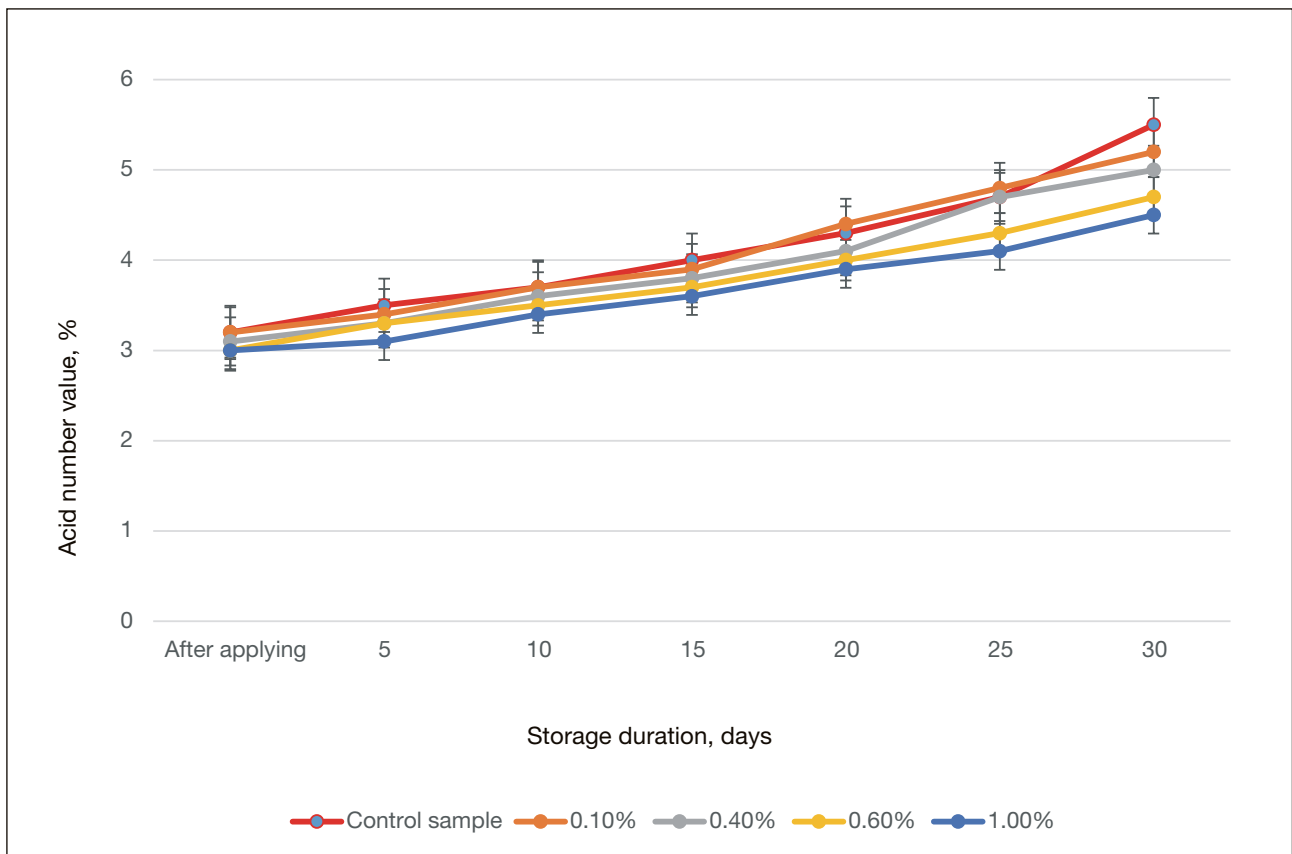


Figure 5. Acid number variation over the entire product shelf life

Oxygenated products with excessive acidity reduce meat quality due to moisture loss. In turn, moderate acidity of meat products reduces the product quality to a lesser degree, so it remains juicy. In addition, the antioxidant contained in preservative mixture allows increasing the shelf life.

5. Conclusions

The novelty of this research is theoretically justified, and a high performance of the compounds of food additive preservative mixture in manufacturing raw pork is experimentally confirmed. Applying the additive allows reducing losses during heat treatment and storage of the meat products, increasing yield and improving consistency, as well as reducing the cost of production and increasing the shelf life of up to 30 days. This result is ensured by the use of the latest broad-spectrum antimicrobial preparation of preservative mixture. The preparation has a significant bactericidal effect and inhibits the growth and development of yeast. The most rational way to apply the preparation into a meat system is to add it to the product by simply mixing and then massaging (for example, with spices or marinades). As the preservative contains the natural antioxidant dihydroquercetin, the preparation can be used to good advantage for products with a high fat content to prevent the lipid fraction oxidation during storage. The optimal concentrations of the preparation in the meat system is from 0.6% to 1% by weight. A higher concentration will lead to a higher price of the end product. Meanwhile, a concentration of the bio-preservative less than 0.6% by weight will reduce the product storage stability and its resistance to microbial spoilage.

6. Conflicts of interest

We declare that we have no financial and personal relationships with other people or organizations that can inappropriately influence our work, there is no professional or other personal interest of any nature or kind in any product, service and/or company that could be construed as influencing the content of this paper.

7. Acknowledgement

The work was supported by Act 211 of the Government of the Russian Federation, contract № 02.A03.21.0011.

8. References

- [1] Saucier, L. (2016): Microbial spoilage, quality and safety within the context of meat sustainability. *Meat Science*, 120, pp. 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.027>
- [2] Huffman, R. D. (2002): Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Science*, 62, pp. 285–294. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00120-1](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00120-1)
- [3] Zhang, H. Z., Wu, J., Guo, X. (2015): Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*, 5, pp. 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.11.003>
- [4] Chen, J. H., Ren, Y., Seow, J., Liu, T., Bang, W. S., Yuk, H. G. (2012): Intervention Technologies for Ensuring Microbiological Safety of Meat: Current and Future Trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, pp. 119–132.
- [5] Naveena, B. M., Sen, A. R., Vaithyanathan, S., Babji, Y., Kondaiah, N. (2008): Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80, pp. 1304–1308, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.005>
- [6] Aymerich, T., Picouet, P. A., Monfort, J. M. (2008): Meat decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, pp. 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.007>
- [7] Lucera, A., Costa, C., Conte, A., Del Nobile, M. A. (2012): Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3, pp. 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>
- [8] Russell, S. M. (2009): *Understanding poultry spoilage*. Available at: <http://www.wattagnet.com/articles/4207-understanding-poultry-products-spoilage>. Last accessed 14th April 2017.
- [9] Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G. E. (2012): Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *The International Journal of Food Microbiology*, 157, pp. 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- [10] Soladoye, O. P., Juárez, M. L., Aalhus, J. L., Shand, P., Estévez, M. (2015): Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, pp. 106–122. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12127>
- [11] Thomas, C. J., O'Rourke, R. D., McMeekin, T. A. (1987): Bacterial penetration of chicken breast muscle. *Food Microbiology*, 4(1), pp. 87–95. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(87\)90022-0](https://doi.org/10.1016/0740-0020(87)90022-0)
- [12] Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., Griffin, P. M. (2011): Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, pp. 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- [13] Waites, W. M. (1998): The microbiology of meat and poultry. *Meat Science*, 50(1), p. 137. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(98\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00009-6).
- [14] Antipova, L. V., Glotova, I. A., Rogov, I. A. (2001): *Meat and meat products research methods*, Moscow, Kolos, pp. 376.
- [15] Skurikhin, I. M., Tutelyan, V. A. (1998): *Guide to methods for analysis of food quality and safety*. Moscow, Brandes, Medicine, pp. 342.
- [16] Viljoen, B. C., Geornaras, A., Lamprecht, A., Holy, A. (1998): Yeast populations associated with processed poultry. *Food Microbiology*, 15, pp. 113–117. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0137>
- [17] Aminzare, M., Hashemi, M., Ansarian, E., Bimkar, M., Azar, H. H., Mehrasbi, M. R., Daneshamooz, S., Raeisi, M., Jannat, B., Afshari, A. (2019): Using Natural Antioxidants in Meat and Meat Products as Preservatives: A Review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7, pp. 417–426.

MTA Élelmiszeranalitika és -minőség Munkabizottság hírei

2022 II. negyedévi (április 22.) ülésén elhangzott előadások rövid összefoglalói

Téma: Szénhidrátanalitika és -minősítés

Gabonák rost és kismolekulaméretű szénhidrát összetételének jellemzése lehetőségek és kihívások az elválasztástechnika szemszögéből

Schall Eszter, Juhászné Szentmiklóssy Marietta Klaudia, Tömösközi Sándor
(Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és
Élelmiszertudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszermínőség Kutatócsoport)

A növényi alapú élelmiszereinkben a szénhidrátok nem csak táplálkozási (energiaforrás, élelmiszerbiztonság), hanem érzékszervi és technológiai (szerkezet, állag, állomány alakítása, előállítás módja stb.) szempontból is fontos szerepet játszanak. Kutatócsoportunkban intenzíven foglalkozunk a gabonák élelmi rost összetételével, melyek mennyiségi és minőségi jellemzéséről, változékonyságáról, technológiai tulajdonságokban betöltött szerepéről jórészt csak a közönséges búza esetében érhető el részletesebb információ. Emellett a rövid szénláncú szénhidrátok közül a FODMAP-ok (fermentálható oligo-, di-, monoszacharidok és cukoralkoholok) jellemzése is egyre nagyobb hangsúlyt kap a kutatásokban, méghozzá emésztőrendszeri érintő rendellenességekben (irritábilis bélszindróma) beöltött szerepük miatt. Mind a rostok, mind a kismolekulaméretű szénhidrátok analízise komoly kihívást jelent, részben változatos szerkezetük, részben kis mennyiségük miatt. Kutatócsoportunkban az elmúlt években főként az arabinoxilánok mennyiségi és minőségi jellemzésével, a β -glükánok mennyiségi meghatározásával, a gabonákban jellemző mennyiségi és minőségi értelemben vett változékonyságukkal és technológiai szerepük megértésével foglalkoztunk. Emellett a FODMAP összetevők mennyiségi jellemzésére adaptáltunk sikeresen kromatográfias és enzimes módszereket, melyek segítségével a gabonákban jellemző mennyiségéről, fajták, fajok közötti, illetve technológiától függő változékonyságáról és feldolgozás során történő esetleges változásairól tudunk információt szerezni. A közeljövőben a rostalkotó β -glükán és az arabinogalaktán-peptidek mennyiségi és minőségi jellemzésére alkalmas kromatográfias módszerek adaptálásával és továbbfejlesztésével kívánjuk bővíteni eszköztudásunkat.

Szénre szín, számra szám – új lehetőségek a VIS, NIR és MIR spektroszkópia szénhidrátanalitikai alkalmazásában

Slezsák János, Salgó András, Gergely Szilveszter
(Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és
Élelmiszertudományi Tanszék)

Az élelmiszeripari alap- és segédanyagok, illetve közti- és végtermékek vizsgálatára régóta nyújt gyors, roncsolásmentes lehetőséget a rezgési spektroszkópia. Az infravörös spektroszkópia analitikai felhasználása a technika létrejöttékor elsősorban a közép infravörös (*mid-infrared*, MIR) tartományon alapult. [1] Az elmúlt évtizedekben azonban élelmiszerek vizsgálata esetén (illetve lényegében a teljes mezőgazdasági és élelmiszer vertikumban) a közeli infravörös (*near-infrared*, NIR) tartomány volt a domináns, mivel nagyobb energiája lévén a MIR-nél jobban alkalmazható komplex, biológiai eredetű mátrixok esetén, a látható (*visible*, Vis) tartománnyal szemben pedig jelentős kémiai információ nyerhető ki a NIR spektrumokból. Kutatócsoportunk hagyományait [2] követve az elmúlt időszakban a szénhidrát-analitika tárgykörében is végeztünk összehasonlító vizsgálatokat a különböző elektromágneses tartományok (Vis, NIR, MIR) és optikai konfigurációk tekintetében. Ennek része volt a spektrumkönyvtárak építése, melynek során számos tiszta mono-, di- és poliszacharid spektrumát vettük fel diszperziós (*dispersive*, DS), Fourier-transzformációs (*Fourier transform*, FT), illetve diódasoros (*diode-array*, DA) NIR spektrofotométerekkel, hogy a különböző szénhidrátok elnyelési karakterisztikájáról

információt kapjunk. Az eredmények alapján a NIR technikák jó lehetőséget nyújtanak a tiszta szénhidrátok azonosítására, több esetben egymáshoz rendkívül hasonló vegyületek megkülönböztetése is lehetséges (pl. vízmentes vagy hidratált szénhidrátok azonosítása, botanikai eredet meghatározása keményítő esetén). A tiszta rendszerek vizsgálatán túlmenően különböző porkeverékek minősítésére is dolgoztunk ki matematikai modelleket, többek között kereskedelmi forgalomban kapható aromaanyagok hordozóinak (pl. maltodextrin) mennyiségi meghatározására. Kutatásaink egyik rendhagyó szegmense a por állagú (akár egynemű, akár keverék formájú) minták minősítése különböző csomagolóanyagokon keresztül, akár azonosítás, akár mennyiségi meghatározás céljából. Ezen kísérletek eredményei alapján több esetben kidolgozhatónak látszanak olyan NIR alapú technikák, melyek a csomagolás megbontása nélkül teszik lehetővé különböző szénhidrátok minőségi vagy mennyiségi meghatározását. [3, 4] A nemzetközi trendek alapján a Vis és MIR tartomány is egyre komolyabb figyelmet kap, köszönhetően a spektrumfeldolgozás és -kiértékelés terén elért fejlődésnek. A számítástudomány kapcsán elért fejlesztések (mesterséges intelligencia alapú technikák, gépi tanulás, adatfúzió) implementálása az analitikai eredmények értékelésébe a következő évek fontos feladata lesz. Célkitűzéseink között szerepel ezen túlmenően a manapság egyre elterjedtebb, ám megkérdőjelezhető reprodukálhatósággal bíró miniatűrízált infravörös készülékek összehasonlító vizsgálata is.

Irodalom

- [1] Yakov M. Rabkin (1987): Technological Innovation in Science The Adoption of Infrared Spectroscopy by Chemists. Isis 78:1, pp. 31-54.
- [2] Tömösközi S., Lásztity R, Salgó A., Vértessy G. B (2021): 100+10 év a felsőfokú élelmiszertudományi oktatás és a kutatás szolgálatában. Magyar Kémikusok Lapja 76: 10, pp. 286-292.
- [3] Slezsák J., Szabó É., Gergely S., Salgó A. (2018): Measuring of food industrial raw materials via polyethylene packages by NIR spectrophotometers using different optical arrangements. Acta Alimentaria: An International Journal Of Food Science 47:1 pp. 104-112.
- [4] Slezsák J., Szabó É., Besenyő G., Salgó A., Gergely S. (2019): Developing a model system for NIR based identification and quantitative analysis of food additives measured via polyethylene foils [konferencia-előadás]. NIR 2019, Gold Coast, Ausztrália.

Szénhidrátok szerepének azonosítása gabonaalapú élelmiszermátrixok technofunkcionális és érzékszervi tulajdonságainak alakításában

*Németh Renáta, Jaksics Edina, Farkas Alexandra, Fekete Dávid, Tömösközi Sándor
(Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és
Élelmiszertudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszermínőség Kutatócsoport)*

Táplálkozásunkban évezredek óta különféle gabonák szolgálnak fő energiaforrásként, köszönhetően magas szénhidrát tartalmuknak (60-80%). A gabonákban található szénhidrátok fő alkotói poliszacharidok (70-80%), melyek közül kiemelt jelentőségű a keményítő, mint elsődleges tartaléktápanyag. Emellett számottevő mennyiségben fordulnak elő sejtfal alkotó poliszacharidok, mint arabinoxilánok, béta-glükán, cellulóz stb., melyeket összefoglalóan nem-keményítő poliszacharidoknak is nevezünk, és élelmi rostként funkcionálnak. Technológiai szempontból a keményítő és nem-keményítő poliszacharidok tekinthetők a legjelentősebbnek, ugyanis molekulaméretük és szerkezeti felépítésük nagyban meghatározza az oldhatóságukat hidratációjukat, gélképző tulajdonságaikat és ezáltal a közti- és végtermék tulajdonságait, minőségét. A gabonaszemekben kb. 1-2% mennyiségben kisebb méretű szénhidrátok, oligo-, di- és monoszacharidok is jelen vannak, melyek bizonyos mértékben szintén befolyásolhatják a feldolgozási folyamatokat (pl.: fermentáció). Számos célműszer alkalmazható gabonaőrlemények, elsősorban a búza, technológiai (pl.: dagasztási, nyújthatósági, gélképző) viselkedésének vizsgálatára. Példaként említendő a gyors-viszko analízátoros (RVA) és Mixolabos technika, valamint az amilográfos vizsgálat és az esésszámmérés, melyek jól alkalmazhatók szénhidrát összetevők szerepének azonosítására. Az említett műszerek esetében híg liszt-víz szuszpenzióban vizsgáljuk a csirízesezési és gélképző tulajdonságokat. Kivételt képez a Mixolab, melynél összetett tézstamátrixban, együttesen tanulmányozhatjuk a dagasztási és viszkozus viselkedést. A keményítőtulajdonságok vizsgálatával foglalkozó kutatásaink is alátámasztják, hogy a keményítő összetétele (pl.: amilóz-amilopektin aránya) alapvetően befolyásolja a csirízesezési tulajdonságokat (csirízesezési hőmérséklet, csúcsviszkozitás, elfolyósodás mértéke), valamint a gélképzést (végső viszkozitás). Az is megállapítható, hogy az izolált keményítők némiképp eltérően viselkednek a lisztekhez képest, mely arra utalhat, hogy kölcsönhatás alakulhat ki a lisztalkotók között. A nem-keményítő poliszacharidok, elsősorban arabinoxilánok (AX), tulajdonságait is számos kutatási munkánkban vizsgáltuk. Az arabinoxilán molekulák között, szerkezetükből adódóan, redox körülmények között ferulasav csoportokon keresztül keresztkötések létesülhetnek vagy bomolhatnak fel. Eredményeink azt mutatták, hogy megfelelő

oxidatív enzim alkalmazásával (pl.: peroxidáz, piranóz-oxidáz) keresztkötések jöhetnek létre az AX-ok között megnövelve a mátrix (szuszpenzió, tészta) konzisztenciáját és viszkozitását. Mindez alkalmasnak bizonyult például gluténmentes tészta mátrixok állagának javítására. Ezzel szemben hidroxil-gyökös oxidáció az AX-ok depolimerizációjához vezetett, rontva a rendszer technológiai tulajdonságait. A mélyebb összefüggések azonosítására lehetőséget nyújt az egyes alkotók szerepének modell (alkotóra bontott majd újra összeállított) rendszerben történő vizsgálata. Búza alapú rendszerben végzett kísérleteink azt mutatták, hogy síkérháló redukálása majd re-oxidálása során feltételezhető a hozzáadott AX beépülése a síkervázba, ami fontos információ az AX-ok szerkezetépítő szerepének megértése szempontjából a tészta és végtermék mátrixában.

Számos megválaszolatlan kérdés van még a gabonákban található szénhidrátok összetételi és szerkezeti változékonyságával és az ezzel szorosan összefüggő táplálkozástani és technológiai szerepük megértésével kapcsolatosan. Mindez további vizsgálatok elvégzését és módszertani fejlesztéseket tesz szükségessé annak érdekében, hogy elősegítsük a tudatos ételmiszerfejlesztést és a tudományosan megalapozott, hiteles információk átadást a fogyasztók számára.

News of the MTA Working Committee of Food Analysis and Classification

Short summaries of the presentations of 2nd quarter of 2022

Analysis and classification of carbohydrates.

Characterization of fiber and small molecule carbohydrate composition of cereals opportunities and challenges from the perspective of separation techniques

*Eszter Schall, Marietta Klaudia Juhász né Szentmiklóssy, Sándor Tömösközi
(Budapest University of Technology and Economics, Department of Applied Biotechnology
and Food Science, Research Group of Cereal Science and Food Quality):*

In our plant-based foods, carbohydrates play an important role not only in terms of nutrition (energy source, food safety), but also in sensory and technological sense (structure, texture, stocking, way of production, etc.). In our research group we deal intensively with the composition of dietary fibre in cereals. But more detailed information about its quantitative and qualitative characterization, variability, and role in technological properties is only available in the case of common wheat. In addition, the characterization of FODMAPs (fermentable oligo-, di-, monosaccharides and polyols) among short-chain carbohydrates is gaining more and more attention in research due to their role in gastrointestinal disorders (irritable bowel syndrome). The analysis of both fibres and small molecular weight carbohydrates is a serious challenge, partly due to their diverse structure and their small amount. In the recent years, our research group has focused on the quantitative and qualitative characterization of arabinoxylans, the quantification of β -glucans, their quantitative and qualitative variability in cereals and understanding of their technological role. In addition, we have successfully adapted chromatographic and enzymatic methods for the quantitative characterization of FODMAP components. They can be used to obtain information about the typical amount in cereals, their variability between varieties and species, and any changes during processing. In the future, we intend to expand our equipment by adapting and developing chromatographic methods for the quantitative and qualitative characterization of β -glucans and arabinogalactan peptides.

Recent applications and possibilities of VIS, NIR and MIR spectroscopy in carbohydrate analysis

*János Slezsák, András Salgó, Szilveszter Gergely
(Budapest University of Technology and Economics, Department of Applied Biotechnology and Food
Science, Research Group of Cereal Science and Food Quality):*

Vibration spectroscopy provides a fast, non-destructive way to study food industrial raw materials, as well as intermediates and end products. The first analytical applications of infrared spectroscopy were based primarily on the mid infrared (MIR) range. [1] However in recent decades, the near infrared (NIR) range was dominant in the study of food analysis (almost the entire agricultural and food vertical), as it has higher energy, so it can be used better than MIR in case of complex matrices of biological origin, and in contrast to the visible (Vis) range, significant chemical information can be obtained from the NIR spectra. Following the traditions of our research group [2], we have recently carried out comparative studies in the field of carbohydrate analysis with respect to different electromagnetic ranges (Vis, NIR, MIR) and optical configurations. This included the construction of spectral libraries, in which the spectra of several pure mono-, di- and polysaccharides were recorded with dispersive (DS), Fourier transform (FT) and diode-array (DA) NIR spectrophotometers to obtain information on the absorption characteristics of different carbohydrates. Based on the results, NIR techniques provide a good opportunity to identify pure carbohydrates, in several cases it is possible to distinguish highly similar compounds (e.g. identification of anhydrous or hydrated carbohydrates, determination of botanical origin in the case of starch). In addition to the study of pure systems, we have

developed mathematical models for the qualification of various powder mixtures, including the quantification of carriers for commercially available flavorings (e.g. maltodextrin). One of the unusual segments of our research is the qualification of powdered samples (either in homogeneous or mixed form) through different packaging materials, either for identification or quantification. Based on the results of these experiments, in several cases it seems possible to develop NIR based techniques that allows the qualitative or quantitative determination of different carbohydrates without breaking the packaging. [3-4] Based on international trends, the Vis and MIR ranges are also receiving increasing attention due to advances in spectrum processing and evaluation. The implementation of advances in computer science (artificial intelligence based techniques, machine learning, data fusion) in the evaluation of analytical results will be an important task in the coming years. In addition, our objectives include a comparative study of miniaturized infrared devices, which are becoming more widespread today but have questionable reproducibility.

References

- [1] Yakov M. Rabkin (1987): Technological Innovation in Science The Adoption of Infrared Spectroscopy by Chemists. *Isis* 78:1, pp. 31-54.
- [2] Tömösközi S., Lásztity R, Salgó A., Vértessy G. B (2021): 100+10 év a felsőfokú élelmiszertudományi oktatás és a kutatás szolgálatában. *Magyar Kémikusok Lapja* 76: 10, pp. 286-292.
- [3] Slezsák J., Szabó É., Gergely S., Salgó A. (2018): Measuring of food industrial raw materials via polyethylene packages by NIR spectrophotometers using different optical arrangements. *Acta Alimentaria: An International Journal Of Food Science* 47:1 pp. 104-112.
- [4] Slezsák J., Szabó É., Besenyő G., Salgó A., Gergely S. (2019): Developing a model system for NIR based identification and quantitative analysis of food additives measured via polyethylene foils [konferencia-előadás]. *NIR 2019, Gold Coast, Ausztrália*.

Identification of the role of carbohydrates in the development of techno-functional and organoleptic properties of cereal-based food matrices

*Renáta Németh, Edina Jaksics, Alexandra Farkas, Dávid Fekete, Sándor Tömösközi
(Budapest University of Technology and Economics, Department of Applied Biotechnology and Food Science, Research Group of Cereal Science and Food Quality)*

Since ancient times, cereal grains have been the main source of energy in our diet, due to their high carbohydrate content (60-80%). The main constituents of carbohydrates in cereals are polysaccharides (70-80%), of which starch is of primary importance as a primary nutrient reserve. In addition, cell wall-forming polysaccharides such as arabinoxylans, beta-glucan, cellulose, etc., which are collectively referred to as non-starch polysaccharides, are present in significant amounts and function as dietary fibre. From a technological point of view, starch and non-starch polysaccharides are considered to be the most significant, as their molecular size and structure largely determine their solubility, hydration, gelling properties and thus the properties and quality of the intermediate and final products. Cereals also contain 1-2% of smaller carbohydrates, oligo-, di- and monosaccharides, which can also affect processing to some extent (e.g., fermentation). Several specific instruments can be applied to study the technological (e.g. mixing, stretching, gelling) behavior of grain flours, especially wheat. Examples include the rapid visco analyzer (RVA) and Mixolab techniques, as well as amylographic analysis and falling number measurement, which can be applied well to study the role of carbohydrate components. The mentioned instruments test the gelatinisation and gelling properties in a dilute flour-water suspension. An exception is Mixolab, by which mixing and viscous behavior together in a complex dough matrix can be investigated.

Our research on starch properties also confirms that the composition of starch (e.g., amylose-amylopectin ratio) fundamentally influences the gelatinisation properties (gelatinisation temperature, peak viscosity, degree of liquefaction) and gel formation (final viscosity). It can also be noted that isolated starches behave slightly different than flours, which may suggest interactions between flour constituents. The properties of non-starch polysaccharides, primarily arabinoxylans (AX), have also been investigated in our research works several times. Due to their structure, crosslinks can occur or decompose between arabinoxylan molecules through ferulic acid groups under redox conditions. Our results showed that using an appropriate oxidative enzyme (e.g., peroxidase, pyranose oxidase) crosslinks can form between AXs, increasing the consistency and viscosity of the matrix (suspension, dough). All this has proved to be suitable, for example, for improving the consistency of gluten-free dough matrices. In contrast, hydroxyl radical oxidation led to depolymerization of AXs, deteriorating the technological properties of the dough system. The study of the role of each constituents in a model system (fractioned into constituents and then reconstituted) provides an opportunity to identify deeper relationships. Our experiments in wheat-based model dough have shown

that the reduction and re-oxidation of gluten network suggest the incorporation of added AX into the gluten structure, which is an important information for understanding the structural role of AXs in the dough and end product matrices.

There are still many unanswered questions about the compositional and structural variability of carbohydrates in cereals and their understanding of their closely related nutritional and technological role. All this will require further research and methodological improvements in order to promote conscious food development and the provision of scientifically sound, credible information to consumers.

Nemzeti szabványosítási hírek

A következő felsorolásban szereplő szabványok megvásárolhatók vagy megrendelhetők az MSZT Szabványboltban (1082 Budapest VIII., Horváth Mihály tér 1., telefon: 456-6893, telefax: 456-6841, e-mail: kiado@mszt.hu; levélcím: Budapest 9., Pf. 24, 1450), illetve elektronikus formában beszerezhetők a www.mszt.hu/webaruhaz címen.

A nemzetközi/európai szabványokat bevezetjük magyar nyelven, valamint magyar nyelvű címdallal és angol nyelvű tartalommal. A magyar nyelven bevezetett nemzetközi/európai szabványok esetén külön feltüntetjük a magyar nyelvű hozzáférést.

2022. március – 2022. május hónapban bevezetett szabványok:

13.060 *Vízminőség*

MSZ EN ISO 20236:2022 *Vízminőség. Az összes szerves szén (TOC), az oldott szerves szén (DOC), az összes kötött nitrogén (TN_p) és az oldott kötött nitrogén (DN_p) meghatározása katalitikus, magas hőmérsékletű, oxidatív égetés után (ISO 20236:2018) – Az MSZ EN 12260:2004 helyett –*

MSZ EN ISO 16266-2:2022 *Vízminőség. A Pseudomonas aeruginosa kimutatása és megszámlálása. 2. rész: A legvalószínűbb szám módszere (ISO 16266-2:2018)*

67 *Élelmiszeripar*

67.040 *Élelmiszertermékek általában*

MSZ ISO/TS 22002-6:2022 *Élelmiszer-biztonsági előfeltételi programok. 6. rész: Takarmány- és állateledel-előállítás*

67.050 *Élelmiszertermékek vizsgálatának és elemzésének általános módszerei*

MSZ EN 15662:2018 *Növényi eredetű élelmiszerek. Peszticid szermaradékok meghatározásának multimódszere acetónitriles extrakciót/szétválasztást és diszperziós SPE-tisztítást követő GC- és LC-alapú vizsgálattal. Moduláris QuEChERS-módszer*

67.200 *Étolajok és -zsírok. Olajmagvak*

MSZ EN ISO 665:2020 *Olajmagvak. A nedvesség- és az illóanyag-tartalom meghatározása (ISO 665:2020)*

67.220 *Fűszerek és ízesítők. Élelmiszerek adalékanyagai*

MSZ EN ISO 6571:2022 *Fűszerek, ízesítők és gyógynövények. Az illóolaj-tartalom meghatározása (hidrodesztillációs módszer) (ISO 6571:2008 + Amd 1:2017) EGYESÍTETT VÁLTOZAT*

2022. március – 2022. május hónapban visszavont szabványok:

67.100 *Tej és tejtermékek*

MSZ 2713-5:1988 *A vaj kémiai és fizikai vizsgálata. Vízeloszlás meghatározása indikátorpapírral*

¹ Magyar Szabványügyi Testület (MSZT)

Review of national standardization

The following Hungarian standards are commercially available at MSZT (Hungarian Standards Institution, H-1082 Budapest, Horváth Mihály tér 1., phone: +36 1 456 6893, fax: +36 1 456 6841, e-mail: kiado@mszt.hu, postal address: H-1450 Budapest 9., Pf. 24) or via website: www.mszt.hu/webaruhaz.

Published national standards from Marc 2022 to May 2022

13.060 Water quality

MSZ EN ISO 20236:2022 Water quality. Determination of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC), total bound nitrogen (TN_b) and dissolved bound nitrogen (DN_b) after high temperature catalytic oxidative combustion (ISO 20236:2018) – which has withdrawn the MSZ EN 12260:2004 –

MSZ EN ISO 16266-2:2022 Water quality. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Part 2: Most probable number method (ISO 16266-2:2018)

67 Food technology

67.040 Food products in general

MSZ ISO/TS 22002-6:2022 Prerequisite programmes on food safety. Part 6: Feed and animal food production

67.050 General methods of tests and analysis for food products

MSZ EN 15662:2018 Foods of plant origin. Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. Modular QuEChERS-method

67.200 Edible oils and fats. Oilseeds

MSZ EN ISO 665:2020 Oilseeds. Determination of moisture and volatile matter content (ISO 665:2020)

67.220 Spices and condiments. Food additives

MSZ EN ISO 6571:2022 Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content (hydrodistillation method) (ISO 6571:2008 + Amd 1:2017) CONSOLIDATED VERSION

Withdrawn national standards from Marc 2022 to May 2022

67.100 Milk and milk products

MSZ 2713-5:1988 Chemical and physical test for butter. Determination of water dispersion value

For further information please contact Ms Anna Szalay, sector manager on food and agriculture, e-mail: a.szalay@mszt.hu

¹ Hungarian Standards Institution

Szerzőink / Authors

BABINA, Olga Dr.

*Dél-uráli Állami Egyetem
South Ural State University*

BIRÓ Barbara

*Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Institute of Food Science and Technology, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences*

GERE Zoltán

*Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Institute of Food Science and Technology, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences*

HATVAN Zoltán

*Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék
Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Food Science*

JAKUCS Levente

Novel Food Kft.

KALOCSAI Renátó

*Széchenyi István Egyetem, Agrártudományi és Élelmiszertudományi Kar, Víz- és Környezettudományi tanszék
Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and Environmental Sciences*

KERÉNYI Zoltán Dr.

*Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.
Hungarian Dairy Research Institute Ltd.*

KOREn Dániel

*Pécsi Sörfőzde Zrt.
Pécsi Brewery*

KÓKAI Zoltán Dr.

*Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Institute of Food Science and Technology, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences*

LICHTHAMMER Adrienn Dr.

*Dietetikai és Táplálkozástudományi Tanszék, Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar
Department of Dietetics and Nutritional Sciences, Semmelweis University, Faculty of Health Sciences*

LUKIN, Aleksandr Dr.

*Dél-uráli Állami Egyetem, Dél-uráli Állami Agráregyetem
South Ural State University / South Ural State Agrarian University*

MOLNÁR Judit Dr.

*Széchenyi István Egyetem, Agrártudományi és Élelmiszertudományi Kar, Víz- és Környezettudományi tanszék
Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and Environmental Sciences*

MUKHTAR H., Ahmed Dr.

SISAF Nanotechnology Drug Delivery, Ulster University

ÓRÉ-SÜTŐ Berta Vanda

Eurofins Food Analytica Kft.

PIROZHINSKY, Sergey

*Antey Kft.
LLC „Antey”*

SÜLE Judit Dr.

*Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.
Hungarian Dairy Research Institute Ltd.*

SZAKÁL Tamás Dr.

*Széchenyi István Egyetem, Agrártudományi és Élelmiszertudományi Kar, Víz- és Környezettudományi tanszék
Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and
Environmental Sciences*

SZALAY Anna

*Magyar Szabványügyi Testület
Hungarian Standards Institution*

VARGA László Prof. Dr.

*Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék
Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris
Doktori Iskola
Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Food Science
Széchenyi István University, Wittmann Antal Multidisciplinary Doctoral School in Plant, Animal, and Food
Sciences*

VASAS Dávid

*Széchenyi István Egyetem, Agrártudományi és Élelmiszertudományi Kar, Víz- és Környezettudományi tanszék
Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and
Environmental Sciences*

VERESNÉ BÁLINT Márta Dr.

*Dietetikai és Táplálkozástudományi Tanszék, Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar
Department of Dietetics and Nutritional Sciences, Semmelweis University, Faculty of Health Sciences*



Megbízható Mennyiségi Meghatározás

Minden komponens, mátrix és felhasználó esetében

A tudományos és üzleti célok elérése csak megbízható eredmények birtokában lehetséges.

A felhasználási területtől függetlenül a Thermo Scientific™ TSQ hármás kvadrupol tömegspektrometriás rendszerei kiemelkedő precizitást biztosítanak a mennyiségi meghatározási feladatokra. Nagy felbontású SRM üzemmód, robusztusság, megbízhatóság és érzékenység egy készülékben, mely segítségével minden felhasználó a mérendő komponenstől vagy a mátrixtól függetlenül megbízható mérési eredményekhez juthat.



Thermo Scientific™ TSQ Altis™
hármás kvadrupol tömegspektrométer



Thermo Scientific™ TSQ Quantis™
hármás kvadrupol tömegspektrométer



Thermo Scientific™ TSQ Fortis™
hármás kvadrupol tömegspektrométer

További információk:

thermofisher.com/confidentquantitation

Kizárólagos képviselő:

UNICAM Magyarország Kft.
1144 Budapest, Kőszeg utca 25.
Telefon: +36 1 221 5536
E-mail: unicam@unicam.hu
Web: www.unicam.hu

UNICAM

Élelmiszervizsgálati Közlemények / Journal of Food Investigation

Kiadó / Publisher: Wessling Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Nonprofit Kft. / Wessling International Research and Educational Centre Nonprofit Ltd. / **HU ISSN 2676-8704**

Felelős kiadó / Director: Dr. ZANATHY László ügyvezető igazgató / CEO

Főszerkesztő / Editor in chief: Dr. SZIGETI Tamás János

Szerkesztő / Editor: KONECSNY Tímea, SZUNYOGH Gábor

Angol fordítás / English translation: Dr. HANTOSI Zsolt

Honlap adminisztrátor / web admin.: JUHÁSZ Péter

Szerkesztőbizottság / Editorial Board:

- AMBRUS Árpád Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal (NÉBIH) főtanácsadó;
Retired university professor, National Food Chain Safety Office (NFCSO) chief advisor*
- BÁNÁTI Diána Dr. *Egyetemi tanár, rektori megbízott, Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar;
Full professor special advisor of the rector University of Szeged Faculty of Engineering*
- BARNA Sarolta Dr. *Igazgató, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal, Élelmiszerbiztonsági Kockázatértékelési Hivatal (NÉBIH, KÉI);
Director of National Food Chain Safety Office, Directorate of Risk Assessment (NFCSO, DRA)*
- BÉKÉS Ferenc Dr. *Az MTA külső tagja, igazgató, FBFD PTY LTD NSW Ausztrália;
External Member of Hung. Acad. Sci., director of FBFD PTY LTD NSW Australia*
- BIACS Péter Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE);
Retired university professor Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS)*
- BIRÓ György Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar;
Retired university professor, Semmelweis University, Faculty of Health Sci.*
- BOROSS Ferenc Dr. *Ügyvezető elnök, Európai Minőségügyi Szervezet, Magyar Nemzeti Bizottság (EOQ MNB); Executive chairman, European Organization for Quality, Hungarian National Committee (EOQ HNC)*
- CSAPÓ János Dr. *Egyetemi tanár, Debreceni Egyetem, Sapientia Egyetem, Csíkszeredai Kar;
University professor, University of Debrecen, Sapientia Univ., Miercurea Ciuc)*
- DANK Magdolna Dr. *Egyetemi tanár, Semmelweis Egyetem, Onkológiai Intézet;
University professor, Semmelweis University, Institute of Oncology*
- FARKAS József Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, akadémikus;
Retired university professor, academician*
- GAGÁN Anita *J.S. Hamilton Hungaria Kft.*
- GYIMES Ernő Dr. *Egyetemi docens, Szegedi Tudományegyetem, Mérnöki Kar;
University docent, University of Szeged Faculty of Engineering*
- GYŐRI Zoltán Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, intézetigazgató, Debreceni Egyetem;
Retired university professor, institute director, University of Debrecen*
- HANTOSI Zsolt Dr. *Angol nyelvi lektor, WESSLING Hungary Kft.; English lecturer, WESSLING Hungary Kft.*
- KASZA Gyula Dr. *Osztályvezető, Kockázatmegelőzési és Oktatási Osztály, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal (NÉBIH),
Egyetemi docens, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE),
Címzetes egyetemi tanár, Állatorvostudományi Egyetem;
Head of Department of Risk Prevention and Education, National Food Chain Safety Office (NFCSO),
Associate professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS),
Honored university professor, University of Veterinary Science*
- KONECSNY Tímea *Szerkesztő, WESSLING Hungary Kft.; Editor, WESSLING Hungary Kft.*
- KOVÁCS Béla Dr. *Egyetemi tanár, Debreceni Egyetem;
University professor, University of Debrecen*
- LUKIN, Aleksandr Dr. *Dél-uráli Állami Egyetem
South Ural State University (national research university),
Chelyabinsk, Russian Federation*
- MARÁZ Anna Dr. *Egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE);
University professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS)*

MOLNÁR Pál Dr.	<i>Egyetemi tanár, Szegedi Egyetem Mérnöki Kar, elnök, Európai Minőségügyi Szervezet, Magyar Nemzeti Bizottság (EOQ MNB); University professor, University of Szeged Faculty of Engineering, chairman, European Organization for Quality, Hungarian National Committee (EOQ HNC)</i>
NAGY Edit	<i>Főtitkár, MAVÍZ; Secretary general, Hungarian Water Utility Association</i>
POPOVICS Anett Dr.	<i>Egyetemi adjunktus, Óbudai Egyetem, Keleti Károly Gazdasági Kar; Senior lecturer, University of Óbuda, Keleti Károly Faculty of Economics</i>
SALGÓ András Dr.	<i>Nyugalmazott egyetemi tanár, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem; Retired university professor, Budapest Technical University</i>
SÁRDI Éva Dr.	<i>Egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Genetika és Növénynevelés Tanszék; University professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS), Department of Genetics and Plant Breeding</i>
SIMONNÉ SARKADI Livia Dr.	<i>Habil. egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Élelmiszertudományi Kar; Habil. university professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences, (HUALS) Faculty of Food Sciences</i>
SIPOS László Dr.	<i>Egyetemi docens, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Árukezelési és Érzékszervi Minősítési Tanszék; University docent, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS), Department of Commodity Management and Sensory Qualification</i>
SOHÁR Pálné Dr.	<i>Nyugalmazott főosztályvezető, NÉBIH; Retired head of department, NFCSO</i>
SZABÓ S. András Dr.	<i>Tanár, Ward Mária Gimnázium; Professor, Ward Mária High School</i>
SZALAY Anna	<i>Szabványosító menedzser, Magyar Szabványügyi Testület (MSZT); Standardization manager, Hungarian Standards Institution (HSI)</i>
SZEITZNÉ SZABÓ Mária Dr.	<i>Nyugalmazott igazgatóhelyettes, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal, Élelmiszerbiztonsági Kockázatértékelési Hivatal (NÉBIH, KÉI); Retired deputy director of National Food Chain Safety Office, Directorate of Risk Assessment (NFCSO, DRA)</i>
SZIGETI Tamás János Dr.	<i>Főszerkesztő, WESSLING Nonprofit Kft., Üzletfejlesztési igazgató, WESSLING Hungary Kft., Címzetes főiskolai docens, Szegedi Egyetem Mérnöki Kar, Címzetes egyetemi docens, Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar; Editor in chief, WESSLING Nonprofit Ltd., Business developing manager, WESSLING Hungary Kft., Honorary docent, University of Szeged Faculty of Engineering Honorary docent, University of Debrecen, Faculty of Agriculture-, Food-science and Environmental Management</i>
SZILVÁSSY Blanka Daniella Dr.	<i>Élelmiszerbiztonsági felügyelő, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH), Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság Food safety inspector, National Food Chain Safety Office (NFCSO), Department of Food and Feed Safety</i>
SZUNYOGH Gábor	<i>Szerkesztő, WESSLING Nonprofit Kft., Osztályvezető, WESSLING Hungary Kft., Marketing osztály; Editor, WESSLING Nonprofit Ltd., Head of Marketing Department, WESSLING Hungary Ltd.</i>
TÖMÖSKÖZI Sándor Dr.	<i>Egyetemi docens, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem; University docent, Budapest Technical University</i>
VARGA László Dr.	<i>Egyetemi tanár, Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék Mosonmagyaróvár; University professor, Széchenyi István University, Faculty of Food and Agricultural Sciences, Department of Food Science, Mosonmagyaróvár</i>
WESSLING, Diana	<i>A családi vállalkozás képviselője, résztulajdonos, WESSLING Cégcsoport; Representative family business, shareholder, WESSLING Holding GmbH & Co. KG, Altenberge, Germany</i>
ZANATHY László Dr.	<i>Felelős kiadó, ügyvezető igazgató, WESSLING Nonprofit Kft., Ügyvezető igazgató, WESSLING Hungary Kft.; Responsible publisher, CEO, WESSLING Nonprofit Ltd. CEO, WESSLING Hungary Ltd.</i>

Grafika / Graphic design: Adworks Kft., info@adworks.hu

Elérhetőségeink / Contact: H-1045 Budapest, Anonymus utca 6., +36 1 87 23 662, www.eviko.hu
sziget.tamas@wessling.hu, +36 30 39 69 109; konecsny.timea@wessling.hu, +36 20 53 51 160

Kéziratok fogadása / Receiving manuscripts: sziget.tamas@wessling.hu, konecsny.timea@wessling.hu

Hirdetés / Advertising: Konecsny Tímea, +36 20 53 51 160, konecsny.timea@wessling.hu

A lap negyedévente, elektronikus formában jelenik meg. / This journal appears quarterly in a year, in electronic form.

Minden jog fenntartva! / All right reserved!

A kiadó írásbeli hozzájárulása nélkül tilos a kiadvány bármilyen eljárással történő sokszorosítása, másolása, illetve az így előállított másolatok terjesztése. / Without the written permit of the publisher, duplication, copying or dissemination of this paper by any way is prohibited.

Az Élelmiszervizsgálati Közleményeket a Wessling Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Nonprofit Kft. adja ki a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatallal (NÉBIH) együttműködve. / This Journal of Food Investigation is issued by the Wessling International Research and Educational Centre Nonprofit Ltd. with cooperation the National Food Chain Safety Office (NÉBIH).

A szakfolyóiratot a következő figyelő szolgáltatások vették jegyzékbe és referálják / The Journal of Food Investigation is have been referred and listed by the next monitoring services: SCOPUS, SCIMAGO, MATARKA / *Hungarian Periodicals Table of Contents*, Magyar Tudományos Akadémia Könyvtár és Információs Központ, Magyar Tudományos Művek Tára / *Hungarian Academy of Sciences, Library of Information Centre, Hungarian Scientific Bibliography Database* / *Publishers International Linking Association Inc. (Crossref (DOI) Registration Agency)*