

1. ANYAG ÉS MÓDSZER

1.1. Homogén mikrohullámú tér kialakítása

A mikrohullámú besugárzások során állandósult probléma, hogy a besugárzott anyagban a mikrohullám hatása nem egyformán, nem kiegyenlítően érvényesül, azaz elérő mértékben melegítve fel az adott anyagot. Az említett probléma megoldásaként a besugárzások során vízcsapdák alkalmazásával homogenizáltuk a mikrohullámú teret. Ezen kutatási feladatokat egy másik OTKA pályázat keretében valósítottuk meg. Az ott elért eredményeket felhasználva megbízható kezelési körülményeket alakítottunk ki.

1.2. Fogyasztói-, illetve nyers tej mintákban lévő lipáz és xantin-oxidáz enzimek vizsgálata

A vizsgálatok célja az volt, hogy bizonyítsuk, hogy a mikrohullámnak a hőhatáson kívül van egy úgynevezett nem termikus hatása is. Ennek érdekében a vizsgált anyagokat (különböző zsírtartalmú nyers, illetve fogyasztói tejmintákat) hagyományos úton (főzőlapon) és mikrohullám alkalmazásával is felmelegítettük, majd a mintákat konvektív szárítási kezeléseknél vetettük alá. A mikrohullámú kezeléseket Fiso száloptikával kiegészített Panasonic inverter típusú mikrohullámú egységben, illetve Mars típusú mikrohullámú berendezésben, 100 W teljesítmény mellett 25 percig végeztük. A hőkezelések után a tejminták közvetlenül a szárítócsatornába kerültek, ahol a mintákat a fogyasztói tej esetében 30 °C-os, 2 m/s sebességű levegővel; nyers tej esetében 40 °C-os, 1,5 m/s sebességű levegővel fogyasztói minták esetében 90 percig; nyers tej minták esetében 120 percig szárítottuk. A minták hőmérsékletváltozását tömegváltozását Labview program segítségével rögzítettük. A szárítócsatornára azért volt szükség, hogy a különböző hőkezelések okozta változások szembetűnőbbek legyenek.

A kezeléseket után a tejminták fizikai tulajdonságai (eltérő száradási intenzitás, minták felszínén kialakult tejbőr szerkezete, a tejben lévő zsírgolyók méretében bekövetkező változások) eltérőek voltak a hagyományos úton főzőlapon melegített tejminták fizikai paramétereikhez képest. A mikrohullámú besugárzást követően 30 perc elteltével tapasztaltuk a zsírgolyók méretváltozását, aminek háttérében véleményünk szerint a tej különböző enzimjeinek működése áll. A tejben lévő lipáz és xantin oxidáz (XO) enzimek aktivitásának megváltozást vizsgáltuk, HPLC és spektrofotométer felhasználásával. Ennek érdekében, hogy pusztán az enzimre, illetve annak aktivitására gyakorolt hatásokat tudjuk vizsgálni, (a tej egyéb alkotórészeinek zavaró hatását kiküszöbölve) mértük a tiszta enzimsuszpenzióban bekövetkezett enzimaktivitások változását a kontroll (melegítés nélküli), a főzőlapon történő és a mikrohullámú melegítés során (Az itt bemutatott vizsgálatok előkísérleteit „A mikrohullám hatása a különböző biológiai (mezőgazdasági) anyagokra” című OTKA kutatási pályázat keretében részletesen ismertettük.)

A mikrohullámú besugárzások mellett ultrahanggal is kezeltük a mintákat, azonban ebben az esetben nem tapasztaltunk lényeges változásokat.

1.3. Celluláz enzim vizsgálatok

Ebben a kísérletsorozatban kiindulási oldatként Na-acetát - ecetsav puffer oldatot (pH 4,6) használtunk. A pufferoldatban szuszpendáltattuk 4 g D-(+)-cellobióz szubsztrátot, valamint 2 ml 1,4-(1,3:1,4)-B-D-Glucan-4glucano-hydrolase (Sigma-Aldrich, ATCC 26921) enzimet. A kezelések során 50 W teljesítményű inverter (folyamatos) mikrohullámú besugárzással növeltük az enzim-szubsztrát szuszpenzió hőmérsékletét 45 °C-ig. Kontrollként ugyanolyan enzim-szubsztrát szuszpenziót melegítettünk főzőlapon hasonló melegítési paraméterek alkalmazása mellett.

A kezelések után a mind a két oldatot 37 °C-on inkubáltuk.

A cellobiáz enzim a D-(+)-cellobiózt D-glükózzá bontja. Az enzimaktivitást úgy követjük nyomon, hogy mérjük az oldatok glükóz koncentrációjának megváltozását. A mérés során az oldatból 100 µl-nyi mennyiséget kiveszünk. Ehhez adunk 10 ml glükóz reagenst, majd a kapott oldatot 10 percig 37 °C-on inkubáljuk. Ezek után spektrofotométerben 505 nm-en mértük az oldatok abszorbanciáját.

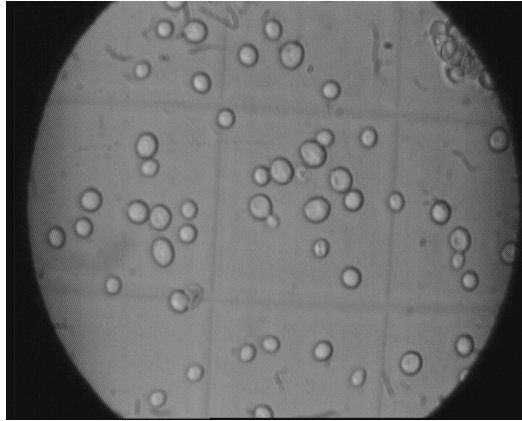
Mind a mikrohullámmal mind a főzőlapon melegített mintákból közvetlen a kezelések után (0 perc), majd 30, 60, 120 illetve 180 perc elteltével vettünk mintát, és mértük az oldatok abszorbanciáját.

A mérések során vizsgáltuk, hogy az enzimszuszpenziók mennyi ideig őrzik meg az aktivitásuk megváltozását. A szuszpenziókat 8 °C-os hűtőszekrényben tároltuk 48, illetve 96 óráig. A tárolás során hagyományos módon, főzőlapon felmelegítettük az oldatokat 37 °C-ra, majd vizsgáltuk az enzim cukorbontó affinitását.

1.4. *Saccharomyces cerevisiae* élettevékenységének vizsgálata

A vizsgálatok során (~8°C-os) 200 ml desztillált víz alapú 0,85 % NaCl –ot tartalmazó fiziológiás sóoldatban oldottunk fel 2 g sütőélesztőt (*Saccharomyces cerevisiae*), majd a szuszpenziót 5 percig mágneses keverőbabával megközelítőleg 100 rpm/min. érték mellett homogénné tettük. A kísérleti mintát 50 W teljesítmény alkalmazása mellett megközelítőleg 50-55 percig melegítettük az előző pontokban említett mikrohullámú kezelőberendezésekben, míg kezelt anyag hőmérséklete a kiindulási ~10 °C-ról 45 °C-ig nem emelkedett, mert a *Saccharomyces. cerevisiae* 24-48 °C közt szaporodóképes.

Ugyanolyan melegítési paraméterek mellett főzőlapon is melegítettünk 200 ml kontroll szuszpenziót, melynek összetétele a kísérletben kezelt mintáéval teljes mértékben megegyezett. Mindkét melegítés során kevertettük a kezelendő anyagot: a mikrohullámú készülékben a keverőt rögzítettük és a forgótányér mozgása keverte az oldatot, a főzőlapon pedig mágneses keverőbabával megközelítőleg 100 ford/perc érték mellett végeztük a keverést. A melegítési idő letelte után metilénkék festési eljárást végeztünk a következőképpen: 500 µl metilénkék oldat + 500 µl mikrohullámmal kezelt szuszpenziót 5 percig inkubáltuk, majd fénymikroszkópba helyezett Bürker kamrában megszámloltuk az áttetsző színű élő és a sötétkékre festődött holt sejteket (2. ábra). A detektálás a mikroszkópra rögzített kamerával történt. Mind a mikrohullámú kezelés, mind a főzőlapos melegítés előtt a fent leírt metilénkék festési eljárással Bürker kamrában megvizsgáltuk a minták kezelés előtti kiindulási állapotát is.



2. ábra: Szaporodó élesztősejtek vizsgálata Bürker kamrában.

Az előzőekben leírt kísérletek megismétlése történt azzal a különbséggel, hogy mind a mikrohullámmal kezelt, mind a főzőlapon melegített szuszpenzió 12%-ban β -D-glükózt is tartalmazott.

Az élesztősejtek vitalitását a Bürker kamrás sejtszámlálás mellett fluoreszcens mikroszkóppal is vizsgáltuk a következő módon: 50 μ l szuszpenzió + 450 μ l akridinoranzs (L13159 Alfa Aesar, Molar Chemicals Kft) 1%-os fluoreszcens festékoldatát vizsgáltuk Olympus BX60 fluoreszcencia mikroszkópban.

2. EREDMÉNYEK

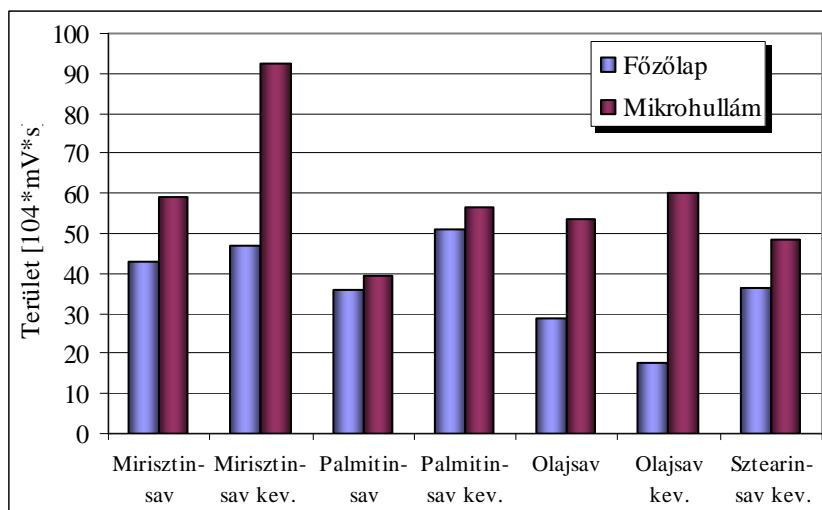
2.1. Homogén mikrohullámú tér kialakítása

A mikrohullámú kezelőtérbe helyezett mintatartó edény körül a térerő homogén eloszlását kell kialakítani. A kezelőtérbe helyezett vízcsapdák alkalmazásával a mintatartó edény körül homogén tér alakul ki, ami a minták egyenletes felmelegedésében nyilvánul meg. A vízcsapdák pozícióját a mintatartó edény alakja, illetve a kezelt anyag minősége és mennyisége határozza meg. Optimális esetben a minták besugárzása után az anyagon belül maximum 2,6 °C-os hőmérsékletkülönbséget tapasztalhatunk. A hőmérsékleteloszlásokat infrakamerás felvételek segítségével detektáltuk.

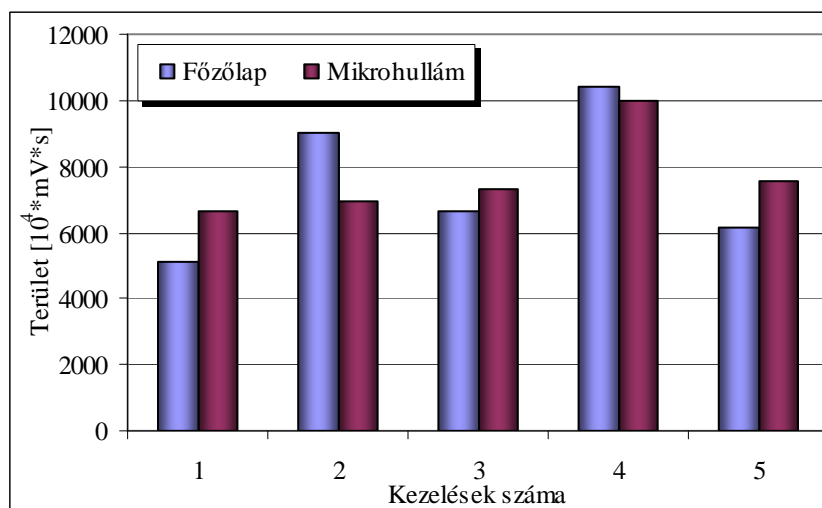
Abban az esetben, ha a központi edényben lévő kezelt anyag homogénezett tej, a vízcsapdákat a középponttól számítva 4,7 cm-re kell elhelyezni. Ebben az esetben a kezelőedény és a vízcsapda edényeinek középpontja között a távolság 10,85 cm.

2.2. Fogyasztói-, illetve nyers tej mintákban lévő lipáz és xantin-oxidáz enzimek vizsgálata

A tejben lévő enzimek közül elsőként a lipázok (lipoprotein lipáz) aktivitásának megváltozását vizsgáltuk. Magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) detektáltuk a tej, valamint az enzimsuszpenzió szabad zsírsav szintjének megváltozását (3.–4. ábra).



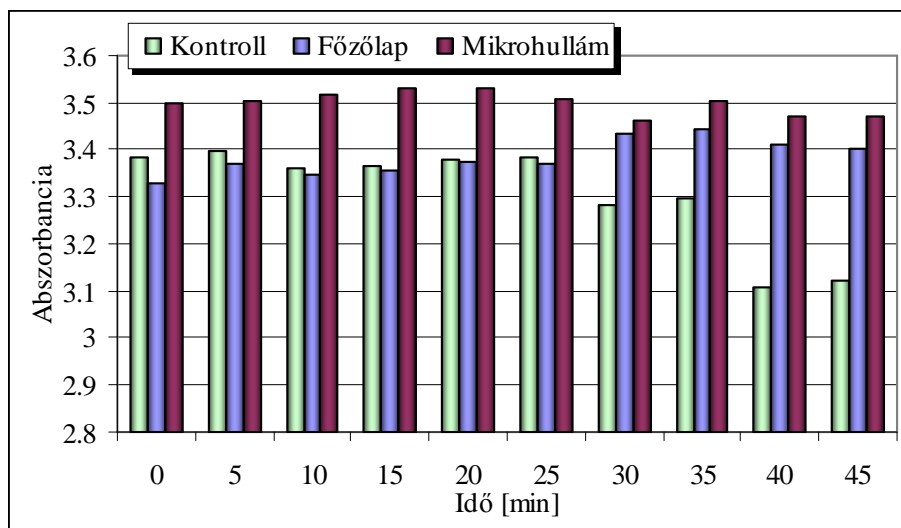
3. ábra: A főzőlapon, valamint a mikrohullámmal melegített tejmintákban lévő zsírsavak mennyiségi változása zsírsavanként, illetve a zsírsavkeverékben.



4. ábra: A főzőlapon, valamint a mikrohullámmal melegített enzimszuszpenzióban lévő zsírsavak mennyiségi változása.

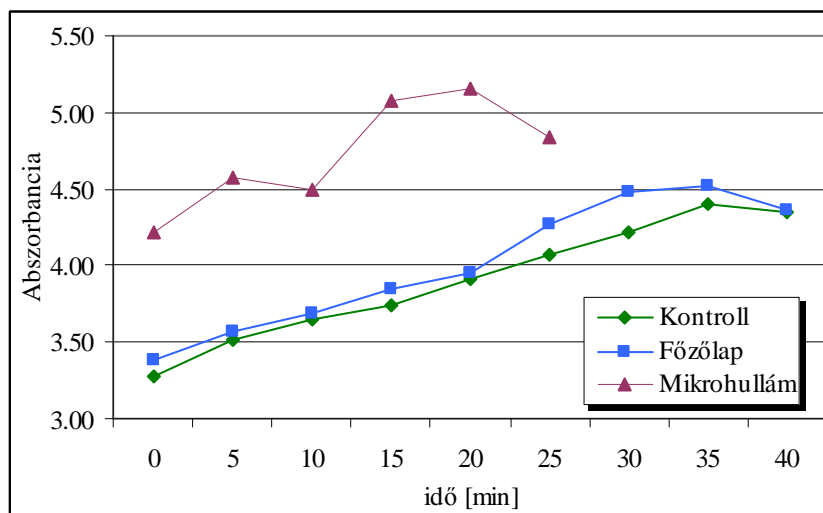
A mikrohullámmal és a főzőlapon történő melegítés után a tejmintákban igen, de a tiszta enzimszuszpenzióban nem mutatható ki szignifikáns különbség a szabad zsírtartalmának megváltozása között. Az eredmények alapján tehát nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy a mikrohullám hatására megnövekedik a lipáz enzim aktivitása, ellentétben a szakirodalomban megfogalmazottakkal. A mérési eredményekből kiindulva feltételeztük, hogy a mikrohullám egy másik, szintén a zsírgolyókkal szoros kapcsolatban lévő enzim aktivitását befolyásolhatja, ami majd közvetve hozzájárul a lipáz aktivitásának megnövekedéséhez.

A zsírgolyók membránjához kapcsolódó xantin oxidáz (XO) enzim által katalizált reakciók sebességének megváltozását mértük a korábban alkalmazott melegítési paraméterek alkalmazása mellett. Az XO aktivitás megváltozás mérése során spektrofotométer felhasználásával 290 nm-en detektáltuk a tej hidrogén peroxid szintjének megváltozását (5. ábra).



5. ábra: A tejminták átlagos hidrogén peroxid tartalmának változása a kezelés óta eltelt idő függvényében a kontroll, a főzőlapon történő, valamint a mikrohullámú melegítés során.

A xantin oxidáz esetében is megvizsgáltuk a tiszta enzimsuszpenzióban bekövetkező aktivitásváltozásokat, a kontroll mintákhoz viszonyítva, a kétféle melegítési mód alkalmazása esetén. Ezeknél a méréseknél 240 nm-en detektáltuk a mintában jelenlévő hidrogén peroxid (6. ábra) mennyiségének megváltozását.

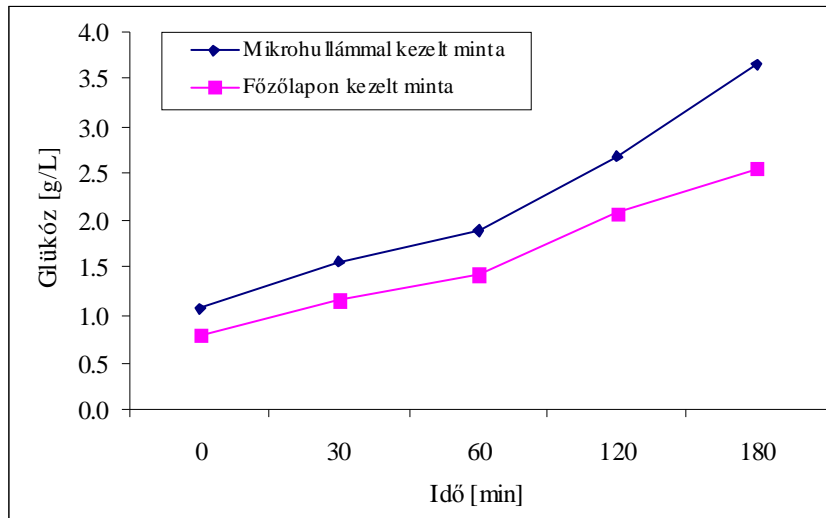


6. ábra: Az enzimsuszpenziók átlagos hidrogén peroxid tartalmának változása a kezelés óta eltelt idő függvényében a főzőlapon történő, valamint a mikrohullámú melegítés során.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a mikrohullámú besugárzás megnöveli a xantin oxidáz enzim aktivitását, ami szignifikánsan igazolható. A xantin oxidáz aktivitásának megváltozása révén a zsírgolyó membrán felszakadhat, a benne lévő trigliceridek kikerülnek a zsírgolyón kívülre, ahol kapcsolatba kerülhetnek a tejben lévő lipázokkal. A triglicerid szubsztrátum szabaddá válása hozzájárul a lipáz enzimaktivitásának megnövekedéséhez.

2.3. Celluláz enzim vizsgálatok

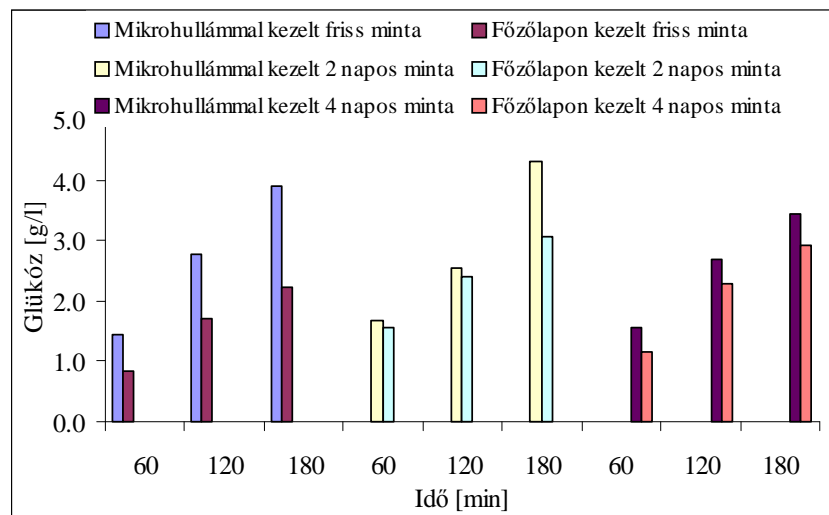
A spektrofotométer mérési eredményeit a 7. ábra mutatja.



7. ábra: Mikrohullámmal és főzőlapon kezelt enzimsuszpenzió aktivitásának változása a kezelés után.

A méréseket 9 ismétlésben hajtottuk végre, a statisztikai értékelés után megállapítható, hogy szignifikáns különbség van a mikrohullámmal illetve a főzőlapon melegített minták enzimaktivitása között. A mikrohullám hatására az enzimműködés megközelítőleg 25%-kal volt intenzívebb, mint az azonos körülmények között, de főzőlapon melegített minták esetében.

A 48 illetve 96 óráig 8 °C-on tárolt enzimsuszpenziók aktivitásának megváltozását összehasonlítottuk a friss mintákkal. A kapott eredményeket a 8. ábra szemlélteti.

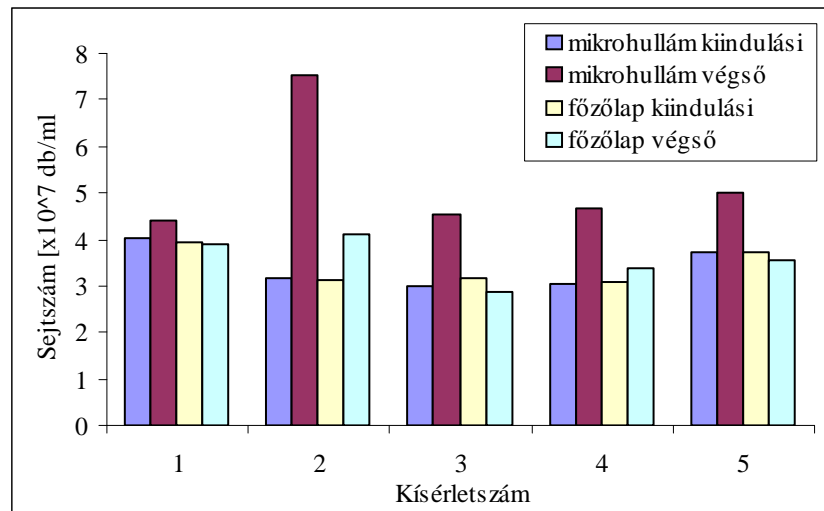


8. ábra: A mikrohullámmal és a főzőlapon kezelt enzimsuszpenzió aktivitás változása a kezelést követően, illetve 48 és 96 órával később.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a mikrohullámmal kezelt cellobiáz enzim a kezelést követően 96 óra elteltével is megnövekedett aktivitást mutat a főzőlapon kezelt cellobiáz enzimszuszpenzióhoz képest.

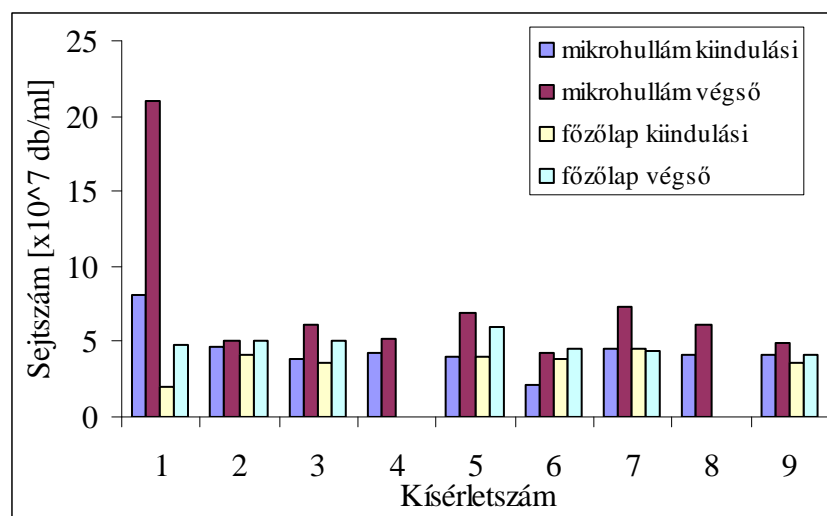
2.4. *Saccharomyces cerevisiae* élettevékenységének vizsgálata

A főzőlapos melegítés során a *Saccharomyces cerevisiae* élősejtszáma a kiindulási értékhez képest 5%-os növekedést mutatott. A mikrohullámú besugárzás hatására azonban jóval nagyobb mértékű 57%-os élősejtszám emelkedés történt a hagyományos, főzőlapos melegítéshez képest (9. ábra).



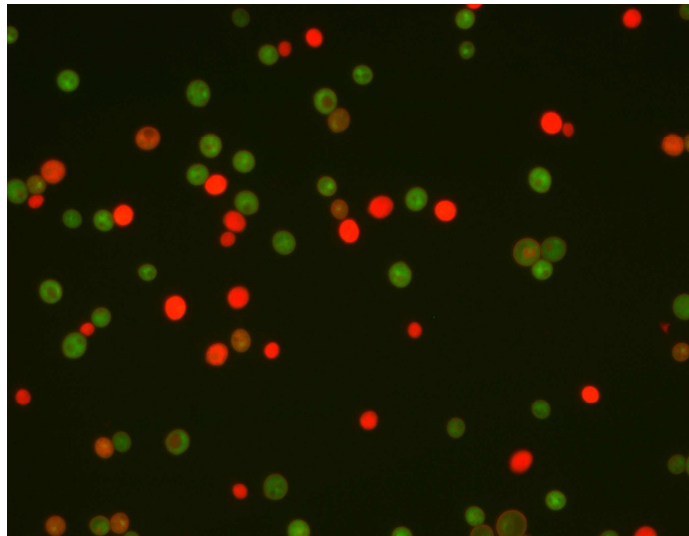
9. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* élősejtszámának növekedési aránya: 57% mikrohullámú és 5% főzőlapos melegítés során NaCl tartalmú oldatban.

A 12%-ban β -D-glükózt tartalmazó szuszpenziókkal végzett mérések alapján az élősejtszám növekedése bizonyított, de ebben az esetben a kétfajta kezelés eredményeinek 60% (mikrohullám) ill. 40%-os (főzőlap) értékei között kisebb volt a különbség (10. ábra).



10. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* élősejtszámának növekedési aránya 60% mikrohullámú és 40% főzőlapos melegítés során NaCl és β -D glükóz tartalmú oldatban.

Az elvégzett fluoreszcens próba alapján az élő sejtek zöld színűre, a holt élesztősejtek pedig narancsszínűre festődtek (11. ábra).



11. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* sejtek fluoreszcens mikroszkópos (400x-os) vizsgálata.

Az eredmények arra engednek következtetni, hogy mindkét melegítési mód befolyásolja a sütőélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) élettevékenységét, növeli a szaporodás mértékét. Mivel a mikrohullámú besugárzás hatására egyértelműen nagyobb mértékű volt az élesztősejtek szaporodása, így feltételezhetjük, hogy a mikrohullám a hagyományos melegítéshez képest nem termikus hatással is bír, mely ipari körülmények között meggyorsíthatja az élesztősejtek szaporodását és befolyásolhatja fiziológias életműködését. Az eredmények olyan további kísérletek alapjai lehetnek, melyek az élesztősejtek egyéb fiziológias folyamatait: enzimátikus működést, membrán ill. sejtfalstruktúra változásait célozzák meg.