

PROF. DR. CSAPÓ JÁNOS
OKTATÁSI, TUDOMÁNYOS
ÉS KÖZÉLETI TEVÉKENYSÉGE
1974-TŐL 2020-IG



Debreceni Egyetem
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi
és Környezetgazdálkodási Kar

PROF. DR. CSAPÓ JÁNOS
OKTATÁSI, TUDOMÁNYOS ÉS KÖZÉLETI TEVÉKENYSÉGE
1974-TŐL 2020-IG



CSAPÓ JÁNOS

professzor

70. születésnapja tiszteletére

PROF. DR. CSAPÓ JÁNOS
OKTATÁSI, TUDOMÁNYOS
ÉS KÖZÉLETI TEVÉKENYSÉGE
1974-TŐL 2020-IG

Debrecen, 2021

TARTALOMJEGYZÉK

Debreceni Egyetem
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi
és Környezetgazdálkodási Kar

Szerkesztő:
Prof. Dr. Csapó János

Felelős kiadó:
Dr. Stündl László

Nyomdai munkálatok:
Printart-Press Kft.
ISBN: 978-963-490-318-5

0. Bevezetés	13
1. Tudományos életrajz	15
2. Egyetemi, főiskolai munkám során végzett oktatói-kutatói tevékenységem	21
2.1. A Kaposvári Egyetemen és annak jogelődjeinél végzett tevékenységem	22
2.2. A Debreceni Egyetemen végzett tevékenységem	23
2.3. A Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetemen végzett tevékenységem	24
2.4. A három egyetemen végzett oktatói munkám összefoglalása	24
2.5. Az oktatás mellett végzett tudományos tevékenységem	28
2.5.1. Az idegen nyelven megjelent tudományos közleményeim	29
2.5.2. A magyar nyelven megjelent tudományos közleményeim	32
2.5.3. Előadásaim nemzetközi konferenciákon	36
2.5.4. Előadásaim hazai konferenciákon	44
2.5.5. Ismeretterjesztő közlemények	48
2.6. Szerzőtársaim, kollégáim, munkatársaim, segítőtőim betűrendi sorrendben	50
2.7. A Google Tudós által készített összeállítás a H-indexet, illetve az i10-indexet képező közleményeimről	53
3. Pályafutásom legfontosabb eredményei a tudományos munka területén	61
3.1. Az analitikai kémia, élelmiszer- és takarmányanalitika területén elért új tudományos eredmények	61
3.1.1. A fehérje és a fehérje aminosav-összetételének meghatározása	61
3.1.2. Aminosav-összetétel meghatározás különböző fehérjehidrolízis módszerekkel	62
3.1.2.1. Rövid ideig, magas hőmérsékleten végzett fehérjehidrolízis	64

3.1.2.2. Triptofán meghatározás különböző fehérjehidrolízis módszerekkel	64
3.1.2.3. A fehérje triptofántartalmának meghatározása szulfonsavas hidrolízissel, és a triptofán enantiomerek szétválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	65
3.1.2.4. Gyors módszer a fehérje cisztintartalmának meghatározására	66
3.1.2.5. Cisztinmeghatározás cisztein formában a merkapto-etán-szulfonsavas hidrolízissel	67
3.1.2.6. A redukáló tiolcsoportot tartalmazó merkapto-etán-szulfonsav alkalmazása a fehérje hidrolízisére és az aminosavak származékképzésére o-ftáldialdehiddel	69
3.1.3. Oszlopkromatográfiás módszerek a bakteriális eredetű fehérje meghatározására kérődzőknél	70
3.1.3.1. A diamino-pimelinsav meghatározása a fehérjealkotó aminosavakkal együtt	70
3.1.3.2. Gyors módszer a diamino-pimelinsav meghatározására	71
3.1.3.3. A bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározása a D-aminosav-tartalom alapján	71
3.1.4. Minimális racemizációval járó, rövid ideig és magas hőmérsékleten végzett hidrolízis fehérjék D- és L- aminosav-enantiomereinek meghatározására	72
3.1.4.1. A fehérjealkotó D- és az L-aminosavak szétválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával diasztereoizomer dipeptid formában	73
3.1.4.1.1. Az alanil-dipeptidek szintézise, szétválasztása és meghatározása	74
3.1.4.1.2. A 2-szulfonsav-alanil-dipeptidek szintézise, szétválasztása és meghatározása	74
3.1.4.1.3. Az analitikai eredmények felhasználása a bakteriális eredetű fehérje mennyiségének becslésére	75
3.1.5. A D- és az L-aminosav-enantiomerek meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	75
3.1.5.1. A kéntartalmú aminosav-enantiomerek elválasztása és meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával perhangyasavas oxidációt követően	76
3.1.6. Fosztilis csontok korának meghatározása az aminosavak racemizációja alapján	77

3.1.6.1. Az aminosavak racemizációján alapuló kormeghatározási módszer pontosságának növelése	79
3.1.6.2. Egy magyarországi és egy erdélyi gyapjas mamut korának meghatározása az aminosavak racemizációja alapján	79
3.1.7. Az egyén korának becslése a fogak D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-tartalma alapján	80
3.1.8. Gyapjúszőnyegek és textíliák korának becslése az aminosavak oxidációja és elbomlása alapján	82
3.1.9. A ciszteinsav belső standardként történő alkalmazása az aminosav-analitikában	83
3.1.10. A húslisztek toll-liszt tartalmának meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával	84
3.2. Az állat- és takarmányozástudomány területén elért új tudományos eredmények	85
3.2.1. A kolosztrum és a tej összetétele különböző genotípusú szarvasmarháknál	85
3.2.1.1. A kolosztrum összetétele különböző genotípusú szarvasmarháknál	85
3.2.1.1.1. A kolosztrum szárazanyag- és fehérjetartalma valamint fehérjefrakciói	85
3.2.1.1.2. A kolosztrum és a kolosztrumfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke	87
3.2.1.1.3. A kolosztrum makro- és mikroelem-tartalma	87
3.2.1.1.4. A kolosztrum C-vitamin-tartalma	88
3.2.1.1.5. Ikreket ellett szarvasmarhák kolosztrumának összetétele	88
3.2.1.1.6. Hármás ikreket ellett tehének kolosztrumának összetétele	89
3.2.1.2. A tej összetétele különböző genotípusú szarvasmarháknál	90
3.2.1.2.1. Az első és az utolsó tejsugarak összetétele	90
3.2.1.2.2. A tej szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói	90
3.2.1.2.3. A tej és a tejfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke	92
3.2.1.2.4. A tej makro- és mikroelem-tartalma	93
3.2.2. A juh kolosztrumának és tejének összetétele	95

3.2.2.1. A juh kolosztrumának összetétele	95
3.2.2.1.1. A kolosztrum szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói	95
3.2.2.1.2. A kolosztrum és a kolosztrumfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke	96
3.2.2.1.3. A kolosztrum makro- és mikroelem-tartalma	97
3.2.2.1.4. Ikreket ellett juhok kolosztrumának összetétele	97
3.2.2.2. A juh tejének összetétele	98
3.2.2.2.1. A tej szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói	98
3.2.2.2.2. A tej és a tejfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke	99
3.2.2.2.3. A tej makro- és mikroelem-tartalma	99
3.2.2.4. Eltérő genotípusú juhok kolosztrumának és tejének összetétele	100
3.2.3. A kecske kolosztrumának és tejének összetétele	100
3.2.3.1. A kecske kolosztrumának összetétele	100
3.2.3.1.1. A kolosztrum és a kolosztrumfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke	101
3.2.3.1.2. A kolosztrum makro- és mikroelem-tartalma	102
3.2.3.1.3. Ikreket ellett kecskék kolosztrumának összetétele	102
3.2.3.2. A kecske tejének összetétele	103
3.2.3.2.1. A tej szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói	103
3.2.3.2.2. A tej és a tejfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke	104
3.2.3.2.3. A tej makro- és mikroelem-tartalma	104
3.2.3.2.4. A kecsketej C-vitamin-tartalma	105
3.2.4. A szarvas kolosztrumának és tejének összetétele	105
3.2.4.1. A szarvas kolosztrumának összetétele	105
3.2.4.2. A szarvas (őz, dámszarvas) tejének összetétele	106
3.2.4.3. A szarvastej-pótló előállítás	107
3.2.5. Az őz és a dámszarvas tejének összetétele	108
3.2.6. Kérődző háziállataink kolosztrum- és tejösszetétele. (Összefoglalás)	108
3.2.7. A koca kolosztrumának és tejének összetétele, táplálkozásbiológiai értéke	109

3.2.7.1. Az utódok számának hatása a koca ellés után közvetlenül fejt kolosztrumának összetételére	110
3.2.8. Különböző fajtájú sertések zsírjának zsírsav-összetétele és koleszterintartalma	111
3.2.9. A kanca kolosztrumának és tejének összetétele	112
3.2.10. Csirkék genotípusának, ivarának és korának hatása a baromfitakarmány hasznosítható energiájára, valamint a takarmányfelvétel és az etetési módszer hatása a metabolizálható, valamint az endogén energiaveszteségre kifejtett kakasokban	113
3.2.10.1. Csirkék genotípusának, ivarának és korának hatása a baromfitakarmány hasznosítható energiájára	113
3.2.10.2. A takarmányfelvétel és az etetési módszer hatása a metabolizálható, valamint az endogén energiaveszteségre kifejtett kakasokban	114
3.2.10.3. A makk (<i>Quercus branti</i>), a <i>Pistacia atlantica</i> és a <i>Pistacia khinjuk</i> kémiai összetételének, metabolizálható energiatartalmának, ill. antinutritív anyagainak meghatározása, valamint a makk hatása a tojótyúk termelésére	114
3.2.10.3.1. A makk (<i>Quercus branti</i>), a <i>Pistacia atlantica</i> és a <i>Pistacia khinjuk</i> kémiai összetételének meghatározása	114
3.2.10.3.2. A makk (<i>Quercus branti</i>), a <i>Pistacia atlantica</i> és a <i>Pistacia khinjuk</i> mag, mint új baromfitáp komponens metabolizálható energiatartalmának, ill. antinutritív anyagainak meghatározása	115
3.2.10.3.3. A különböző mennyiségű makk (<i>Quercus branti</i>) hatása a tojótyúk termelésére a tojástermelés első szakaszában	115
3.2.11. Módszer és eljárás a baromfi vágóhidakon keletkező toll feldolgozására és antioxidánsként történő alkalmazására	116
3.2.11.1. A feltárt toll-liszt antioxidáns hatásának és takarmányozási értékének vizsgálata	116
3.2.11.2. A toll-liszt hatása az A- és az E-vitamin-tartalom alakulására	117
3.2.11.3. A hidrolizált toll-liszt alkalmazásának vizsgálata kérődzők takarmányozásában a kéntartalmú aminosavak helyettesítésére	117
3.2.12. Módszer és eljárás a szója tripszininhibitor-tartalmának és ureáz enzim aktivitásának csökkentésére hőkezeléssel kombinált kémiai módszerekkel	117

3.2.13. Védett lizin és metionin előállítása hidroxikarbonsavakkal és bentonittal	118
3.2.13.1. Reakciók a hidroxikarbonsavak, valamint a metionin és a lizin között	119
3.2.13.2. Védett metionin és védett lizin előállítása duzzasztott bentonittal	119
3.3. Az élelmiszertudomány területén elért új tudományos eredmények	121
3.3.1. Élelmiszerek D-aminosav-tartalma	121
3.3.1.1. A mikroorganizmusok hatása a tej D-aminosav-tartalmára	121
3.3.1.2. A szabad D-aminosavak szintjét befolyásoló tényezők vizsgálata a cheddar sajt gyártása során	123
3.3.1.3. A mikrohullámú hőkezelés hatása a hús vízzoldékony vitamin- és D-aminosav-tartalmára	124
3.3.1.4. A termikus műveletek hatása a kukorica és a szója D-aminosav-tartalmára	124
3.3.2. A Székelyföldön előállított tej és tejtermékek összetétele, különös tekintettel a tej alapanyag összcsíraszámára	126
3.3.2.1. Az összcsíraszám hatása a tej összes szabad és szabad D-aminosav tartalmára	126
3.3.2.2. A tej összcsíraszámának hatása a tejtermékek összetételére	127
3.3.2.3. A magas összcsíraszámú tej összetételének alakulása a különböző hőkezelési eljárások hatására	128
3.3.3. A <i>Bifidobacterium longum</i> növekedésének és biokémiai aktivitásának elősegítése tehén-, juh- és kecsketejben, valamint savóporban	129
3.3.4. A Székelyföldön előállított tej és tejtermékek előállítási körülményeinek hatása a zsírsav-összetételre, különös tekintettel a konjugált linolsavra	130
3.3.4.1. A tej zsírsav-összetételének és konjugált linolsav-tartalmának változása az évszakok szerint	130
3.3.4.2. A savanyú tejtermékek előállításánál használt kultúrák hatása a zsírsav-összetételre és a konjugált linolsavra	132
3.3.4.3. Savanyú tejtermékek konjugált linolsav-tartalmának növelése linolsav hozzáadásával	133

3.3.4.4. A konjugált linolsav mennyiségének változása a sajtok tárolása során	135
3.3.4.5. A hőkezelés és a mikrohullámú kezelés hatása a tej, a vaj és a sajt zsírsav-összetételére	136
3.3.5. Szelénnel dúsított tej és tejtermékek előállítása	137
3.3.5.1. A kísérleti állatok, szelénkiegészítés, a tej szeléntartalma	137
3.3.5.2. Különféle tejtermékek előállítása	138
3.3.6. Tabletta, illetve kapszula előállítása szarvasmarha kolosztrumból az ember passzív immunitásának növelésére	139
3.3.7. Az anyatej zsírtartalma és zsírsav-összetétele	140
3.3.8. Prebiotikumok előállítása a laktóz, valamint az almasav és citromsav reakciójával	142
3.3.8.1. Az almasav és a citromsav, valamint a laktóz közötti reakciók	142
3.3.9. Élelmezési csírák szerepe az emberi táplálkozásban	144
3.3.10. A búza szeléntartalmának szerepe az emberi táplálkozásban	144
4. A mellékletben szereplő publikációk jegyzéke	146
4.1. Csapó, J. – Vargáné, Visi É.: Fermented foods and health. 4 Conjugated linoleic acid (CLA) production in fermented foods. <i>Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition</i> . 2014. 75-105.	146
4.2. Collins, M.J. – Nielsen-Marsh, C.M. – Hiller, J. – Smith, C.I. – Roberts, J.P. – Prigodich, R.V. – Wess, T.J. – Csapó, J. – Millard, A.R. – Turner-Walker, G.: The survival of organic matter in bone: a review. <i>Archaeometry</i> . 2002. 44. 3. 383-394.	177
4.3. Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Wágner, L. – Tálos, T. – Martin, T.G. – Némethy, S. – Folestad, S. – Tivesten, A.: Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids. <i>Analytica Chimica Acta</i> . 1997. 339. 99-107.	189
4.4. Csapó, J. – Folestad, S. – Tivesten, A. – Csapó-Kiss, Zs.: Mercaptoethanesulfonic acid as a protecting and hydrolysing agent for the determination of the	

- amino acid composition of proteins using an elevated temperature for protein hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*. 1994. 289. 1. 105-111. 198
- 4.5. Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J. Jr.: Use of amino acids and their racemization for age determination in archaeometry. *Trends in Analytical Chemistry*. 1998. 17. 3. 140-148. 205
- 4.6. Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Folestad, S. – Orwar, O. – Tivesten, A. – Martin, T.G. – Némethy, S.: Age estimation of old carpets based on cystine and cysteic acid content. *Analytica Chimica Acta*. 1995. 300. 1-3. 313-320. 212
- 4.7. Csapó, J. – Schmidt, J. – Csapó-Kiss, Zs.: Quantitative determination of protein of bacterial origin. A review. *Trends in Analytical Chemistry*. 2001. 20. 1. 42-48. 220
- 4.8. Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Martin, T.G. – Szentpeteri, J. – Wolf, Gy: Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *International Dairy Journal*. 1994. 4. 5. 445-458. 227
- 4.9. Csapó, J. – Stefler, J. – Martin, T.G. – Makray, S. – Csapó-Kiss, Zs.: Composition of mare's colostrum and milk. Fat content fatty acid composition and vitamin content. *International Dairy Journal*. 1995. 5. 393-402. 241
- 4.10. Csapó-Kiss, Zs. – Stefler, J. – Martin, T.G. – Makray, S. – Csapó, J.: Composition of mare's colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and microelements. *International Dairy Journal*. 1995. 5. 403-415. 251
- 4.11. Csapó, J. – Martin, T.G. – Csapó-Kiss, Zs. – Stefler, J. – Némethy, S.: Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. *Journal of Dairy Science*. 1995. 78. 2375-2381. 264
- 4.12. Csapó, J. – Martin, T.G. – Csapó-Kiss, Zs. – Házás, Z.: Protein, fats, vitamin and mineral concentrations in porcine colostrum and milk from parturition to 60 days. *International Dairy Journal*. 1996. 6. 881-902. 271

0. BEVEZETÉS

2020. július 27-én kaptam egy levelet Dr. Stündl László dékán úrtól, mely szerint a Kar vezetése elhatározta, hogy a nyugdíjba vonuló, 70. életévüket betöltő professzorok tiszteletére, tisztelegve munkásságuk előtt, egy születésnap kiadványt készítenének mindenkiről, egy könyv formájában. Én a két felajánlott verzió közül azt választottam, mely a pályaismertetés gondolatára épül, ami keresztmetszetet adná az oktatás és a kutatás területén végzett tevékenységnek, amelyben a szakmai életrajzot követné a pályafutás legfontosabb eredményei. Ezután jönnének a legfontosabb tudományos közlemények, majd a tanítványokkal közös publikációk zárhatnák a sort. A felkérésből kiderül, hogy elfogadható formátum a kronológiai sorrendben történő ismertetés, és a kiadvány tartalmazhatja a külföldön végzett oktatási és tudományos tevékenységet is.

Én azért választottam ezt a verziót, mert mind az oktatás, mind a tudományos kutatás területén végzett munkám szinte folyamatos volt 1974. július 15-től nyugdíjazásomig, 2020. július 8-áig. A főiskolai és egyetemi felsőoktatásban és kutatásban 46 évet töltöttem, egyetemi éveimet és a katonaságot is beleszámolva munkaviszonyban töltött éveimnek száma 52. Ebből az 52 évből majd 40-et a Kaposvári Egyetemen és jogelődjeinél dolgoztam főállásban, közben a Debreceni Egyetemen meghívásos jogviszonyú egyetemi tanárként is oktattam 2002 és 2006 között, majd 2013 óta főállású egyetemi tanárként nyugdíjba vonulásomig. Közben 2002-ben felkérést kaptam a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karától az akkor induló élelmiszer-mérnök képzés beindításának segítésére, ahonnan, szerződéselem lejártával, 2020. augusztus 31-én mondtam búcsút. Ez a könyv ennek a 46 évnek az oktatási és tudományos eredményeit tartalmazza.

A könyv anyagának összeállításánál az eredeti elképzelésem az volt, hogy a rövid bevezető és ismertető után a legfontosabb, a Hirsch és az i-10 indexben szereplő cikkeim PDF változatát kérem beszerkeszteni, de az eredeti cikkek is kis betűmérettel készültek, ha azt még felére csökkentettük volna, akkor gyakorlatilag egy alig olvasható anyagot kapott volna kézbe az olvasó.

Végezetül köszönetet szeretnék mondani a Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszer-tudományi és Környezetgazdálkodási Kar vezetőinek, az Élel-

miszertechnológiai Intézet igazgatóinak és munkatársainak, Dr. Stündl László dékán úrnak, hogy hosszú éveken át segítették munkámat, és hogy ösztönöztek a könyv megírására. Köszönöm a Kaposvári Egyetem és jogelődjei 2010. előtti rektorainak, kiemelve közülük Horn Péter akademikust, az Állattudományi Kar dékánjainak, kiemelve közülük Dr. Holló István professzor urat, a Központi Laboratórium, a Kémiai Intézet és a Biokémiai Tanszék mindenkori vezetőinek és munkatársainak, hogy majd 40 éven keresztül segítettek munkámat. Hálás köszönettel tartozom Dohy János akadémikusnak, aki mindenkor segítette az állattudománnyal kapcsolatos kutatásaimat. Ugyancsak köszönettel tartozom a SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem vezetésének, kiemelve Dr. Dávid László egyetemi tanár rektort és Dr. Szép Sándor egyetemi tanár ex rektor-helyettest, a Csíkszeredai Kar mindenkori vezetésének, kiemelve Dr. Lányi Szabolcs professzor urat, és az Élelmiszer-tudományi Tanszék minden munkatársának, Dr. György Éva egyetemi docens tanszékvezetőnek, mert segítségük nélkül a könyv nem íródhatott volna meg. Itt szeretném megköszönni Feleségem Dr. Kiss Zsuzsanna Ilona áldozatos munkáját, mindenkori támogatását, és hogy debreceni és csíkszeredai tartózkodásom alatt nagy türelemmel elviselte, hogy sokszor hetekig voltam távol az otthonomtól.

Végezetül szeretném megköszönni minden szerzőtársam segítségét, akikkel akár szakcikket vagy könyveket, jegyzeteket írtunk, vagy előadásokat tartottunk hazai és nemzetközi konferenciákon. Segítségük nélkül publikációs jegyzékem sokkal szerényebb lenne.

Kaposvár, 2020. 09. 15.

1. TUDOMÁNYOS ÉLETRAJZ

1950. július 9-én születtem Kaposvártól hét km-re, Szennán, egy somogyi kis-községben. Az általános iskola első két osztályát Szennán jártam, majd a további általános és középiskolai tanulmányaimat Kaposváron végeztem. A Munkácsy Mihály gimnázium biológia-kémiai tagozatos osztályába jártam, ahol 1968-ban kitűnő eredménnyel érettségiztem. Már az általános iskolában megszerettem a kémiát, és azt a szeretetemet a gimnáziumban eltöltött négy év csak tovább erősítette. Nem volt kétséges, hogy vegyésznek jelentkezek az egyetemre, melynek során elő felvételi lettem a József Attila Tudományegyetem Természettudományi Karának vegyész szakán, mert az akkori törvények szerint az arra alkalmasak az egyetem előtt katonai szolgálatot teljesítettek.

Hódmezővásárhelyen a Műszaki Század Utász szakaszában voltam katona, ahonnan 1969. augusztus másodikán szereltem le törzsőrmesterként. Ezt követően még többször be kellett vonulnom, voltam vadászpilóta földi irányítója, majd végül katonai cenzorként kaptam meg az obsitot, és tartalékos századosként szereltem le. A katonaság nem sok nyomot hagyott bennem, hacsak azt nem, hogy szerettem robbanó anyagokkal foglalkozni, harckocsi árkot, fedezéket, jéget robbantani. Később meg már a szakmámat gyakorolva a harci repülőgépek üzemanyagát vizsgáltam. Többször voltam hadgyakorlaton, a legemlékezetesebb a „Bakony 81” volt, a rendkívüli hideg miatt.

1969-ben kezdtem az egyetemet Szegeden, a József Attila Tudományegyetem Természettudományi Karának vegyész szakán. Jó sok tudást vertek a fejünkbe a kor színvonalának megfelelően, engem mégis az aminosavakkal, a fehérjékkel való kutatómunka kötött le. Abban az épületben dolgoztam a diploma munkámon, ahol Szent-Györgyi Albert annak idején a biológiai oxidációval és a C-vitaminnal kapcsolatos kutatásait végezte. Egyetemi tanulmányaimat 1974-ben *Az adrenokortikotrop hormon szintézise szilárd fázisú peptidszintézissel* című, a TTK különdíját elnyert diplomamunkával zártam. Azt hiszem, hogy témavezetőmmel, Dr. Penke Botond adjunktussal, ma már akadémikus, mi voltunk az elsők, akik a hormon 1-24 szekvenciáját ezzel a módszerrel előállítottuk.

1973-ban kötöttem házasságot Kiss Zsuzsanna Ilonával, évfolyamtársammal, akivel azóta is minden örömet, bajomat, gondomat megosztom. Két gyermekünk született, János és Zsuzsanna, mindketten a felsőoktatásban dolgoznak, mindketten egyetemi docensek. Pályakezdőként és friss házasként nem dűskáltunk az anyagiakban, ezért az egyetem után azonnal, 1974. július 15-én munkába álltunk. Szerencsénk volt, mert a Kaposvári Mezőgazdasági Főiskola Központi Laboratóriumában mindkettőnket alkalmaztak. Engem az aminosav-analizátor kezelésével bíztak meg, ami szinte folytonosságot jelentett diplomamunkám és a munkahelyemen kapott feladat között. Az akkori főnökömre, Dr. Walger Jánosra is jó szívvel emlékszem vissza, akitől elsősorban az emberekkel való bánásmód tekintetében tanultam sokat. A Főiskola folyamatos átszervezése, átalakítása miatt a munkahelyem neve többször változott, én viszont ugyanabban az épületben dolgoztam majd 40 éven át. Így dolgoztam a Kaposvári Mezőgazdasági Főiskola, majd annak jogutóda a PANNON Agrártudományi Egyetem Kaposvári Állattenyésztési Karának Központi Laboratóriumában, ill. Kémiai-Biokémiai Osztályán, ahol 1978. óta a Takarmánykémiai Laboratórium vezetője voltam, közben végigjárva a fokozatokat először tudományos segédmunkatárs, tudományos munkatárs majd tudományos főmunkatárs besorolást kaptam. 1992. augusztusától egyetemi docensnek, 1996. augusztusától pedig egyetemi tanárnak neveztek ki. 1997. január 1-től 2000. január 1-ig a Kar tudományos dékán-helyettese, 1997-től az Acta Agraria Kaposváriensis alapító főszerkesztője, 1996–1998. között a Központi Laboratórium vezetője, majd a Kémiai Intézet megbízott igazgatója voltam. 1997. március 1-től Széchenyi professzori ösztöndíjas (két egymást követő ciklusban), 1998. augusztus 1-től (majd a második ciklusban 2003. augusztus 1-től) a Kémiai Intézet igazgatója és a Biokémiai és Élelmiszerkémiai Tanszék vezetője voltam. 2006. január 1-től az újjászervezett Kémiai-Biokémiai Tanszék vezetői és az Analitikai Laboratórium önálló egység igazgatói pozícióját töltöttem be. A Kaposvári Egyetemen, felmentésemig, a Kar tudományos dékán-helyettese, a Kémiai Intézet igazgatója, és már harmadik ciklusban a Biokémiai Tanszék vezetője voltam.

1996-tól óraadó, 2003-tól 2010-ig meghívásos jogviszonyú egyetemi tanár voltam a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrumának Élelmiszer-tudományi Intézetében, majd 2014-től ugyanitt, már főállású oktatóként az Élelmi-

szertechológia Intézet igazgatójának neveztek ki. A Debreceni Egyetemen pályafutásomat a 70. életévem elérésekor fejeztem be.

2002-től óraadóként kezdtem tanítani a SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karán, majd 2005-től 2010-ig az Élelmiszer-tudományi Tanszék alapító tanszékvezetője voltam, melyet követően 2020. augusztus 31-ig főállású oktatóként tevékenykedtem a tanszéken. 2008-tól 2019-ig az Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria különszámainak felelős szerkesztője voltam.

1975–1979. között megszereztem második diplomámat a Kaposvári Mezőgazdasági Főiskola Állattenyésztési Karán, majd 1980-ban megvédtem *A koloszttrum és a tej aminosav és fehérjefrakcióinak vizsgálata eltérő genotípusú szarvasmarha populációkban* c. doktori értekezésemet a Gödöllői Agrártudományi Egyetemen. Doktori oklevelem minősítése summa cum laude. 1982-ben egy évig levelező aspiráns voltam, majd *A koloszttrum és a tej összetétele eltérő genotípusú szarvasmarháknál* c. kandidátusi értekezésemet megvédve 1984. október 18-án az MTA TMB a mezőgazdaság-tudomány kandidátusává nyilvánított. 1985-ben a Gödöllői Agrártudományi Egyetem által szervezett egy éves tanfolyamot elvégezve pedagógiai alapképzettséget szereztem.

1995. június 23-án megvédtem *Kérdő háziállataink koloszttrum és tej összetétele és néhány összetevő analitikája* c. akadémiai doktori értekezésemet, így 1995. november 17-én az MTA Doktori Tanácsa a mezőgazdasági tudomány doktorává nyilvánított. 1995. október 26-án sikeresen *habilitáltam a PANNON Agrártudományi Egyetemen* élelmiszerkémia-biokémia tárgykörökből, majd *1996-ban egyetemi tanárrá neveztek ki a Kar Kémiai-Biokémiai tanszékére*.

1985-től vettem részt az egyetemen folyó oktató munkában. Hosszú pályafutásom alatt több egyetemen és karon felelős oktatója voltam az *Általános kémia*, a *Biokémia*, az *Élelmiszer-kémia*, az *Élelmiszer analitika*, az *Élelmiszerhamisítás*, a *Funkcionális élelmiszerek*, az *Elválasztás-technika*, a *Tejipari technológia* valamint a *Mezőgazdasági kémia* és az *Agrártermelés kémiai alapjai* tárgyaknak. Fakultatív tárgyaim az *Élelmiszer- és takarmányfehérjék minősítése*, az *Élelmiszer- és takarmányanalitika* és a *Tej és tejtermékek szerepe az emberi táplálkozásban* voltak, és esetenként felkértek néhány kutatási területemhez kapcsolódó témában élettani, tejgazdaságtani és archeológiai előadás megtartására egyetemi hallgatók számára.

A PhD képzés keretében az Állati termék előállítás élettana és biokémiája tárgy keretében *A tejképzés biokémiája és élettana* és *A kolosztrum és a tej összetétele, és az azt befolyásoló tényezők* című előadásokat tartottam, és ugyancsak tartottam előadást *Elválasztástechnikából, Élelmiszeranalitikából és Takarmányanalitikából*. Külföldi PhD hallgatóknak és az idegen nyelvű képzés során az *Amino acids in animal nutrition* tárgy keretében tartottam 16 óra, *Biochemistry* tárgyból 42 óra, *Food chemistry* tárgyból 42 óra, *Food analytical chemistry* tárgyból 28 óra, *Separation Sciences* tárgyból pedig 42 óra előadást.

A mai napig (több esetben társszerzőimmel együtt) írtam 43 tankönyvet, könyvrészletet, illetve könyvfejezetet, 50 elméleti és gyakorlati egyetemi/főiskolai jegyzetet, oktatási segédanyagot (egy részüket angolul), melyekből Magyarország és Székelyföld több egyetemén és főiskoláján tanulnak a hallgatók.

1982-ben a *MTA Pécsi Akadémiai Bizottságának első díját*, 1985-ben pedig – feleségemmel együtt – a *MTA Kémiai Osztályának Erdey László díját* kaptuk analitikai-kémiai kutatásokért. Az általam vezetett kutatócsoportból kollégáim négy-szer nyerték el a MTA PAB kiemelt első, ill. első díját. Az általunk kidolgozott takarmány- és élelmiszeranalitikai módszerek többsége bekerült a Mezőgazdasági Minőség Intézet által szerkesztett Takarmánykódex analitikai részébe. Ezeket a módszereket hazánk több analitikai laboratóriumában rutinszerűen alkalmazzák.

1985-ben a Mezőgazdasági és Élelmiszerügyi Minisztériumtól a *Kiváló munkáért* kitüntetést kaptam. 1995-ben, 1997-ben és 2006-ban a Kaposvári Gazdászok, a Kar hallgatói, *Agyagkatedra* díjban részesítettek, 1996-ban pedig az *Egyetem kiváló dolgozója* kitüntetést kaptam. 1985. óta titkára, 1995-től 2000-ig elnöke voltam a Somogyi Tudósklubnak. Tagja voltam a Somogy Megyei Önkormányzat, és Kaposvár Megyei Jogú Város Önkormányzata Kulturális és Tudományos Bizottságának. 1992-óta a Tudományos Életért Közalapítványnak, 2000-től pedig a Somogy Labdarúgó Játékvezetőiért Alapítványnak voltam elnöke.

Munkám elismeréseként Somogy Megye Önkormányzata 1992-ben *Alkotói Díjban* részesített, 1997-ben a *Tudományos Életért Közalapítvány aranygyűrűjét* nyertem el, 2001-ben pedig a *Pécsi Akadémiai Bizottság tudományszervezési díját* kaptam meg. 1997-ben elnyertem a *Széchenyi Professzori Ösztöndíjat*, 2005-ben, az indoklás szerint nemzetközi színvonalú oktatói-kutatói tevékenységemért a *Szent-Györgyi Albert díjat*, 2006-ban pedig a *Charles Simonyi kutatói ösztöndíjat*.

2007-ben a *Kaposvári Egyetem Alapítványának Nívódíját*, 2008-ban pedig a *Terrileti Prima (Primissima) Díjat* kaptam meg. 2012-ben Kaposvár Megyei Jogú Város Önkormányzatától a *Kaposvár Városért kitüntető díjat*, majd 2021-ben a *Pro Urbe Kaposvár kitüntető díjat* kaptam, 2017-ben pedig a *SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem kiváló oktatója* díjat nyertem el. 2020-ban a Magyarország Agrárminisztere az Életfa Bronz Plakettet adományozta számomra. 2020-ban a Sapiencia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, majd 2021-ben a Debreceni Egyetem *professor emeritus* címmel tüntetett ki.

2020-ig 183 tudományos közleményem jelent meg idegen nyelven, 304 előadást tartottam nemzetközi konferenciákon. Hazai tudományos közleményeim száma 165 és 344 előadást tartottam hazai konferenciákon, tudományos rendezvényeken vagy ismeretterjesztő eseményeken. Fentieken kívül írtam 101 ismeretterjesztő közleményt, újságcikket is, és szerkesztettem 85 tanulmánykötetet, ill. folyóiratszámot. Összes publikációim száma 1278, közleményeim kumulatív impakt faktora több, mint 70, amelyekre összesen kb. 2500 esetben hivatkoztak. A Science Direct szerint H-indexem 25 (2016. óta 16), i10-indexem pedig 48 (2016 óta 26).

Doktor képviselője voltam az MTA Agrártudományok Osztályának (2007–2010), tagja voltam az MTA Állattenyésztési, Állatnemesítési és Takarmányozási Szakbizottságának. Az MTA PAB Agrártudományi Szakbizottság elnöke, a PAB Kémiai Szakbizottságának tagja, az Analitikai Munkabizottság elnöke, a VEAB Iparrégészeti és Archeometriai Munkabizottságának és több tudományos és szakmai testületnek is voltam tagja.

Tanulmányúton jártam Lengyelországban, Csehszlovákiában, Angliában, Skóciában, Dániában, Hollandiában, Izlandon, Svédországban és Írországban. Szoros munkakapcsolatban voltam az Izlandi Marine Research Institut-tal, a Göteborgi Chalmers University Analytical and Marine Chemistry és Marine Geology Tanszékével, az Athéni Egyetem Food Technology valamint a Corki Egyetem Food Chemistry Tanszékével, és 18 évig dolgoztam a SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karának Élelmiszer-tudományi Tanszékén.

Ezekkel az intézetekkel közösen végzett analitikai-kémiai módszerfejlesztő munkáink közül kiemelkednek az aminosavak meghatározására és az aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására kidolgozott módszerek. Ha-

zánkban munkatársaimmal csak mi foglalkoztunk az aminosav racemizáción alapuló ember és állatcsontok korának meghatározásával és gyapjúszőnyegek korának becslésével. Az utóbbi időben élelmiszerek D-aminosav-tartalmát, ezen belül a D-triptofán-tartalmát vizsgáljuk, ill. kutatásainkat kiterjesztettük a konjugált linolsavak, a funkcionális élelmiszerek és az élelmiszer hamisítás irányába is.

Jelenleg készülök a nyugdíjas életre, de emellett több cégnél is dolgozok tudományos tanácsadóként.

Kaposvár, 2020. 09. 15.

2. EGYETEMI, FŐISKOLAI MUNKÁM SORÁN VÉGZETT OKTATÓI-KUTATÓI TEVÉKENYSÉGEM

1974. július 15-én kezdtem el dolgozni Kaposváron a Mezőgazdasági Főiskolán tudományos segédmunkatársként, majd 2020. július 8-án a Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertechnológiai Intézetéből, 2020. augusztus 31-én pedig a SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem (EMTE) Csíkszeredai Karának Élelmiszertudományi tanszékéről egyetemi tanárként mentem nyugdíjba. Kaposváron majd 40 évig oktattam a hallgatókat, de közben Debrecenben is több évig és több ciklusban voltam meghívásos jogviszonyú egyetemi tanár, majd 2014-től főállású egyetemi tanárként, az Élelmiszertechnológiai Intézet igazgatójának nevezték ki, mely kinevezés a 65. születésnapomon megszűnt. Ezt követően beosztott egyetemi tanárként dolgoztam az intézetben nyugdíjazásomig. 2002. szeptemberétől először óraadóként, majd később főállásban tanítottam a SAPIENTIA EMTE Csíkszeredai Karán, és ezzel párhuzamosan 2014-től az EMTE Sepsiszentgyörgyi Tagozatán is megbíztak az Általános és szerves kémia, valamint a Biokémia oktatásával.

Pályafutásom alatt, szerzőtársaimmal együtt, írtunk 45 könyvet vagy könyvrészletet, egy ismeretterjesztő könyvrészletet, egy angol-magyar, magyar-angol labdarúgó játékvezetői szakszótárt és általános kifejezések gyűjteményét, mely a maga korában unikum volt Magyarországon. Egyetemi jegyzeteink száma 50-re tehető, melyben benne vannak az oktatási segédanyagok, a könyvek rövidített kivonatai (Minimáliák), a gyakorlati jegyzetek és a hallgatóknak szóló rövidebb-hosszabb útmutatók is.

Szerkesztettünk ezen túl konferencia köteteket, oktatók és kutatók publikációs jegyzékét, a Karon született új tudományos eredmények összefoglalóját, az Acta Agraria Kaposváriensis több évfolyamát, majd a csíkszeredai éveim alatt az Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria számát, és ott is szerkesztettem az oktatók és kutatók publikációs jegyzékét. Mindkét említett folyóiratnak szerkesztője, ill. főszerkesztője voltam. A szerkesztett folyóiratok és egyéb anyagok száma összesen 82. Erről a munkáról beszámolni, vagy akár csak a publikációkat bemutatni az

adott területi korlátok miatt nagyon nehéz, inkább csak a számomra fontosabb, emlékezetesebb eseményeket, könyveket, jegyzeteket emelném ki.

2.1. A Kaposvári Egyetemen és annak jogelődjeinél végzett tevékenységem

A József Attila Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Vegyész Szak elvégzése után a Mezőgazdasági Főiskola Központi laboratóriumában kezdtem el dolgozni, ahol első munkám egy aminosav-analizátor üzembe állítása volt. Ezt követően rutinszerűen dolgoztam több nagyobb műszeren, és volt szerencsém megtanulni a legfontosabb takarmány- és élelmiszeranalitikai eljárásokat. Közben megszereztem második diplomámat az állattenyésztés területéről, egyetemi doktori oklevelet szereztem a Gödöllői Agrártudományi Egyetemen, majd 1984-ben a kandidátusi fokozatot nyertem el az MTA Tudományos Minősítő Bizottságtól. Közben tudományos segédmunkatársból öt év alatt tudományos munkatárs, majd tudományos főmunkatárs lettem, melyet követően átsoroltak oktatói munkakörbe egyetemi docensként, és a habilitáció (1995) majd az akadémiai doktori fokozat (1995) megszerzését követően egyetemi tanárnak (1996) nevezték ki. Ezt követően ismételtan egyetemi tanárnak nevezték ki a Debreceni Egyetemre (2002), majd harmadszorra a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetemre (2006). Így elmondhatom, hogy két magyar államfővel, Göncz Árpáddal és Mádl Ferencel is kezdet tudtam fogni, a román államfővel viszont nem jött össze a kézfogás, csak a kinevezést kaptam meg aláírásával.

Örök életemben szerettem volna oktatni, ezért először nem is a vegyész szakra akartam beadni jelentkezésemet, hanem biológia-kémia tanár szerettem volna lenni, de az utolsó pillanatban mégis a vegyész szak mellett döntöttem. Ezért aztán már akkor, mikor még nem is voltam oktatói státuszban, örültem minden kis szakmámba vágó részfeladatnak, amit elmondhattam a hallgatóknak. A 80-as években kormeghatározással, fehérjehidrolízissel kapcsolatos írásaim jelentek meg szakkönyvekben, majd a Magyar Takarmánykódexbe írtam spektrofotometriás és ioncserés oszlopkromatográfiás analitikai módszerekről könyvfejezeteket. A 90-es években jelentek meg írásaink a Múzeumi közleményekben, a Táplálkozás egészségkönyvében, és egy Tejgazdaságtan című szerkesztett kötetben.

Az első önálló könyvünk (feleségemmel közösen írtuk) a *Tej és tejtermékek szerepe a táplálkozásban* című volt, melyet a Mezőgazda Kiadó adott ki, és amelyből már a hallgatók is részben hozzájuthattak a Tejgazdaságtan tárggyal kapcsolatos

ismeretekhez. A Mezőgazda Kiadóval jó volt a kapcsolatom, hisz a későbbiekben náluk jelentek meg az *Élelmiszerkémia*, az *Élelmiszer- és takarmányfehérjék minősítése* valamint a *Biokémia – állattenyésztőknek* című könyveink, amelyek közül az utolsó kettő nívódíjat is nyert.

Egyetemi docensi (1992. augusztusától), majd egyetemi tanári (1996. augusztusától) kinevezésem után a fő hangsúlyt, a kutató munka mellett, az oktatásra és az oktatással kapcsolatos szervezési tevékenységre fordítottam. 1997. január 1-től 2000. január 1-ig a Kar tudományos dékán-helyettese, 1997-től az Acta Agraria Kaposváriensis alapító főszerkesztője, 1996–1998. között a Központi Laboratórium vezetője, majd a Kémiai Intézet megbízott igazgatója voltam. 1997. március 1-től Széchenyi professzori ösztöndíjas (két egymást követő ciklusban), 1998. augusztus 1-től (majd a második ciklusban 2003. augusztus 1-től) a Kémiai Intézet igazgatója és a Biokémiai és Élelmiszerkémiai Tanszék vezetője voltam. 2006. január 1-től az újjászervezett Kémiai-Biokémiai Tanszék vezetői és az Analitikai Laboratórium önálló egység igazgatói pozícióját töltöttem be. A Kaposvári Egyetemen, felmentésemig, a Kar tudományos dékán-helyettese, a Kémiai Intézet igazgatója, és már harmadik ciklusban a Biokémiai tanszék vezetője voltam.

2.2. A Debreceni Egyetemen végzett tevékenységem

A Kaposvári Egyetemen végzett munkámmal párhuzamosan 1996-tól óraadó, 2003-tól 2010-ig meghívásos jogviszonyú egyetemi tanár voltam a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrumának Élelmiszer-tudományi Intézetében, majd 2014-től a Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertechnológiai Intézetében, már főállású oktatóként, az Élelmiszer-technológia Intézet igazgatójának nevezték ki. Hasonló tárgyakat oktattam magyarul és angolul, mint a Kaposvári Egyetemen, de ehhez jött még a Funkcionális élelmiszerek, az Elválasztástechnika és az Élelmiszerhamisítás tárgyak, melyeknek tematikáját, a tárgy oktatásához szükséges segédanyagokat én dolgoztam ki. Oktattam a Természettudományi Karon is élelmiszer-analitikát, a visszajelzések alapján a hallgatók meglegedésére.

A Karon törzstagja voltam, megosztva, több Doktori Iskolának is, de végül az Állattudományi Doktori Iskolában végeztem tevékenységem nagyobb részét. A rövid hat és fél év alatt Erdélyből sikerült négy PhD hallgatót beiskolázni, akik közül egy fő doktori fokozatot szerzett. Jelenleg három fő doktorandusz hallgatóm

van, akik közül az egyik a tej és tejtermékek szeléntartalmának növelésével, a másik fehérje- és aminosav-analitikai új fotometriás módszerek kidolgozásával és a sajt érettségi fokának meghatározásával foglalkozik a szabadaminosav-tartalom alapján, a harmadik pedig prebiotikumok és rezisztens keményítő előállítását kísérli meg.

2.3. A Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetemen végzett tevékenységem

Ugyanebben az időszakban 2002-től óraadóként kezdtem tanítani a SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karán, ahol gyakorlatilag mindent a nulláról kellett felépíteni, mert az üres termekben és egy-két nem üzemelő műszeren kívül semmi nem volt a tanszéken. Itt 2005-től 2010-ig az Élelmiszer-tudományi Tanszék alapító tanszékvezetője voltam, melyet követően 2020. augusztus 31-ig főállású oktatóként tevékenykedtem.

Erdélyben jó kapcsolatot tudtam kialakítani a Kolozsvári Scientia Kiadóval, melyet követően sorozatban jelentek meg az élelmiszertudományi képzésre szabottan írt könyveink, mint a *Biokémia*, az *Élelmiszerkémia*, a *Tejipari technológia és minőség-ellenőrzés*, az *Élelmiszer fehérjék minősítése*, az *Élelmiszeranalitika – Válogatott fejezetek*, a *Tejipari technológia – Tej és tejtermékek a táplálkozásban*, az *Élelmiszerhamisítás és kimutatása*, a *Funkcionális élelmiszerek*, az *Általános kémia agrármérnököknek*, a *Biokémia agrármérnököknek* és az *Analitikai kémia élelmiszer-mérnököknek*.

Mindezeket azért itt írom le, mert mindhárom egyetemen, ugyan más és más szakiránynak, de azonos, vagy nagyon hasonló tárgyakat oktattam, így a három egyetemen végzett munkám erősen támogatta egymást.

2.4. A három egyetemen végzett oktató munkám összefoglalása

Hosszú pályafutásom alatt a három egyetemen és több karon felelős oktatója voltam az *Általános kémia*, a *Biokémia*, az *Élelmiszer-kémia*, az *Élelmiszer analitika*, az *Élelmiszerhamisítás*, a *Funkcionális élelmiszerek*, az *Elválasztás-technika*, a *Tejipari technológia* valamint a *Mezőgazdasági kémia* és az *Agrártermelés kémiai alapjai* tárgyaknak. Fakultatív tárgyaik az *Élelmiszer- és takarmányfehérjék minősítése*, az *Élelmiszer- és takarmányanalitika* és a *Tej és tejtermékek szerepe az emberi táplálkozásban* voltak, és esetenként felkértek néhány kutatási területemhez kapcsolódó

témában élettani, tejgazdaságtani és archeológiai előadás megtartására egyetemi hallgatók számára.

A PhD képzés keretében az *Állati termék előállítás élettana és biokémiája* tantárgy keretében *A tejképzés biokémiája és élettana* és *A kolosztrum és a tej összetétele, és az azt befolyásoló tényezők* című előadásokat tartottam, és ugyancsak tartottam előadást *Elválasztástechnikából*, *Élelmiszeranalitikából* és *Takarmányanalitikából*. Külföldi PhD hallgatóknak és az idegen nyelvű képzés során az *Amino acids in animal nutrition* tárgy keretében tartottam 16 óra, *Biochemistry* tárgyból 42 óra, *Food chemistry* tárgyból 42 óra, *Food analytical chemistry* tárgyból 28 óra, *Separation Sciences* tárgyból pedig ugyancsak 42 óra előadást.

Mindegyik előzőekben felsorolt tárgyból, az angol nyelvűeket is beleértve, készítettünk PowerPointos prezentációkat, a tárgy jellegétől vagy óraszámától függően mindegyikből 600–1200 db. slide-dal, Csíkszeredában és Sepsiszentgyörgyön pedig minimáliákat, ami teljesen új fogalom volt számomra. Ez azt jelentette, hogy pl. egy 350 oldalas tankönyvből, a tárgy teljes anyagából, csináltunk egy 45–55 oldalas kivonatot, ami a könyv esszenciáját tartalmazta. A cél az volt, hogy ha a hallgató ezt a minimális anyagot jól tudta, akkor megkaphatta a legkisebb átmenő jegyet (ez Erdélyben az ötös volt), illetve ha jól felkészült a teljes anyagból, a Minimália alkalmas volt arra, hogy vizsga előtt a kivonatot rövid idő alatt még egyszer át tudja nézni.

A tankönyveken kívül írtunk több magyar és angol nyelvű könyvrészletet is. Időrendi sorrendben haladva a legfontosabbak:

- Use of amino acids and amino acid racemization for age determination in archaeometry. In: Progress in biological chirality. Elsevier Kiadó, Oxford, 2004.
- Chemical composition and metabolic importance of feed ingredients. In: Veterinary nutrition and dietetics. University lecture note. Ed.: Fekete, S.Gy. SZIU Faculty of Veterinary Science, Budapest, 2005.
- Metabolic significance and analysis of feed ingredients. Chapter IV: In: Veterinary nutrition and dietetics. Ed.: Fekete, S.Gy. Pro Scientia Veterinaria Hungarica. Budapest, 2008.
- A tehéntej táplálkozástudományi szempontból legfontosabb összetevői. I. Fehérjetartalom és aminosav-összetétel, zsírtartalom és zsírsav-összetétel. II. Laktóz-, ásványianyag- és vitamintartalom. A juh- és kecsketej táplálkozás-

- tudományi szempontból legfontosabb összetevői. In: A tej szerepe a humán táplálkozásban. (Szerk: Kukovics S.) Melánia Kiadó, Budapest, 2009.
- Fermented foods and health. 4 Conjugated linoleic acid (CLA) production in fermented foods. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2014.
 - Modern methods of food analysis. University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Science and Environmental Management. 2015.
 - Az élelmiszermeghatározás analitikai módszerei. Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar. 2015.
 - A hidegvérű ló tejtermelő képessége, és az erre alapozott árutermelés termelés-technológiája. A kancatej összetétele. A kancatej felhasználásának lehetőségei. In: Mihók S.: A hidegvérű ló. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó. Budapest, 2017.
 - Ismeretterjesztő kategóriába sorolnám azt a szakszótárt és kifejezések gyűjteményét, amit a magyar labdarúgó játékvezetőknek állítottam össze, a Somogy megye tudományos életéről szóló könyvfejezetet, valamint a ketogén diétáról és a ketózisról írtakat. Ezek:
 - Tudományos élet. In: Magyarország megyéi: Somogy. Kossuth Könyvkiadó, Budapest, 1988.
 - Angol-magyar, magyar-angol labdarúgó játékvezetői szakszótár és általános kifejezések gyűjteménye. Somogy Megyei Labdarúgó Szövetség, Kaposvár, 2003.
 - Ketózis, ketogén diéta hatása az emberi szervezetre. In: Schobert N.: Keto. Fogyni bárki tud. Datapack Bt. Leányfalu. 2019.
 - Az oktatási segédanyagok közül kiemelném a Kaposvári Egyetemen a TA-MOP-4.1.2-08/1/A-2009-0059 projekt keretében írt *Élelmiszerkémia oktatási segédletet*, az *Élelmiszerkémia prezentációt*, az *Introduction to the Chemistry of Foods and Forages Educational Supplement-et* és *Presentation-t*, a *Biochemistry Presentation-t* és *Biochemistry Practice-t*, a *Food Analysis Presentation-t* és *Food Analysis Practice-t*, valamint a *Scientific Writing Presentation-t*, melyek mind megtalálhatók a www.tankonyvtar.hu címen.
 - A Debreceni Egyetemen a TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014. projekt keretében írtuk az *Élelmiszerek összetételének gázkromatográfiás vizsgálata*, az *Élelmiszerek összetételének folyadékkromatográfiás vizsgálata* és a *GC-MS és*

- HPLC-MS alkalmazása élelmiszer szennyezők meghatározására* című anyagokat, melyek az egyetem honlapjáról letölthetők. Ugyancsak készítettünk oktatási segédanyagokat *Funkcionális élelmiszerek*, *Élelmiszerhamisítás*, *Az állati eredetű élelmiszer-előállítás biokémiája* és *Tej és tejtermékek, mint funkcionális élelmiszerek* címmel. Az oktatási segédanyagok a témától függően mintegy 250–850 slide-ot tartalmaznak, és hozzáférhetők mindenki számára.
- Az általam vagy munkatársaimmal közösen szerkesztett tanulmánykötetek, folyóiratszámok (Acta Agraria Kaposváriensis, Acta Universitatis Sapientiae. Alimentaria), tudományos eredmények, publikációs jegyzékek, konferencia kötetek száma 85 db. Közülük említésre méltónak, ill. kiemelkedőnek tartom a következőket:
 - A Pannon Agrártudományi Egyetem Állattenyésztési Kar oktatóinak és kutatóinak publikációs jegyzéke 1988–1996. PATE Állattenyésztési Kar, Kaposvár, 1997.
 - Új tudományos eredmények. Pannon Agrártudományi Egyetem, Állattenyésztési Kar Kaposvár, 1985–1995. Recent scientific findings. Pannon Agricultural University, Faculty of Animal Science Kaposvár, 1985–1995. Kaposvár, 1999.
 - Proceedings of the 7th International Symposium Animal Science Days. The present situation and task to be accomplished in animal production prior to entry into the European Union. Acta Agraria Kaposváriensis. 1999.
 - Proceedings of the 10th International Symposium Animal Science Days. Environment friendly and EU conform animal husbandry. Acta Agraria Kaposváriensis. 2002.
 - Proceedings of the 14th International Symposium Animal Science Days. Future trends of research on food quality and safety. Acta Agraria Kaposváriensis. 2006.
 - A SAPIENTIA EMTE Csíkszeredai Műszaki Intézet oktatóinak publikációs listája 2002–2007. 2008.
 - Proceedings of the 14th International Symposium Animal Science Days. Possibilities and delimitations of extensive animal husbandry. Acta Agraria Kaposváriensis. 2010.
 - Új tudományos eredmények. Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, 1996–2010. Recent scientific findings. Kaposvár University, Faculty of Animal Science, 1996–2010. 2011.

- Új tudományos eredmények. Kaposvári Egyetem, Gazdaságtudományi Kar, Művészeti Kar, Pedagógiai Kar, 1996-2010. Recent scientific findings. Kaposvár University, Faculty of Economic Science, Faculty of Arts, Faculty of Pedagogy, 1996-2010. 2011.

2.5. Az oktatás mellett végzett tudományos tevékenységem

Sok más tapasztalt kolléga mellett én is vallom, hogy korszerű, naprakész ismeretekkel ellátni a hallgatókat csak akkor lehet, ha az egyetemi oktató pedagógiai munkája mellett az oktatott tárgyakhoz igazodó tudományos tevékenységet is folytat. De szükségszerű a tudományos tevékenység azért is, mert a hallgatók bevonását követően az ennek során elért eredményekből születnek a szakdolgozatok, a diploma dolgozatok és a doktori disszertációk. Fontos a kutatómunka azért is, mert az oktatói ranglétrán úgy lehet csak előrehaladni, ha az ember minimum tudományos fokozatot szerez, illetve megszerzi az akadémiai doktori címet. Sok esetben a professzori kinevezésre esély sincs, ha nincs meg az akadémiai doktori cím. Összegezve tehát egy jó egyetemi oktató az oktatás mellett intenzív kutató munkát is kell hogy folytasson ahhoz, hogy azzal támogatni tudja az egyetemi oktatást, hogy naprakész legyen az általa oktatott tudományággal, illetve hogy előre tudjon haladni az egyetemi ranglétrán.

Tudományos tevékenységemmel, a munkatársaimmal együtt elért új tudományos eredményekkel három fejezet foglalkozik, ezért itt csak egy összesítést szeretnék erről a területről adni, illetve a legfontosabb publikációimat szeretném kiemelni.

2020-ig 183 tudományos közleményem jelent meg idegen nyelven, 304 előadást tartottam nemzetközi konferenciákon. Hazai tudományos közleményeim száma 165 és 344 előadást tartottam hazai konferenciákon, tudományos rendezvényeken vagy ismeretterjesztő eseményeken. Fentieken kívül írtam 101 ismeretterjesztő közleményt, újságcikket is, és szerkesztettem 85 tanulmánykötetet, ill. folyóiratszámot. Összes publikációim száma 1278, közleményeim kumulatív impakt faktora több mint 70, amelyekre összesen kb. 2500 esetben hivatkoztak. A Science Direct szerint H-indexem 25 (2016. óta 16), i10 indexem pedig 48 (2016. óta 26).

2.5.1. Az idegen nyelven megjelent legfontosabb tudományos közleményeim

- Csapó, J. – Tóth-Pósfai, I. – Csapó-Kiss, Zs.: Separation of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography in the form of 2-sulfonic acid alanyl dipeptides. *Amino Acids*. 1990. 96-101.
- Csapó, J. – Tóth-Pósfai, I. – Csapó-Kiss, Zs.: Separation of D- and L-amino acids by ion exchange column chromatography in the form of alanyl dipeptides. *Amino Acids*. 1991. 1. 331-337.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Martin, T.G. – Szentpeteri, J. – Wolf, Gy.: Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *International Dairy Journal*. 1994. 4. 5. 445-458.
- Csapó, J. – Folestad, S. – Tivesten, A. – Csapó-Kiss, Zs.: Mercaptoethanesulfonic acid as a protecting and hydrolysing agent for the determination of the amino acid composition of proteins using an elevated temperature for protein hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*. 1994. 289. 1. 105-111.
- Csapó, J. – Némethy, S. – Folestad, S. – Tivesten, A. – Martin, T.G. – Csapó-Kiss, Zs.: Age determination based on amino acid racemization. A new possibility. *Amino Acids*. 1994. 7. 317-325.
- Csapó, J. – Stefler, J. – Martin, T.G. – Makray, S. – Csapó-Kiss, Zs.: Composition of mare's colostrum and milk. Fat content and fatty acid composition. *International Dairy Journal*. 1995. 5. 393-402.
- Csapó-Kiss, Zs. – Stefler, J. – Martin, T.G. – Makray, S. – Csapó, J.: Composition of mare's colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and biological value. *International Dairy Journal*. 1995. 5. 403-415.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Folestad, S. – Orwar, O. – Tivesten, A. – Martin, T.G. – Némethy, S.: Age estimation of old carpets based on cystine and cysteic acid content. *Analytica Chimica Acta*. 1995. 300. 1-3. 313-320.
- Csapó, J. – Martin, T.G. – Csapó-Kiss, Zs. – Stefler, J. – Némethy, S.: Influence of udder inflammation on the D-amino acid content of milk. *Journal of Dairy Science*. 1995. 78. 2375-2381.
- Csapó, J. – Martin, T.G. – Csapó-Kiss, Zs. – Házás, Z.: Protein, fats, vitamin and mineral concentrations in porcine colostrum and milk from parturition to 60 days. *International Dairy Journal*. 1996. 6. 881-902.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Wágner, L. – Tálos, T. – Martin, T.G. – Némethy, S. – Folestad, S. – Tivesten, A.: Hydrolysis of proteins performed at

- high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids. *Analytica Chimica Acta*. 1997. 339. 99-107.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J. Jr.: Use of the amino acids and amino acid racemization for age determination in archaeometry. *Trends in Analytical Chemistry*. 1998. 17. 3. 140-148.
 - Varga-Visi, É. – Terlaky-Balla, É. – Pohn, G. – Kametler, L. – Csapó, J.: RP-HPLC determination of L- and D-cystine and cysteine as cysteic acid. *Chromatographia*. 2000. 51. 325-327.
 - Csapó, J. – Schmidt, J. – Csapó-Kiss, Zs.: Determination of protein of bacterial origin. A review. *Trends in Analytical Chemistry*. 2001. 20. 1. 42-48.
 - Nyberg, J. – Csapó, J. – Björn, A.M. – Winter, A.: Changes in the D- and L-content of aspartic acid, glutamic acid, and alanine in a sclerectinian coral over the last 300 years. *Organic Geochemistry*. 2001. 32. 5. 623-632.
 - Csapó, J. – Schmidt, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Varga-Visi, É. – Pohn, G. – Csokona, É.: Quantitative determination of protein of bacterial origin on the basis of D-aspartic acid and D-glutamic acid content. *Chromatographia*. 2002. 56. 169-171.
 - Collins, M.J. – Nielsen-Marsh, C.M. – Hiller, J. – Smith, C.I. – Roberts, J.P. – Prigodich, R.V. – Wess, T.J. – Csapó, J. – Millard, A.R. – Turner-Walker, G.: The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*. 2002. 44. 3. 383-394.
 - Nyberg, J. – Malmgren, B. – Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J. jun.: Age estimation of coral based on amino acid composition. *British Archaeological Research, Centr. Eur. Ser.* 2002. 1. 99-101.
 - Csapó, J. – Pohn, G. – Varga-Visi, É. – Csapó-Kiss, Zs. – Terlaky-Balla, É.: Mercaptoethanesulphonic acid as the reductive thiol-containing reagent employed for the derivatization on amino acids with o-phthalaldehyde analysis. *Chromatographia*. 2004. 60. 231-234.
 - Csapó, J. – Varga-Visi, É. – Lóki, K. – Albert, Cs.: Analysis of the racemization of the tryptophan. *Chromatographia*. 2006. 63. 101-104.
 - Csapó, J. – Albert, Cs. – Lóki, K. – Csapó-Kiss, Zs. – Varga-Visi, É.: Quantitative determination of the protein of bacterial origin based on D-amino acid

- content. *D-amino acids: a new frontier in amino acid and protein research*. Ed.: Ryuichi Konno. 2006. 123-133.
- Csapó, J. – Varga-Visi, É. – Lóki, K. – Albet, Cs.: The influence of manufacture on the free D-amino acid content of Cheddar cheese. *Amino Acids*. 2007. 32. 1. 39-44.
 - Csapó, J. – Varga-Visi, É. – Lóki, K. – Albet, Cs. – Salamon, Sz.: The influence of the extrusion on the racemization of the amino acids. *Amino Acids*. 2007. 34. 2. 287-292.
 - Kehagias, C. – Csapó, J. – Konteles, S. – Kolokitha, E. – Koulouris, S. – Csapó-Kiss, Zs.: Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cows', ewes', goats' milk and modified whey powder products. *International Dairy Journal*. 2008. 18. 396-402.
 - Csapó, J. – Vargáné Visi, É.: Fermented foods and health. 4 Conjugated linoleic acid (CLA) production in fermented foods. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. 2014. 75-105.

Ezek közül a legtöbb hivatkozást az *Archaeometry* folyóiratban megjelent The survival of organic matter in bone: a review című cikkünkre kaptuk, de büszke vagyok a *Trends in analytical Chemistry*-ben, a *Chromatography*-ban, az *Analytica Chimica Acta*-ban, a *Journal of Dairy Science*-ben, vagy az *International Dairy Journal*-ben megjelent cikkeinkre. Felkérésre írtuk a Fermented foods and health. 4 Conjugated linoleic acid (CLA) production in fermented foods című összeállítást, ami a *Woodhead Publishing Series in Food Science* könyv keretében jelent meg, és a Technology and Nutrition. Quantitative determination of the protein of bacterial origin based on D-amino acid content című cikkre, mely a *D-amino acids: a new frontier in amino acid and protein research* összeállítás része.

Természetesen büszke vagyok a Magyarországon akadémiai lapokban megjelent közleményekre is, de azok idézettsége meg sem közelíti az előbb említett folyóiratokét. A magyarországi folyóiratok közül kiemelném az *Acta Alimentaria*t és az *Acta Agraria Kaposváriensist*, valamint a Kolozsváron megjelenő *Acta Universitatis Sapientiae-Alimentaria*-t, ahol ugyancsak sok, és véleményünk szerint nívós cikket tudunk publikálni. Az utóbbi időben az *Ecocycles* és a *Journal of Food Investigation* folyóiratokban is jelentek meg közleményeink.

2.5.2. A magyar nyelven megjelent tudományos közleményeim

Első tudományos munkám a Kaposvári Egyetem által kiadott *Szaktanácsok* folyóiratban jelent meg 1981-ben. Ezt követően több publikációm jelent meg az *Élelmiszervizsgálati Közleményekben*, a *Magyar Állatorvosok Lapjában* és az *Állattenyésztés és Takarmányozásban*. Miután elkezdtem tejjel és tejtermékekkel foglalkozni, sok közleményünk jelent meg a *Téjpar* folyóiratban, az utóbbi időben pedig a *Tejgazdaság* és az újjászervezett *Élelmiszervizsgálati Közleményekben* is. A *Szaktanácsok* megszűnése után sok cikket publikáltunk az *Acta Agrária Kaposváriensis* kétnyelvű folyóiratban, majd az újabb időkben, hosszabb megszakítás után, több közleményünk jelent meg a *Magyar Állatorvosok Lapjában*. Nehéz bármit is kiemelni a sok szép régi emléket felelevenítő szakcikk közül, de azért időrendi sorrendben megpróbálok párat.

- Csapó J. – Makai B.: Az aminosav és fehérjefrakciók változása holsteinfρίζ tehénkolosztrumában. *Szaktanácsok*. 1981. 1. 13-18.
- Csapó J.: Gyors módszer élelmiszerek és takarmányok cisztintartalmának meghatározására ioncserés oszlopkromatográfiával. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 1982. 4. 163-172.
- Csapó J. – Horváthné Albert M. – Makay B.: Holsteinfρίζ, magyartarka és magyartarka x holsteinfρίζ F₁ tehénkolosztrumának és átmeneti teje szárazanyag-, nyersfehérje-, savófehérje-, kazein- és nem fehérje nitrogén tartalmának összehasonlítása. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 1982. 6. 411-414.
- Csapó J. – Terlakyné Balla É. – Csapó J.-né – Makay B.: Holsteinfρίζ, magyartarka és magyartarka x holsteinfρίζ F₁ tehénkolosztrumának és átmeneti teje fehérjefrakciójának aminosav összetétele, valamint aminosav összetételének változása az ellés után. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 1982. 6. 415-419.
- Csapó J. – Csapó J.-né: A magyartarka, a holsteinfρίζ és a magyartarka x holsteinfρίζ tehénkolosztrumának és átmeneti teje ásványi anyag tartalmának vizsgálata a laktáció folyamán. *Téjpar*. 1982. 3. 55-60.
- Csapó J. – Csapó J.-né: A kolosztrum és a tej makro- és mikroelem tartalmának vizsgálata eltérő genotípusú szarvasmarhákban. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1983. 2. 109-121.
- Csapó J. – Csapó J.-né – Lengyel A.: A juh kolosztrumának és teje összetétele. *Téjpar*. 1986. 1. 11-24.

- Csapó J. – Csapó J.-né – Seregi J.: A kecsketej fehérjetartalma, aminosav összetétele, biológiai értéke és makro- és mikroelem tartalma. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1986. 4. 375-382.
- Csapó J. – Csapó J.-né – Horn A. – Sugár L. – Lemle Z. – Gyarmati T.: A szarvas, az őz és a dömrvad teje összetétele. I. A szarvas, az őz és a dömrvad teje fehérjetartalma, a fehérjefrakciók megoszlása és aminosav összetétele. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1986. 3. 295-304.
- Csapó J.-né – Horn A. – Csapó J. – Sugár L. – Nagy I. – Nagyné Gál E.: A szarvas, az őz és a dömrvad teje összetétele. II. A szarvas, az őz és a dömrvad teje makro- és mikroelem-, zsír és zsírsav-, valamint vitamintartalma. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1986. 6. 559-564.
- Csapó J. – Csapó J.-né: D- és L-aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával diasztereomer dipeptid formában. I. Az alanil dipeptidek szétválasztása és meghatározása. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 1989. 3. 140-152.
- Csapó J. – Csapó J.-né – Penke B.: D- és L-aminosavak elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával diasztereomer dipeptid formában. II. A 2-szulfonsav alanil dipeptidek szétválasztása és meghatározása. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 1989. 4. 201-208.
- Csapó J. – Gombos S. – Csapó J.-né – Tossenberger J.: A bakteriális eredetű fehérje mennyiségi meghatározása a bendőfolyadék és a béltartalom diaminopimelinsav és D-alanin tartalma alapján. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1991. 5. 431-441.
- Csapó J. – Wolf Gy. – Csapóné Kiss Zs. – Szentpéteri J. – Kiss J.: Ikréket ellett szarvasmarhák kolosztrumának összetétele. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1991. 3. 231-238.
- Csapó J. – Stefler J. – Herczog E. – Csapó J.-né: A kanca teje összetétele. I. A kolosztrum és a tej zsírtartalma és zsírsavösszetétele. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1993. 42. 131-146.
- Csapó J. – Stefler J. – Makray S. – Csapó J.-né: A kanca teje összetétele. II. A kolosztrum és a tej fehérjetartalma, fehérjefrakciói, aminosav összetétele és biológiai értéke. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1993. 42. 407-418.
- Csapó J. – Einarsson, S.: Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma. 1. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása az 1-/9-fluo-

- renil/etil-kloroformáttal történő származékképzés után fordított fázisú folyadékkromatográfiával. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 1993. 39. 290-302.
- Csapó J. – Csapóné Kiss Zs. – Kovách G. – Kováts D.: A koca koloszttrumának és tejének összetétele. 1. Zsírtartalom, zsírsavösszetétel, vitamin- és makro- és mikroelem tartalom. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1994. 5. 415-430.
 - Csapó J. – Csapóné Kiss Zs. – Kovách G. – Kováts D.: A koca koloszttrumának és tejének összetétele. 2. Fehérjetartalom, aminosav összetétel és biológiai érték. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 1994. 6. 541-552.
 - Csapó J. – Csapóné Kiss Zs. – Vargáné Visi É. – Andrásyné Baka G. – Terlakyné Balla É.: Élelmiszerek D-aminosav-tartalma. Irodalmi áttekintés. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 1997. 1. 1. 3-20.
 - Csapó J. – Schmidt J. – Csapóné Kiss Zs. – Holló G. – Holló I. – Wágner L. – Cenkvári É. – Vargáné Visi É. – Pohn G. – Andrásyné Baka G.: A bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározása a D-aszparaginsav, a D-glutaminsav és a diamino-pimelinsav tartalom alapján. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 2001. 50. 125-137.
 - Csapó J. – Vargáné Visi É. – Csapóné Kiss Zs. – Szakály S.: Tej és tejtermékek konjugált linolsav-tartalma I. Irodalmi összefoglaló. A tej konjugált linolsav-tartalmát befolyásoló tényezők. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 2001. 4. 1-12.
 - Csapó J. – Vargáné Visi É. – Csapóné Kiss Zs. – Szakály S.: Tej és tejtermékek konjugált linolsav-tartalma II. Irodalmi összefoglaló. A sajt, a vaj, egyéb tejtermékek és más élelmiszerek konjugált linolsav-tartalma. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 2001. 4. 13-21.
 - Csapó J. – Vargáné Visi É. – Csapóné Kiss Zs. – Szakály S.: Tej és tejtermékek konjugált linolsav-tartalma III. Irodalmi összefoglaló. A konjugált linolsavak és a tejszír biológiai hatása; konjugált linolsavak az emberi szervezetben. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 2001. 4. 23-38.
 - Csapó J. – Vargáné Visi É. – Csapóné Kiss Zs. – Szakály S.: Tej és tejtermékek konjugált linolsav-tartalma. 1. Közlemény: A nyerstej, a sajt, a vaj, egyéb tejtermékek és más élelmiszerek konjugált linolsav-tartalma. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 2003. 52. 2. 215-234.
 - Csapó J. – Vargáné Visi É. – Csapóné Kiss Zs. – Szakály S.: Tej és tejtermékek konjugált linolsav-tartalma. 2. Közlemény: A konjugált linolsavak és a tejszír

- biológiai hatása; konjugált linolsavak az emberi szervezetben. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 2003. 52. 4. 331-345.
- Csapó J. – Csapóné Kiss Zs. – Vargáné Visi É. – Albert Cs. – Salamon R.: Különböző technológiával készült sajtok összes szabad és szabad D-aminosav tartalma. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 2005. 9. 2. 61-71.
 - Albert Cs. – Salamon Sz. – Darvas L. – Kovács J. – Salamon R.V. – Albert B. – Csapóné Kiss Zs. – Csapó, J.: Egy magyarországi és egy erdélyi gypjas mamut korának meghatározása az aminosavak racemizációja alapján. *Csíki Székely Múzeum Évkönyve*. 2006. 359-372.
 - Csapó J. – Albert Cs. – Salamon Sz. – Darvas L. – Kovács J. – Salamon R.V. – Albert B. – Csapó-Kiss Zs.: Az aminosavak racemizációján alapuló korbecslés alkalmazása egy magyarországi és egy erdélyi mamutcsont és -agyar korának meghatározására. *Somogyi Múzeumok Közleményei*. 2008. 18. 139-146.
 - Albert Cs. – Csapó J.: A mikrohullámú pasztörözés hatása a tej aminosav-összetételére, szabadaminosav-tartalmára, biológiai értékére, B- és C-vitamin-, hasznosítható lizin-, lizino-alanin- és hidroximetil-furfurol-tartalmára. *Tejgazdaság*. 2008. 68. 1-2. 93-106.
 - Lóki K. – Pohn G. – András Cs.D. – Csapó J.: Takarmánnyal adagolt D-Trp akkumulációjának vizsgálata patkányokon. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 2012. 16. 2. 45-48.
 - Albert Cs. – Gombos S. – Salamon R.V. – Prokisch J. – Csapó J.: Magas tápértékű funkcionális élelmiszer előállítása a búzaliszt lizin kiegészítésével. (Production of high nutritional value functional food with the supplementation of the wheat flour with lysine). *Műszaki Szemle*. 2017. 70. 3-10.
 - Salamon Sz. – Csapó J.: A kancatej felhasználásának lehetőségei a humán táplálkozásban – Irodalmi összefoglaló. (Facilities for using the mare's milk in human nutrition. A review). *Tejgazdaság*. 2018. 75. 3-27.
 - Csapó J.: Magas tápértékű funkcionális élelmiszer, az Update Low Carb kenyér előállítása a búzaliszt magas fehérjetartalmú élelmiszer alapanyagokkal történő kiegészítésével. *MedicalOnline*. http://medicalonline.hu/tudomany/cikk/funkcionalis__egeszsegvedo_kenyer# 2018. 09. 17. 1-6.
 - Csapó J. – Albert Cs. – Szigeti T.J.: Funkcionális élelmiszerek. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 2019. 65. 1. 2340-2348.

- Csapó J. – Albert Cs. – Bakos G. – Nagy Á. – Szabari M. – Stefler J.: Kettes és hármas ikreket ellett tehének kolosztrumának összetétele. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 2019. 141. 463-470.
- Lóki K. – Csapó J.: Takarmányok D-triptofán tartalmának felszívódása és akkumulációja patkányok belső szerveiben. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 2019. 141. 553-560.
- Juhászné Tóth R. – Kiss D. – Zurbó Zs. – Csapó J.: A szelén szerepe a táplálkozásban; szelénrel dúsított tej és tejtermékek előállítása. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 2019. 141. 625-631.
- Juhászné Tóth R. – Csapó J.: Szelénrel dúsított gomolya és orda előállítása. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 2019. 65. 3. 2607-2611.
- Csapó J. – Albert Cs. – Szigeti T.J.: Tej és tejtermékek hamisítása, és a hamisítás kimutatására alkalmas analitikai módszerek. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 2020. 66. 1. 2803-2813.
- Zurbó Zs. – Csapó J.: Prebiotikumok előállítása a laktóz-almasav és a laktóz-citromsav reakciójával. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 2020. 66. 2. 2962-2968.

Mindegyik folyóirat szerkesztőségének, szerkesztő bizottságának, lektoraimnak hálás vagyok, hogy tanácsaikkal, észrevételeikkel jobbá tették cikkeinket, és hogy harmadik vagy negyedik alkalommal már különösebb korrekció nélkül el is fogadták azokat közlésre. Visszagondolva pályafutásom elejére, nem bánom a befektetett sok energiát, a lektorok néha elég szigorú, esetenként elutasító véleményét, mert nekik köszönhetem, hogy így 70 évesen (talán) megtanultam jó minőségű, lektoroknak kevés javítási lehetőséget adó cikkeket írni. A magyar nyelvű cikkekkkel kapcsolatban a gondom az, hogy egy minősítésnél, előre sorolásnál sokkal kisebb mértékben esnek latba, mint egy idegen nyelvű, de tapasztalatból tudom, hogy egy jó magyar nyelvű cikket megírni is sok erőfeszítésbe kerülhet.

2.5.3. Előadásaim nemzetközi konferenciákon

Őszintén megvallom, szerettem járni külföldi konferenciákra, mert saját pénzemről soha nem jutottam volna el olyan helyekre, ahova valamilyen támogatás segítségével eljutottam. Sokszor, a megpályázott támogatás kiegészítésével vittem magammal a családomat is, mert míg én a konferencián voltam, ők ismerkedtek

a várossal vagy a környékkel. Európán belül mindig autóval utaztam, mert így az én költségemből el tudtam magammal vinni a családomat is, és csak az ő ellátásukért meg szállásukért kellett plusz pénzt kifizetnem. A konferenciák közül emlékezetes volt számomra egy szicíliai, amikor 21 órás autózás után már nem tudtam tovább vezetni Palermóba, és mivel a kiválasztott szállodát nem találtuk meg, egy benzinkútnál aludtunk több mint 2000 km megtétele után. De ugyanezen emlékezetes volt Lillehammer, amikor egyhuzamban megtettük a Kaposvár-Lillehammer távolságot.

Konferencia révén jutottam el Indiába, ahonnan alig vártam, hogy hazamehessek, de amikor lecsillapodtak bennem az indulatok, halványultak a rossz élmények, azonnal visszamentem volna pár hétre. Hatalmas élmény volt látni Kairóban a piramisokat, és ugyancsak ilyen nagy élmény volt látni, a mexikói indiánok építette létesítményeket Teotihuacánban. Egyszer volt szerencsém az Egyesült Államokban részt venni egy konferencián a Chicago-hoz közeli Urbana városában, ahonnan ugyancsak nagyon jó érzésekkel jöttünk haza, és semmi sem igazolódott be azokból a félelmekből, amik bennünk voltak a kiutazásunk előtt.

Európában szinte mindenhol eljutottam a konferenciák révén. A legnagyobb élmény számomra Európában Róma, Athén, Párizs, és persze London voltak. Európán kívül előadást tartottam az Egyesült államokbeli Urbanában, Indiában Új Delhiben, Egyiptomban Kairóban, Mexikóban Mexikóvárosban, Európában Nagy Britanniában Edinburghben, Bradfordban, Liverpoolban, Olaszországban Modenában, Siennában, Palermóban és Padovában, kétszer voltam Írországból Corkban és tartottam előadást Dublinban, Romániában Csíkszeredában, Temesváron, Déván, Kolozsváron, Marosvásárhelyen, Sepsiszentgyörgyön és Parajdon, Svájcban Zürichben és Interlakenben, Ausztriában Bécsben, Csehországban Prágában, tartottam előadást Drezdában, Heidelbergben és Bonnban Németországban, Görögországban Athénben és Chalkidikiben, Dániában Aarhusban, Lengyelországban Varsóban, Norvégiában Lillehammerben, Törökországban Antalyában, Horvátországban és Szlovéniában, és a Soros alapítvány támogatásával eljutottam Izlandba is, ami nagy hatással volt további tudományos pályafutásomra.

Kétszer voltam több hónapon keresztül Svédországban, Göteborgban, amiért nagyon hálás vagyok a Magyar Államnak. Szóval állampénzen, és persze jelentős mértékben a saját zsebembe nyúlva, bejártam szinte egész Európát, és eljutottam

Amerikába, Ázsiába és Afrikába is. Amit sajnállok, hogy a Szovjetunióban és a szovjet utódállamokban soha nem jártam, és most már nem is fogok. Természetesen a hazánkban tartott, témába vágó nemzetközi konferenciákra is igyekeztem résztvenni. Egyetlen olyan konferencia részvétele sem volt, ahol ne legalább két előadással vettem volna részt, és ha a szervezők lehetővé tették, szívesen megtartottam azok előadásait is, akik a konferenciára nem tudtak kiutazni. A következő összeállítás a legfontosabbnak tartott előadásokat tartalmazza. Ha egy konferencián több előadást is tartottunk, azok közül a számomra kedvesebbet emeltem ki.

A nemzetközi tudományos konferenciák közül az alábbiakat szeretném kiemelni:

- Csapó, J. – Ferenczy, R. – Penke, B.: Application of mercaptoethanesulfonic acid for mild hydrolysis of peptides and proteins. *50th Anniversary Symp. of the Nobel Prize of Albert Szentgyörgyi*. Szeged, 1987. aug. 31 - szept. 4.
- Csapó, J. – Pap, I. – Költő, L.: Age determination of fossil bone samples containing protein based on amino acid racemization. *Archaeological Sciences Conference*. Bradford, 1989. szept. 20-22. 14.
- Csapó, J. – Tóth, L.-né – Csapó, J.-né: Separation of D- and L-amino acids by ion exchange column chromatography in the form of alanine dipeptides. *Therapy with Amino Acids and Analogues, 1st International Congress*. Vienna, 1989. aug. 7-12.
- Csapó, J. – Tóth, L.-né – Csapó, J.-né: Separation of D- and L- amino acids by ion exchange chromatography in the form of 2-sulfonilic acid alanyl dipeptides. *Therapy with Amino Acids and Analogues, 1st International Congress*. Vienna, 1989. aug. 7-12.
- Csapó, J. – Csapó, J.-né: Age determination of fossil bone samples based on the rate of amino acid racemization. *International Symposium on Archaeometry*. Heidelberg, 1990. ápr. 2. 193.
- Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J.: Measurement of bacterial protein using diamini-nopimelic acid, D-alanine and S-methylmethionine sulfonium chloride content of rumen liquor. *2nd International Congress on Amino Acids and Analogues*. Vienna, 1991. aug. 5-9.
- Csapó, J. – Stefler, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Makray, S.: Composition of mare's colostrum and milk. I. Protein content, amino acid composition and biological

value. *44th Annu. Meet. of European Association for Animal Production*. Aarhus, 1993. aug. 16-19. 510-511.

- Csapó-Kiss, Zs. – Stefler, J. – Csapó, J. – Herczog, E.: The mineral composition of mare's colostrum and milk. *Eighth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*. Dresden, 1993. máj. 16-22. 247-248.
- Csapó, J. – Folestad, S. – Tivesten, A. – Csapó-Kiss, Zs.: The use of mercaptoethanesulfonic acid as a protecting and hydrolysing agent at elevated temperatures for rapid determination of the amino acid composition in protein. *Third International Congress on Amino Acids*. Vienna, 1993. aug. 23-27.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Martin, T.G.: Protein content, amino acid composition and biological value of sow's colostrum and milk. *45th Annu. Meet. of European Association for Animal Production*. Edinburgh, 1994. szept. 5-8. 328.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Költő, L. – Némethy, S. – Folestad, S. – Tivesten, A. – Martin, T.G.: Age determination based on amino acid racemization: A new possibility. *World Archaeological Congress-3*. New Delhi, 1994. dec. 4-11.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Költő, L. – Némethy, S.: Age estimation of materials with high keratin content based on cystine, cysteic acid, methionine and tyrosine content. *Archaeological Sciences Conference*. Liverpool, 1995. júl. 3-6. 47.
- Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J. – Költő, L. – Némethy, S.: A possible error of amino acid dating. *Archaeological Sciences Conference*. Liverpool, 1995. júl. 3-6. 51.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs.: Radiocarbon calibration for dating based on amino acid racemization: Newest results on the field of age determination of fossil bone samples. *International Symposium on Archaeometry*, Urbana-Champaign, 1996. máj. 20-24.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Stefler, J. – Csordás, E. – Martin, T.G.: Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. *47th Annu. Meet. of European Association for Animal Production*. Lillehammer, 1996. aug. 25-29. 177.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Martin, T.G. – Házás, Z.: Composition of sow's milk and its alimentary value: I. Protein composition, amino acids and biological value. *47th Annu. Meet. of European Association for Animal Production*. Lillehammer, 1996. aug. 25-29. 263.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Martin, T.G. – Házás, Z.: Composition of sow's milk and its alimentary value: II. Fatty acid composition and contents of fats,

- vitamins and macro- and micro elements. *47th Annu. Meet. of European Association for Animal Production*. Lillehammer, 1996. aug. 25-29. 263.
- Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Wágner, L.: Hydrolysis of proteins performed at high temperature and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids. *5th International Congress on Amino Acids*. Chalkidiki, 1997. aug. 25-29. *Amino Acids*. 1997. 13. 25.
 - Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Stefler, J.: Determination of small quantities of cow's milk blended with mare's milk based on the fatty acid composition of the milk fat. *Authenticity and Adulteration of Food – the Analytical Approach. Euro Food Chem IX*. Interlaken, 1997. szept. 24-26. 363-368.
 - Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Fox, P.F. – Wágner, L.: Free amino acid and free D-aspartic and glutamic acid content of milk products. *49th Annu. Meet. of European Association for Animal Production*. Warsaw, 1998. aug. 24-27. 181.
 - Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J. – Varga-Visi, É. – Kametler, L.: Age estimation based on the concentration of D-aspartic and D-glutamic acid of teeth. *6th International Congress on Amino Acids*. Bonn, 1999. aug. 3-7. *Amino Acids*. 1999. 17. 1. 60-61.
 - Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Házas, Z. – Horn, P. – Németh, T.: Influence of the number of piglets born on the composition of sow's colostrum milked immediately after parturition. *50th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Zürich, 1999. aug. 22-26. 293.
 - Csapó, J. – Csapó, J. Jr. – Csapó-Kiss, Zs.: Bacterial contamination as a possible error of amino acid dating. *32nd International Symposium on Archaeometry*. Mexico City, 2000. máj. 15-20. 128-129.
 - Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J. Jr. – Csapó, J.: Age determination of an individual based on the concentration of D-amino acids (D-aspartic acid, D-glutamic acid, D-cystine) of teeth. *32nd International Symposium on Archaeometry*. Mexico City, 2000. máj. 15-20. 38-39.
 - Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Varga-Visi, É. – Pohn, G. – Kametler, L.: The D-amino acid content of foodstuffs and animal feeds. *51st Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Hague, 2000. Aug 21-24. 164.
 - Csapó, J. – Pohn, G. – Csapó-Kiss, Zs. – Varga-Visi, É. – Pétervári, E.: Determination of the enantiomers of methionine and cyst(e)ine in the form of methionine-sulphon and cysteic acid after performic acid oxidation by RP-HPLC.

- 7th International Congress on Amino Acids and Proteins*. Vienna, 2001. Aug. 6-10. *Amino Acids*. 4-5.
- Collins, M. – Penkman, K. – Maddy, D. – Bailey, G. – Kaufman, D. – Csapó, J.: Amino acid racemization: A useful tool for chronology? *7th Annual Meeting European Association of Archaeologists*. Germany, Esslingen am Neckar, 2001. Sept. 19-23. 97.
 - Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Bernert, Zs. – Csapó, Zs. – Pohn, G. – Költő, L. – Csapó, J. jun.: Are there any differences in the D-aspartic acid and D-glutamic acid content of teeth from the same skull? *33rd International Symposium on Archaeometry*. Amsterdam, 2002. April 22-26. 149-150.
 - Csapó, J. – Szakály, S. – Csapó-Kiss, Zs. – Varga-Visi É.: Conjugated linoleic acid content of milk: Occurrence, factors affecting the quantity of conjugated linoleic acid of milk. *53rd Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Cairo, Egypt, 2002. Sept. 1-4. 179.
 - Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Pohn, G. – Csapó, J. jun.: Use of the amino acids and amino acid racemization for age determination in archaeometry. *3rd Interdisciplinary Symposium on Biological Chirality*. Italy, Modena, 2003. April 30. – May 4. 14.
 - Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Pohn, G.: Individual age estimation based on D-aspartic acid and D-glutamic acid content of teeth. *4th Symposium on Archaeometry*. Athens, 2003. May 28-31. 74.
 - Csapó, J. – Varga-Visi, É. – Pohn, G. – Csapó-Kiss, Zs.: Changing the free D-amino acid content of different type of cheeses influenced by the ripening period. *8th International Congress on Amino Acids and Proteins*. Rome, 2003. Sept. 5-9. *Amino Acids*. 144.
 - Csapó, J. – Pohn, G. – Varga-Visi, É. – Csapó-Kiss, Zs. – Terlaky-Balla, É.: Mercaptoethane sulfonic acid as a new derivatization reagent in the amino acid analysis of food and feed. *55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Bled, Slovenia, 2004. Sept. 5-9. 106.
 - Albert, Cs. – Csapó, J. – Varga-Visi, É. – Lóki, K. – Csapó-Kiss, Zs.: Mercaptoethanesulfonic acid as hydrolysis reagent of the protein and derivatization reagent of amino acids during high performance liquid chromatographic analysis. *11th International Conference of Chemistry*. Cluj, Romania, 2005. November 11-13. 35-38.

- Csapó, J. – Varga-Visi, É. – Albert, Cs. – Lóki, K. – Csapó-Kiss, Zs.: Evaluation of the inactivation of heat sensitive antinutritive factors in fullfat soybean. *57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Antalya, Turkey, 2006. Sept. 17-20. 124.
- Albert, Cs. – Lóki, K. – Salamon, Sz. – Albert, B. – Sára, P. – Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J.: Effect of total germ number of raw milk on free amino acid and free D- amino acid content of various dairy products. *10th International Congress on Amino Acids and Proteins*. Kallithea, Greece, 2007. Aug. 20-25. *Amino Acids*. 2007. 33. 12.
- Albert, Cs. – Salamon, Sz. – Pohn, G. – Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J.: Effect of total germ number of raw milk on free amino acid and free D-amino acid contents of various dairy products. *58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Dublin, Ireland, 2007. Aug. 26-29. 205.
- Albert, Cs. – Pohn, G. – Lóki, K. – Salamon, Sz. – Tamás, M. – Albert, B. – Csapó-Kiss, Zs. – Csapó, J.: A nyerstej összcsíraszámának hatása a különböző tejtermékek szabadaminosav- és szabad D-aminosav-tartalmára. *13th International Conference of Chemistry*. Cluj Napoca, 2007. November 8-11. 21-24.
- Albert, Cs. – Csapó, J. – Pohn, G. – Mándoki, Zs. – Csapó-Kiss, Zs.: The effect of microwave pasteurization on the amino acid compositions, free amino acid content, biological value, vitamin B- and C-, utilizable lysine-, lysino-alanine-, and hidroximethyl furfural content of milk. *KRMIVA 2009. 16th International Conference*. Opatija, 2009. jún. 1-3. 68. p.
- Csapó, J.: Separation and determination of the amino acids from wine by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. *ERASMUS LLP – The intensive program Ecovitis*. Sienna, Italy. 2010. July 8-27. 38.
- Csapó, J. – Csapóné Kiss, Zs. – Salamon, R.V. – Albert, Cs.: Tej és tejtermékek szerepe a táplálkozásban. *Galacticus I. Tejhigiéniái, Tejminőségügyi és Tejvizsgáló Világkongresszus*. Farkaslaka. Erdély (Románia). 2011. Aug. 17-21. 1-54.
- Lóki, K. – Csapó, J.: Examination of the accumulation of D-tryptophan originated from food in the organs of rats. *KRMIVA 2012. 19th International Conference*. Opatija, 2012. May 30. - June 1. 134. p
- Csapó, J. – Béri, B. – Süli, Á. – Varga-Visi, É.: Colostrum and milk of different cattle breeds as amino acid source. *20th Int. Symp. Animal Science Days*, Kranjska Gora, Slovenia, 2012. Sept. 19-21, P21.

- Csapó, J. – Vargáné Visi, É. – Holló, I. – Holló, G. – Salamon, R.V. – Salamon, Sz. – Bíró, G. – Jónás, D. – Csapó Kiss, Zs.: The conversion of organic and inorganic selenium containing compounds in the digestive tract of cattle: In vivo experiments with cows having fistula. *KRMIVA 2013. 20th International Conference*. Opatija, 2013. June 5. - June 7. 62. p
- Vargáné Visi, É. – Holló, I. – Holló, G. – Csapó, J. – Salamon, R.V. – Salamon, Sz. – Bíró, G. – Jónás, D. – Csapó Kiss, Zs.: The conversion of organic and inorganic selenium containing compounds in the digestive tract of cattle. In vitro experiments with rumen liquor. *KRMIVA 2013. 20th International Conference*. Opatija, 2013. June 5. - June 7. 127. p
- Csapó, J. – Albert, Cs. – Csapó-Kiss, Zs.: Detection and determination of sugars in wine. *ECOcycles Erasmus intensive programme on sustainable development through ecological cycles*. Palermo, Italy. 2013. July 14 - Aug. 4. 46.
- Csapó, J. – Csapó, J. jun. – Albert, Cs. – Csapó-Kiss, Zs.: Separation and determination of the amino acids and biogenic amine content of wine by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. *ECOcycles Erasmus intensive programme on sustainable development through ecological cycles*. Palermo, Italy. 2013. July 14 - Aug. 4. 70.
- Csapó, J. – Holló, I. – Holló, G. – Salamon, R.V. – Salamon, Sz. – Jónás, D. – Bíró, G. – Varga-Visi, É. – Csapó-Kiss, Zs.: Increasing the selenium content of milk products adding organic and inorganic selenium compounds to the cow's milk. *21st Int. Symp. Animal Science Days*, Padova, Italy, 2013. Sept. 18-20, P7.
- Albert, Cs. – Csapó, J.: Módszer és eljárás a szója tripszininhibitor tartalmának és ureáz enzim aktivitásának csökkentésére hőkezeléssel kombinált kémiai módszerekkel. (Method and procedure for decreasing the tripsine inhibitor content and urease activity of soy-bean by chemical methods combined with heat treatment). *XXI. Nemzetközi Vegyészkonferencia. (21st International Conference of Chemistry)*. Csíksomlyó (Sumuleu Ciuc), 2015. Szeptember 23-27. 24. p
- Csapó, J. – Komlósi, I. – Csapóné, Kiss Zs.: Tej és tejtermékek, mint funkcionális élelmiszerek. *Galacticus 2. Tejhigiéniái, Tejminőségügyi és Tejvizsgáló Nemzetközi Konferencia*. Székelyudvarhely, 2016. 04. 8-9. (36 slide).
- Csapó, J. – Prokisch, J. – Spisák, T.: Az UV fény alkalmazása az élelmiszerek előállításánál. (The use of the UV light in the production of foodstuffs).

XXII. Nemzetközi Vegyészkonferencia. (22nd International Conference of Chemistry). Temesvár (Timisoara), 2016. November 3-6.

- Csapó, J. – Albert, Cs. – Tamás, M.: Wine adulteration and the analytical methods capable for detection wine adulteration. (Borhamisítás és a hamisítás kimutatására alkalmas analitikai módszerek). *23th International Conference of Chemistry. (XXIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia).* Deva (Déva), 2017. October 25-27. 18.
- Csapó, J. – Kiss, D. – Albert, Cs.: A chemical method combined with heat treatment for the reduction of the antinutritive materials of soyabean. *13th International Scientific Conference. Biotechnology and Quality of Raw Materials and Foodstuffs.* Smolenice (Szomolány) Castle, Slovak Republic. 2018. September 17-19. 28.
- Csapó, J. – Albert, Cs. – Kiss, D.: Thaumatin adulteration and the analytical methods for detection of thaumatin counterfeiting. *24th Conference of Chemistry.* Sovata Bai, October 24-27. 2018. 67.
- Csapó, J. – Lóki, K. – Albert, Cs. – Kiss, D.: Studying the racemization of tryptophan in alkali-treated slaughterhouse by-products. *25th Conference of Chemistry.* Cluj-Napoca, October 24-26. 2019. 64.
- Csapó, J. – Lóki, K. – Albert, Cs. – Kiss, D.: Protein hydrolysis method suitable for the determination of tryptophan enantiomers. *25th Conference of Chemistry.* Cluj-Napoca, October 24-26. 2019. 65.

2.5.4. Előadásaim hazai konferenciákon

Munkatársaimmal együtt minden alkalmat megragadtunk arra, hogy Magyarországon rendezett eseményeken, konferenciákon, tanácskozásokon is beszámoljunk új tudományos eredményeinkről. Első előadásomat 1980-ban Herceghalomban tartottam a Hústermelés Fejlesztése Tudományos Tanácskozáson, ahol a holstein fajtájú szarvasmarhák főcstejének és átmeneti tejének szárazanyag, nyersfehérje, savófehérje, kazein, nem fehérje nitrogén és aminosav összetételéről számoltunk be. Ezt követően munkatársaimmal közösen az alábbi konferenciákon és tematikus napokon tartottunk előadást. A felsorolás nehéz, mert több, különböző években megrendezett azonos nevű konferencián vettünk részt, melyek részletes felsorolása túl hosszú lenne, ezért ha hosszabb időn keresztül ugyanazon a konferencián vettünk részt, az csak egyszer szerepel az anyagban.

A magyarországi konferenciák felsorolása betűrendi sorrendben:

- A Felfedező Tudomány 21. Század Eleji Eredményei és Távlatai Erdélyben - Agrártudományi Szakosztály Konferenciája.
- A Honfoglaló Magyarság Állama, Kultúrája és az Ősi Vastermelés - Konferencia.
- A Kárpát Medence Ásványvizei - Nemzetközi Tudományos Konferencia.
- A Talaj, a Növény, az Állat és az Ember Kapcsolata a Fenntarthatóság és az Alkalmazkodás Tükrében - Tudományos Konferencia.
- A Tej Szerepe a Humán Táplálkozásban.
- A Versenyképes Magyar Agrárgazdaság az Évezred Küszöbén.
- Agrártermelés - Életminőség. A Magyar Mezőgazdaság Lehetőségei az Európai Unióban.
- Állattenyésztés Legújabb Kutatási Eredményei. Országos Tudományos Tanácskozás.
- Analitikai és Környezetvédelmi Konferencia.
- Archeometriai Konferencia.
- Az Agrárfelsőoktatási Intézmények Fiatal Oktatóinak és Kutatóinak Országos Konferenciája.
- Az Agrobiodiverzitás Megőrzése és Hasznosítása. Szimpózium.
- Az Élelmiszergazdaság Fejlesztésének Lehetőségei. MTA Állatnemesítési, Állattenyésztési és Takarmányozási Tudományos Bizottsága Felolvasó Ülése.
- Az MTA Kolozsvári Akadémiai Bizottság Tudományos Ülése.
- Big Food Konferencia.
- Boregyetek és Borrégiók Nemzetközi Találkozója.
- Datálás/Keltezés Reverzibilis és Irreverzibilis Folyamatok Alapján - MTA Genómiai és Geokémiai és Ásvány-Kőzettani Bizottságai Konferenciája.
- Dél-Dunántúli Analitikai Nap.
- Dunántúli Analitikai és Környezetvédelmi Konferencia.
- Dunántúli Analitikai Konferencia.
- EÁSZ 37. Tudományos Ülésszaka.
- Élelmiszer Minőségellenőrzés Tudományos Konferencia.
- Élelmiszertudományi Konferencia.
- Emberközpontú Tudomány a Székelyföldi Agráriumban.
- Ezüst Akadémia.

- Farmer-EXPO.
- Georgikon Tudományos Napok.
- Hadak Útján - A Népvándorlás Kor Fiatal Kutatóinak Tudományos Ülésszaka.
- Hungalimenteria - Terítéken az Élelmiszerek és Csomagolóanyagok.
- Hungalimenteria: Ésszel a Kosárba - Mit Mond Erről a Labor.
- Hústermelés Fejlesztése Tudományos Konferencia.
- Ifjúsági Tudományos Fórum.
- Ioncsere Szimpózium.
- Kaposvári Állattenyésztési Tudományos Napok.
- Kaposvári Polgári Kaszinó.
- Kecsketenyésztési Ankét.
- KÉKI Tudományos Kollokvium.
- KÉKI Tudományos Konferencia.
- Kérdő Állatfajok Mai Helyzete és Perspektívái az Európai Unióban.
- Kiterítési Pontok a Magyar Állattenyésztésben Tudományos Konferencia.
- Kromatográfiás Továbbképző Tanfolyam.
- Kromatográfiás Vándorgyűlés.
- Kutatási és Fejlesztési Tanácskozás. MTA Agrártudományok Osztálya, Agrár Műszaki Bizottsága.
- Kutatók Éjszakája.
- MACOSZ – UPDATE Országos Diabétesz Világnap.
- Magyar Buiatrikus Kongresszus.
- Magyar Genetikai Kongresszus.
- Magyar Genetikusok Országos Konferenciája.
- Magyar Mezőgazdaság Kihívásai.
- Magyar Sajtmustra.
- Magyar Tudomány Ünnepe.
- Magyar Tudományos Akadémia Könyvtára.
- Magyar-Román Baráti Társaság.
- Másodnyersanyag Hasznosító Konferencia.
- Minőség és Gazdaságosság az Állati Termék Előállításban III. Ifjúsági Tudományos Konferencia.
- MTA Élelmiszeralitikai Munkabizottságának Ülése.

- MTA PAB Erdészeti és Vadgazdálkodási Munkabizottságának Munkaértekezlete.
- MTA VEAB Archeometriai Munkabizottság Ankétja.
- Műszaki Kémiai Napok.
- Nemzetközi Agrárökonómiai Tudományos Napok.
- Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia.
- Nemzetközi Sajt fesztivál és Vásár.
- Népvándorlaskor Fiatal Kutatóinak 5. Találkozója.
- Nyúltenyésztési Tudományos Nap.
- Országos Takarmányozástani Oktatási-Kutatási Napok.
- Óvári Tudományos Napok.
- PAB Kémiai Szakbizottság Analitikai Munkabizottság Ankétja.
- PAB Kémiai Szakbizottság Rendezvénye - Zsolnay Kulturális Negyed.
- Sajtakadémia Konferencia: Kézműves Sajt – Tudomány – Turizmus.
- Sertés tenyésztési Tudományos Nap.
- Somogyi Analitikai Nap.
- Szkeptikusok Országos Konferenciája.
- Takarmányanalitikai Konferencia.
- Takarmányanalitikai Tanácskozás.
- Tiszántúli Agrártudományi Napok. Őshonos- és Tájfajták – Ökotermékek – Egészséges Táplálkozás – Vidékfejlesztés.
- Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok.
- Tudományos Konferencia a Xenohormézisről.
- Új Kihívások a Mezőgazdaság Számára az EU-Csatlakozás Tükrében.
- Vegyészkonferencia.

A felsorolt rendezvények közül ki szeretném emelni a Vegyészkonferenciát, ahol sok előadást tartottunk, a mosonmagyaróvári, keszthelyi és kaposvári egyetemi rendezvényeket, ahol szinte kötelező érvényűen vettünk részt, az MTA, ill. a PAB MTA bizottságainak rendezvényeit, a Veszprémi Műszaki Napokat, ahova mindig szívesen mentünk, az utóbbi időben pedig a Kutatók Éjszakáját, ahol élvezettel tartottam előadásokat, közérthető nyelven, zsúfolt terem előtt. Kiemelném még az erdélyi Ezüst Akadémia előadásait, ahol Sepsiszentgyörgyön, Kézdivásárhelyen és Csíkszeredában 450-650 ember előtt tartottam előadásokat, a Magyar

Cukorbeteg Országos Szövetsége rendezvényét, ahol több, mint 1000 ember előtt tartottam előadást az egészséges táplálkozásról, a Magyar Sajtustrát, a Sajtakadémia Konferenciát, a Hungalimentaria konferenciát és végezetül a Big Food Konferenciát, ahol nagyon élveztem nemcsak az előadásokat, de az utána kerekedő vitát is.

2.5.5. Ismeretterjesztő közlemények

Felkérésre, bárhova, még akár reklámújságnak is írtam hosszabb-rövidebb ismeretterjesztő cikkekcskéket. A napi sajtóban annyi butaság jelenik meg akár csak az ételmszer fogyasztással, az ételmszer komponensekkel, a vitaminokkal, a tápértékekkel, a hasznosulással, az E-számokkal kapcsolatban, hogy úgy voltam vele, ha az olvasó megtisztel azzal, hogy bármilyen rövid közleményemet elolvassa, talán hasznos lehet számára.

Írtam ismeretterjesztő cikkeket az

Acta Agraria Kaposváriensisbe, a Biokémiába, az Élet és Tudományba, a Hajdú-Bihari Naplóba, az Iparrégészeti és Archeometriai Tájékoztatóba, a Kaposvár és környezete Szuperinfóba, a Kistenyésztek Lapjába, a Közérdekű Kalendáriumba, a Lovasnemzetbe, a Magyar Mezőgazdaságba, a Medical Tribune. Havilap orvosoktól orvosoknak-ba, a Somogy Megyei Önkormányzat Évkönyvébe, a Somogy Portálba, a Somogyi Hírlapba, a Somogyi Honismeretbe, a Somogyi Kultúrába, a Somogyi Kurírba, a Szaktanácsokba, és a Természet Világába.

Ezekre az írásokra az olvasók többsége jól reagált, mert közérthető nyelven próbáltam megfogalmazni közérdeklődésre is számot tartó problémát, de kolégáim némelyikének az volt a véleménye, hogy nem kellene ilyen cikkeket írni, mert az nem az én feladatom. Azt hiszen ma sem csinálnék másként, mert mindenkihez úgy kell szólni, hogy azt megértse, és véleményem szerint a tudományos eredményeket is lehet közérthető módon tálni. Néhány számomra kedvesebb írás ebből a témakörből:

- Csapó J. – Csapó J.-né – Szentpéteri J.: A tej fehérjetartalma és annak minősége. *Magyar Mezőgazdaság*. 1985. 17. 15.
- Csapó J.: Különböző fajtájú szarvasmarhák tejösszetétele. *Kistermelők Lapja*. 1992. 2. 8-9.
- Csapó J. – Keszthelyi T.: A juhtej összetétele és táplálóértéke. *Kistermelők Lapja*. 1992. 4. 18-19.

- Csapó J. – Csapóné Kiss Zs.: Kormeghatározás az aminosavak racemizációja alapján. *Élet és Tudomány*. 1992. 40. 1251-1253.
- Csapó J. – Stefler J. – Csapóné Kiss Zs. – Makray S.: A kanca tejének összetétele. I. A kolosztrum és a tej zsírtartalma és zsírsavösszetétele. *Kistermelők Lapja*. 1993. 8. 7.
- Csapó J. – Csordás E. – Gombos S.: Új módszer a bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározására kérődzőknél. *Természet Világa*. 1994.
- Csapó J. – Csapóné Kiss Zs.: A kanca tejének összetétele. I. A kolosztrum és a tej fehérjetartalma, aminosavösszetétele és biológiai értéke. *Lovasnemzet*. 1998. ősz. 23-25.
- Csapó J.: Királis molekulák: az élet keletkezésétől az ételmszerekig. Könyvismertetés. *Biokémia*. 2005. 29. 1. 22.
- Csapó J.: Ételmszerek D-aminosav-tartalma. *Természet Világa*. 2011/II. különszám. 84-88.
- Csapó J.: Bízom benne, hogy valami kutatómunkát csak végeztek. A jövő összejtéről: *Somogyi Hírlap*. 2013. 08. 14. 4.
- Csapó J.: Funkcionális ételmszerek. *Hajdú-Bihari Napló*. 2017. július 29. 2.
- Csapó J.: Magas tápértékű funkcionális ételmszer. A búzaliszt kiegészítése magas fehérjetartalmú ételmszer alapanyagokkal. *Medical Tribune. Havilap orvosoktól orvosoknak*. 16. 8. 19. 2018.
- Csapó J.: Társadalmi méretű probléma. Obezitás és daganatok. *Medical Tribune. Havilap orvosoktól orvosoknak*. 16. 9. 22. 2018.
- Csapó J.: Az elhízás, a 2-es típusú cukorbetegség és az életmód. *Medical Tribune. Havilap orvosoktól orvosoknak*. 16. 10. 22. 2018.

A publikációk összesítése: Pályafutásom során, 2020 augusztus 1-ig írtam, ill. munkatársaimmal közösen írtunk 43 könyvet és könyvrészletet, 3 ismeretterjesztő könyvet, könyvrészletet, 50 egyetemi jegyzet, oktatási segédanyagot, szerkesztettünk 85 folyóiratszámot, tanulmánykötet, írtunk 183 idegen nyelvű és 165 magyar nyelvű közleményt szakfolyóiratban, tartottunk 304 előadást nemzetközi és 344 előadást hazai konferenciákon, és írtunk 101 hosszabb-rövidebb ismeretterjesztő közleményt. Az összes közlemény száma 1278.

2.6. Szerzőtársaim, kollégáim, munkatársaim, segítőim betűrendi sorrendben

- Albert Beáta
- Albert Csilla
- András Csaba Dezső
- Andrassy-Baka Gabriella
- Anton István
- Baintner Károly
- Bakos Gábor
- Bartosiewicz László
- Bellesia, F.
- Béri Béla
- Bernert Zsolt
- Bíró Gábor
- Bíró Melinda
- Biró-Németh Edit
- Björn, A. Malmgren
- Bodó Imre
- Bogner Péter
- Bogut, I.
- Boldaji, F.
- Boros-Győri Anikó
- Caglioti, L.
- Cenkvári Éva
- Collins, Matthew J.
- Crăciun, M. E.
- Csanádi József
- Csapó János Jr.
- Csapó Jánosné
- Csapó-Kiss Zsuzsanna
- Csiki Zoltán
- Csokona Éva
- Csordás Endre
- Darvas Lóránd
- Domány, S.
- Domokos, E.
- Doszpod, J.
- Dubleczy Károly
- Einarsson, Stefan
- Ender, K.
- Eszes Ferenc
- Eszterhás, I.
- Farkas Mária
- Fenyvessy József
- Ferenczy Richárd
- Folestad, Staffan
- Fox, Peter F.
- Garipoglu, A.V.
- Gáti, I.
- Gera I.
- Gizejewski, J.
- Gizejewski, Z.
- Gombos Sándor (Hu)
- Gombos Sándor (Ro)
- Gundel János
- Gyódi Anna
- György Éva
- Győri Anikó
- Győri Zoltán
- Házas Zoltán
- Hedge, R. E. M.
- Henics Zoltán
- Herpai Zoltán
- Hiller, J.
- Holló Gabriella
- Holló István
- Horn Artúr Jr.
- Horn Péter

- Horváth Péter
- Húsvéth Ferenc
- Húth Balázs
- Ibanescu, C.
- Ivankovics, S.
- Jaczewski, Z.
- Jávör András
- Jensen, J.F.
- Jónás Dominika
- Juhászné Tóth Réka
- Kalambura, Sanja
- Kametler László
- Kehagias, Christos
- Kenessey Ágnes
- Kiss Dóra
- Kiss János
- Kolokitha, E.
- Komlósi István
- Konteles, S.
- Koulouris, S.
- Kovács Ágnes
- Kovács Béla
- Kovács János
- Költő László
- Kralik, Gordana
- Kukovics Sándor
- Kustos Károly
- Lányi Szabolcs
- Locsmándi László
- Lóki Katalin
- Makay Bertalan
- Makray Sándor
- Malmgren, Björn
- Mándoki Zsolt
- Martin, Truman G.
- Márton Melinda
- Meleg István
- Merész Péter
- Mészáros Sándor
- Mezei Zoltán
- Mihók Emőke
- Mikóné, J.E.
- Milisits Gábor
- Millard, A.R.
- Nagy Ágnes
- Németh Jolán
- Németh Tamás
- Némethy Sándor
- Nielsen-Marsh, C.M.
- Nuernberg, K.
- Nyberg, Johann
- Orwar, Owe
- Pályi Gyula
- Pap Ildikó
- Penke Botond
- Pétervári Erika
- Pinetti, A.
- Pohn Gabriella
- Polgár Péter
- Póti Péter
- Prievara Ferenc Tibor
- Prigodich, R.V.
- Prokisch József
- Radnai István
- Roberts, J.P.
- Romvári Róbert
- Saffarzadeh, A.
- Salamon Rozália

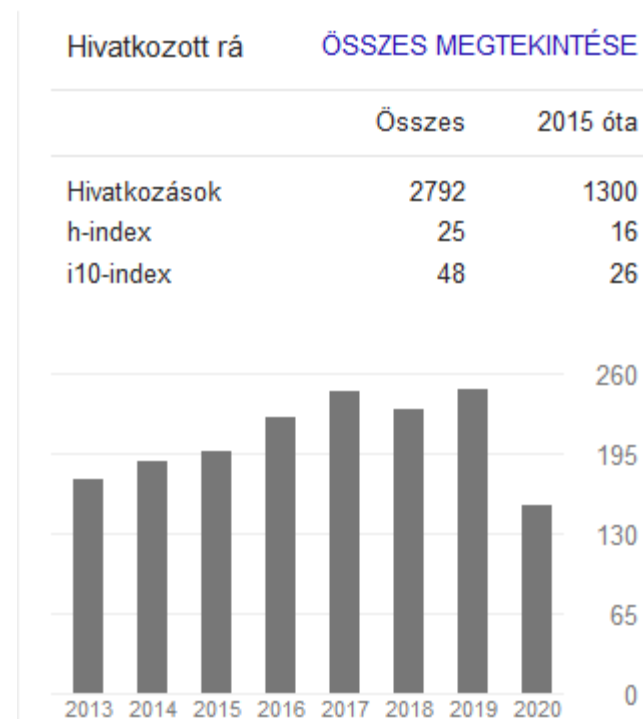
- Salamon Szidónia
- Sára Péter
- Sarudi Imre
- Schäffer Béla
- Schmidt János
- Schobert Norbert
- Seregi János
- Simon-Sarkadi Livia
- Sipos Péter
- Smith, C.I.
- Somogyi, T.
- Sorensen, P.
- Spisák Tamás
- Stanics Judit
- Stefler József
- Sugár László
- Süli Ágnes
- Sütő Zoltán
- Szabari Miklós
- Szabó András
- Szakály Sándor
- Szakály Zoltán
- Szenci Ottó
- Szendrő Zsolt
- Szentpéteri József
- Szép Sándor Alexandru
- Szerényi, A.
- Szigeti Jenő
- Szigeti Tamás Jenő
- Szikossy Ildikó
- Szűcs Endre
- Szűts Gábor
- Tábori, I.
- Táros Tibor
- Tamás Melinda
- Terlaky-Balla Éva
- Tivesten, Anna
- Toró Szabolcs
- Tóth Lászlóné
- Tóth-Pósfai Ilona
- Tőzsér János
- Turner-Walker, G.
- Vadászné Varnyu Anikó
- Vargáné Visi Éva
- Varga-Visi Éva
- Véha Antal
- Veresegyházi Tamás
- Vincze László
- Wágner László
- Weimer, B.
- Wess, T.J.
- Winter, Amos
- Wojtal, P.
- Wolf Gyula
- Yaghobfar, Aghbar
- Zándoki Beáta
- Zándoki Rita
- Zomborszky Zoltán
- Zucchi, Claudia
- Zurbó Zsófia

2.7. A Google Tudós által készített összeállítás a H-indexet, illetve az i10-indexet képező közleményeimről



Janos CSAPO
 Sapientia Hungarian University of Transilvania
 E-mail megerősítve itt: cs.sapientia.ro
 analytical chemistry

Janos CSAPÓ - Google Tudós Hivatkozások
scholar.google.hu/citations?user=U98_Vz0AAAAAJ&hl=hu 2020. augusztus 1.



A Hirsch indexet képező cikkek (1-23)

Cím	Idézet	Év
The survival of organic matter in bone: a review MJ Collins, CM Nielsen-Marsh, J Hiller, CI Smith, JP Roberts, J Csapó Archaeometry 44 (3), 383-394	520	2002
Protein, fats, vitamin and mineral concentrations in porcine colostrum and milk from parturition to 60 days J Csapó , TG Martin, Zs Csapó-Kiss, Z Házas International Dairy Journal 6 (8-9), 881-902	147	1996
Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content J Csapó , J Stefler, TG Martin, S Makray, Z Csapó-Kiss International Dairy Journal 5 (4), 393-402	137	1995
Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro and micro-elements Z Csapó-Kiss, J Stefler, TG Martin, S Makray, J Csapó International Dairy Journal 5 (4), 403-415	117	1995
The role of sprouts in human nutrition. A review M Marton, Zs Mandoki, Zs Csapó-Kiss, J Csapó Acta Univ. Sapientiae 3, 81-117	120	2010
Determination of the chemical composition of acorn (<i>Quercus branti</i>), <i>Pistacia atlantica</i> and <i>Pistacia khinjuk</i> seeds as non-conventional feedstuffs A Saffarzadeh, L Vincze, J Csapó Acta Agraria Kaposvariensis 3 (3), 59-69	82	1999
Influence of mastitis on D-amino acid content of milk J Csapó , Z Csapó-Kiss, J Stefler, TG Martin, S Némethy Journal of Dairy Science 78 (11), 2375-2381	69	1995

Cím	Idézet	Év
Chemical composition of milk from red deer, roe and fallow deer kept in captivity J Csapó , L Sugár, A Horn, Zs Csapó Acta Agronomica Hungarica 3 (4), 359-372	48	1986
Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids J Csapó , Zs Csapó-Kiss, L Wágner, T Tálos, TG Martin, S Folestad, Analytica Chimica Acta 339 (1-2), 99-107	52	1997
Optimization of hydrolysis at determination of amino acid content in food and feed products J Csapó , I Tóth-Pósfai, Zs Csapó-Kiss Acta Alimentaria (Hungary) 1. 3-21	39	1986
Composition of mare's colostrum and milk II. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and micro-elements J Csapó , S Salamon, K Lóki, Zs Csapó-Kiss Acta Univ. Sapient. Ser. Aliment. 2 (1), 133-148	42	2009
Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization J Csapó , Cs Albert, K Lóki, Zs Csapó-Kiss Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria 1, 5-29	36	2008
Use of amino acids and their racemisation for age determination in archaeometry J Csapó , Zs Csapó-Kiss, J Csapó Jr TrAC Trends in Analytical Chemistry 17 (3), 140-148	32	1998

Cím	Idézet	Év
Tej és tejtermékek szerepe a táplálkozásban (Milk and dairy products in human nutrition) J Csapó , Zs Csapó Kiss Mezőgazda Kiadó, Budapest 1-464	36	2002
Composition of mare's colostrum and milk I. Fat content, fatty acid composition and vitamin contents RV Salamon, S Salamon, Zs Csapó-Kiss, J Csapó Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria 2 (1), 119-131	28	2009
Carcass traits, abdominal fat deposition and chemical composition of commercial meat type chicken during a twenty week growing period Z Sütő, P Horn, JF Jensen, P Sørensen, J Csapó Archiv für Geflügelkunde 62 (1), 21-25	30	1998
Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins J Csapó , Zs Csapó-Kiss, TG Martin, J Szentpéteri, Gy Wolf International Dairy Journal 4 (5), 445-458	28	1994
Changes in the D- and L-content of aspartic acid, glutamic acid, and alanine in a scleractinian coral over the last 300 years J Nyberg, J Csapó , BA Malmgren, A Winter Organic Geochemistry 32 (5), 623-632	26	2001
Noninvasive measurement of body composition of two rabbit populations between 6 and 16 weeks of age by computer tomography R Romvári, Z Szendrő, JF Jensen, P Sørensen, G Milisits, P Bogner, J Csapó Journal of animal breeding and genetics 115 (1-6), 383-395	26	1998

Cím	Idézet	Év
The role of selenium content of wheat in the human nutrition. A literature review M Tamás, Z Mándoki, J Csapó Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria 3, 5-34	28	2010
Evaluation of biological value of sprouts-I. Fat content, fatty acid composition M Márton, Zs Mándoki, J Csapó Acta Univ Sapientiae Aliment 3, 53-65	23	2010

Az i10-indexet képező cikkek 23-43 (1-22 lásd Hirsch indexnél)

The influence of manufacture on the free D-amino acid content of Cheddar cheese J Csapó , E Varga-Visi, K Lóki, Cs Albert Amino Acids 32 (1), 39-43	21	2007
Quantitative determination of bacterial protein from the diaminopimelic acid and D-alanine content of rumen liquor and intestines J Csapó , Z Henics Acta Agronomica Hungarica 40 (1-2), 159-173	20	1991
Evaluation of biological value of sprouts-I. Fat content, fatty acid composition M Márton, Zs Mándoki, J Csapó Acta Univ Sapientiae Aliment 3, 53-65	20	2010
The influence of extrusion on loss and racemization of amino acids J Csapó , E Varga-Visi, K Lóki, Cs Albert, S Salamon Amino Acids 34 (2), 287	20	2008
Effect of feeding on the composition of longissimus muscle of Hungarian Grey and Holstein Friesian bulls.-III. Amino acid composition and mineral content G Holló, K Nuernberg, I Holló, J Csapó , J Seregi, I Repa, K Ender Archives Animal Breeding 50 (6), 575-586	18	2007

Cím	Idézet	Év
Influence of breed, slaughter weight and gender on chemical composition of beef. Part 2. Fatty acid composition of fat in rib samples G Holló, J Csapó , E Szűcs, J Tőzsér, I Repa, I Holló Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 14 (12), 1719-1723	16	2001
Age determination based on amino acid racemization: A new possibility J Csapó , Z Csapó-Kiss, S Némethy, S Folestad, A Tivesten, TG Martin Amino acids 7 (3), 317-325	18	1994
Support of growth and formation of D-amino acids by Bifidobacterium longum in cows', ewes', goats' milk and modified whey powder products C Kehagias, J Csapó , S Konteles, E Kolokitha, S Koulouris, Zs Csapó-Kiss International Dairy Journal 18 (4), 396-402	18	2008
Élelmiszer-kémia (Food chemistry) J Csapó , Zs Csapó Kiss Mezőgazda Kiadó, Budapest 1-492	18	2003
Effect of genotype, age, body weight and sex on the body composition of growing rabbits. Zs Szendrő, A Kenessey, JF Jensen, NE Jensen, J Csapó , R Romvari World Rabbit Science 6 (3-4)	18	1998
Composition of the mother's milk I. Protein contents, amino acid composition, biological value. A review J Csapó , Sz Salamon Acta Univ Sapientiae Alimentaria 2, 174-95	18	2009
Mercaptoethanesulphonic acid as a protecting and hydrolysing agent for the determination of the amino acid composition of proteins using an elevated temperature for protein hydrolysis J Csapó , Zs Csapó-Kiss, S Folestad, A Tivesten Analytica Chimica Acta 289 (1), 105-111	17	1994

Cím	Idézet	Év
The effect of microwave pasteurization on the composition of milk Cs Albert, G Pohn, Zs Mándoki, Zs Csapó-Kiss, J Csapó Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme 51 (4), 213-221	16	2009
The D-amino acid content of foodstuffs (a review) J Csapó , Cs Albert, Zs Csapó-Kiss Acta Univ Sapientiae, Aliment 1, 5-30	16	2009
Mercaptoethanesulphonic acid as the reductive thiol-containing reagent employed for the derivatization of amino acids with o-phthalaldehyde analysis J Csapó , G Pohn, É Varga-Visi, Zs Csapó-Kiss, É Terlaky-Balla Chromatographia 60 (1), S231-S234	15	2004
Fatty acid composition and cholesterol content of the fat of pigs of various genotypes J Csapó , F Húsvéth, Zs Csapó-Kiss, É Varga-Visi, P Horn Agriculture 6 (1), 64-67	15	2000
Rapid method for the determination of diaminopimelic acid using ion exchange column chromatography J Csapó , Zs Csapó-Kiss, E Csordás, TG Martin, S Folestad, A Tivesten Analytical Letters 28 (11), 2049-2061	13	1995
Methods for determination of D-amino acid content of foods and feeds J Csapó , Zs Csapó-Kiss, S Einarsson, S Folestad, A Tivesten Acta Alimentaria-Academiae Scientiarum Hungaricae 24, 125-125	13	1995
A new method for the quantitative determination of protein of bacterial origin on the basis of D-aspartic acid and D-glutamic acid content J Csapó , J Schmidt, Zs Csapó-Kiss, G Holló, I Holló, L Wágner, E Cenkvari Acta Alimentaria 30 (1), 37-52	12	2001

Cím	Idézet	Év
Quantitative determination of protein of bacterial origin J Csapó , Z Csapó-Kiss, J Schmidt, TG Martin TrAC Trends in Analytical Chemistry 20 (1), 42-48	11	2001
Fatty acid composition and cholesterol content of the fat of pigs of various genotypes J Csapó , F Húsvéth, Z Csapó-Kiss, É Varga-Visi, P Horn Agriculture 6 (1), 64-67	11	2000

Debrecen, 2020. 09. 15.

3. PÁLYAFUTÁSOM LEGFONTOSABB EREDMÉNYEI A TUDOMÁNYOS MUNKA TERÜLETÉN

Vegyész diplomám mellé egy állattenyésztő diplomát is szereztem, és leginkább ez a kettősség befolyásolta tevékenységemet az életem során. Bár állattenyésztőként a gyakorlatban ténylegesen soha nem dolgoztam, de a Mezőgazdasági Főiskolán, majd az Állattudományi Karon, de később is az élelmiszer tudományban végzett tevékenységem során jól tudtam állattudománnyal kapcsolatos tudásomat hasznosítani. Soha nem lett belőlem állattenyésztő, megmaradtam vegyésznek, de azért, ha az állattenyésztők közé kerültem, nem sokan mondták meg, hogy kevés a gyakorlati tapasztalatom.

A kémiával kapcsolatos munkásságom szorosan kapcsolódik az állattudományhoz. Az állattenyésztők részéről sok igény merült fel új megoldások keresésére, melyet össze tudtam egyeztetni vegyész, elsősorban analitikai elképzeléseimmel. Az analitikai módszerek nagy részét azért dolgoztuk ki, mert valami igényt tudtunk vele kielégíteni az élelmiszer- vagy takarmányanalízisben, vagy mondjuk a kérődzők bendőjében lejátszódó biokémiai folyamatokkal kapcsolatban felmerült problémák megoldásában.

Az előzőek miatt a tudományos kutatás során elért eredményeket három részre bontanám. Először ismertetném az analitikai kémia, az élelmiszer- vagy takarmányanalitika, az analitikai módszerek gyakorlatban történő speciális alkalmazása területén elért eredményeket, majd ezt követné egy új fejezetben az állattudomány, ezt követően pedig az élelmiszertudomány kapcsán elért új tudományos eredmények.

3.1. Az analitikai kémia, élelmiszer- és takarmányanalitika területén elért új tudományos eredmények

3.1.1. A fehérje és a fehérje aminosav-összetételének meghatározása

A fehérjeanalitikai vizsgálatok kezdetei a Kaposvári Egyetem Központi Laboratóriumában az 1970-es évek elejére nyúlnak vissza. Patkányokkal végzett etetési tesztekkel becsülték a fehérjehasznosulást, illetve a fehérje biológiai értékét. A

biológiai érték meghatározására a *Tetrahymena piriformis* W egysejtű tesztorganizmust is alkalmazták, kihasználva azt, hogy ennek a mikroorganizmusnak az esszenciális aminosav szükséglete rendkívüli módon hasonlít a sertéséhez és az emberéhez. Az 1980-as évek elején sikerült beszerezni egy Kjeld-Foss 16200 típusú automata nitrogén meghatározó berendezést, mely nyolc óra alatt mintegy 120-140 minta nitrogéntartalmának meghatározását tette lehetővé. Később ezt a készüléket az alkalmazott higany katalizátor miatt már nem gyártották, ezért a továbbiakban a fehérje meghatározását ugyancsak a Kjeldahl módszerrel dolgozó két Kjeld-Tec automatával végeztük. Mivel a katalizátor és forráspontemelő tabletta túl drága volt, mi saját készítésű, jóval olcsóbb keveréket állítottunk elő kálium-szulfát műtrágyából.

A nyersfehérje-tartalom meghatározásán túl a Központi Laboratórium egyik fő kutatási iránya a fehérje aminosav-összetételének meghatározása volt. Az 1970-es évek elején egy Lys-75 típusú automatikus aminosav-analizátorral, 1981-től egy LKB 4101-es automata analizátorral, 1985-től pedig egy OE-914 típusú aminosav-analizátorral határoztuk meg a fehérje aminosav-összetételét, majd a sort két cseh gyártmányú Ingos AAA típusú analizátor zárta, amelyek már alkalmasak voltak a lítium pufferekkel történő munkára is. Az egyik analizátorunkat a fehérje hidrolizátum, a másikat, lítium pufferek alkalmazásával, a szabad aminosavak meghatározására használtuk. Az 1996-ban beszerzett LaChrom MERCK-Hitachi nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal (HPLC) a fehérje D-aminosav tartalmát, ill. az L-aminosavakhoz viszonyított arányokat határoztuk meg, de a készülék alkalmatlan volt ioncserés üzemmódban nagyszámú minta pontos vizsgálatára.

3.1.2. Aminosav-összetétel meghatározás különböző fehérjehidrolízis módszerekkel

1970-es években hazánkban sem szabvány, sem ajánlás nem volt a fehérje hidrolízisére az aminosav-analízist megelőzően, ezért a szakirodalomból ismert számos fehérjehidrolízis módszer közül választottuk ki és teszteltük azokat, melyek legalkalmasabbnak látszottak élelmiszerek és takarmányok aminosav-összetételének meghatározására. A különböző hidrolízismódszerek alkalmazásával szerettünk volna információt kapni arról, hogy a hidrolizáló ágens minősége (6 mólos sósav;

3 mólos para-toluol-szulfonsav, PTS-OH és 3 mólos merkaptó-etán-szulfonsav, MES-OH), a hidrolízis hőmérséklete (95, 110 és 125 °C), valamint a hidrolizátum feldolgozása milyen mértékben befolyásolja a különböző fehérjetartalmú minták (kukorica, tejpor, szójadara és húsliszt) aminosav-összetételét, különös tekintettel azok metionin-, cisztin- és triptofántartalmára.

A meghatározásokat LKB 4101 típusú automatikus aminosav-analizátorral MERCK gyártmányú ciszteinsav belső standardot alkalmazva végeztük. Az analízis körülményei, valamint a kromatogramok értékelése megegyezett az aminosav-analizátor kézikönyvében leírtakkal. Vizsgálataink eredményeit összefoglalva az alábbi megállapításokat tehetjük:

A 95 °C-on 6 M HCl-val végzett hidrolízis, valamint a 3 M MES-OH-val és a 3 M PTS-OH-val 110 °C-on végzett hidrolízis mind a négy alapanyagnál csak mintegy 65–80%-os kitermelést adott az aminosavakra a 110, illetve a 125 °C-on végzett 6 M HCl-as hidrolízishez viszonyítva.

A 110 °C-on szulfonsavval és 95 °C-on 6 M HCl-val végzett hidrolíziskor a Val, Ile és a Leu kitermelés igen alacsony, mintegy 55–60%-a a 110, illetve 125 °C-on végzett hidrolízisének.

A hidrolízis hőmérsékletének növelésével (110, illetve 125 °C) nő az aminosavak összes mennyisége, nő a Val, Ile és Leu koncentrációja, ezzel szemben erőteljesen csökken a Cys mennyisége, míg a Met-tartalom alig változik.

A nitrogén atmoszférában bepárolt minták Met- és Cys-tartalma mintegy 15–20%-kal nagyobb a levegő atmoszférában bepárolt mintákéhoz viszonyítva, és nem különbözik lényegesen azon minták összetételétől, ahol a sósavat 4 M nátrium-hidroxiddal közömbösítettük.

A minták Cys-tartalma a perhangyasavas oxidációt követő ciszteinsav formában történő meghatározáskor másfél-kétszer nagyobb volt mint cisztinformában meghatározva.

A 3 M PTS-OH-val, illetve a 3 M MES-OH-val 125 °C-on végzett fehérjehidrolízis mind az aminosavak összegében, mind a nehezen szétválasztható peptidkötésekben lévő Ile, Leu és Val mennyiségében is azonos eredményt ad a 110 °C-on végzett 6 M sósavas hidrolízissel.

Az összes savas hidrolízismódszer közül a 3 M MES-OH-val 125 °C-on végzett hidrolízis adja a legnagyobb eredményt a metioninra és a triptofánra.

3.1.2.1. Rövid ideig, magas hőmérsékleten végzett fehérjehidrolízis

A hidrolízis módszerek optimalizálása után a 90-es évek elején merült fel igénye annak, hogy magasabb hőmérsékleten (160–180 °C-on), de lényegesen rövidebb idő alatt (20–60 perc) hidrolizálva a fehérjét, magasabb kitermelést lehessen elérni az érzékeny – elsősorban triptofán, metionin, cisztein – aminosavak esetében. A fentiek miatt egy magas hőmérsékleten (170 °C-on) és rövid ideig (45 perc) végzett fehérjehidrolízis módszert dolgoztunk ki 6 M-os sósav és 3 M-os merkaptó-etán-szulfonsav hidrolizáló ágensekkel. Az új módszer segítségével a korábbinál magasabb kitermelést tudtunk elérni a triptofán és a kéntartalmú aminosavak esetén.

3.1.2.2. Triptofán meghatározás különböző fehérjehidrolízis módszerekkel

Élelmiszerek és takarmányok triptofántartalmának gyors és pontos meghatározása nehéz feladat, mert a savas hidrolízis alatt a triptofántartalom – különösen szénhidrátok jelenlétében – teljesen elbomlik. A triptofán szabad és kötött formában is egészen labilis fény és hidrogénionok jelenlétében. A bomlási folyamatok magasabb hőmérsékleten különösen felgyorsulnak, ezért a triptofánt – annak ellenére, hogy élelmiszerek és keveréktakarmányok nagyrészt kitevő gabonamagvak második limitáló aminosava, és táplálkozási és takarmányozási szempontból igen fontos lenne ismerete – a többi aminosavakkal együtt a hagyományos kromatográfiás módszerekkel rendszerint nem lehet meghatározni.

Mivel a 6 M HCl-as fehérjehidrolízisnél szénhidrátok jelenlétében a triptofán kvantitatíve elbomlik, ezért a savas hidrolízismódszerek közül a 3 M MES-OH-at és a 0,2% 3-(2-aminoetil)indol (triptamin) tartalmú PTS-OH-at próbáltuk ki kis és nagy triptofántartalmú mintáknál. A savas hidrolízisek mellett a fehérjét bárium-hidroxiddal is hidrolizáltuk 24, 48 és 72 órán át annak eldöntésére, hogy melyik hidrolízisidő adja az optimális kitermelést a triptofánra. A hidrolízis befejezésekor a báriumot karbonát és szulfát formában távolítottuk el a hidrolizátumból, vizsgálva itt is a hidrolizátum feldolgozásának hatását a triptofántartalomra.

A hidrolizátumok feldolgozása után a triptofánt ioncserés oszlopkromatográfiával és a para-dimetilamino-benzaldehides fotometriás eljárással is meghatároztuk. Megállapítottuk, hogy azonos hidrolizátumból elvégezve a triptofán meghatározását, nincs szignifikáns különbség a fotometriás és az ioncserés oszlopkromatográfiás eljárás között. A két savas hidrolízismódszer közül a MES-

OH-as módszer mindegyik vizsgálati anyagnál szignifikánsan nagyobb eredményeket adott, mint a PTS-OH-as. A hidrolízisidő függvényében vizsgálva a triptofántartalmat megállapítottuk, hogy a 48 órás hidrolízisidő adta a legnagyobb kitermelést, a 24 órás a legkisebbet, a 72 órás hidrolízisnél pedig már a triptofán bomlásából származó veszteséggel is kell számolni a bárium-hidroxidos fehérjehidrolízisnél.

Az optimális fehérjehidrolízis idejének meghatározása után a 48 órás, bárium-hidroxiddal végzett hidrolizátumból a báriumot karbonát formában és szulfát formában is eltávolítottuk. Magasabb triptofántartalmat mindegyik vizsgált anyagnál a bárium szulfát formában történő eltávolításakor kaptuk. Az átlagos eltérés a két hidrolízis módszer között 5,2% volt a bárium-szulfátos módszer javára.

A savas és a lúgos hidrolízismódszerrel kapott triptofán eredményeket összehasonlítva megállapítottuk, hogy a triptofántartalom minden vizsgált anyagnál a bárium-hidroxidos hidrolízis esetében szignifikánsan nagyobb volt, függetlenül az ioncserés oszlopkromatográfiás vagy a fotometriás meghatározástól.

3.1.2.3. A fehérje triptofántartalmának meghatározása szulfonsavas hidrolízissel, és a triptofán enantiomerek szétválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

Fehérjék triptofántartalma a leggyakrabban használt savas hidrolízis során teljes mértékben elbomlik, lúgos hidrolízis közeget alkalmazva viszont a minták teljes Trp-tartalma meghatározható. Lúgos körülmények között azonban, a fokozott racemizáció miatt, a Trp-enantiomerek meghatározására nincs lehetőség.

A kutatás során a Trp-enantiomereket 1-tio-β-D-glükóz-tetraacetáttal és o-ftálaldehiddel képzett diasztereoizomerek formájában elválasztottuk a fehérjékben előforduló egyéb aminosavaktól. Megvizsgáltuk a legnagyobb kitermeléssel járó savas fehérjehidrolízis-módszereket a Trp-enantiomerek meghatározása szempontjából. Merkaptó-etán-szulfonsav (MES) jelenlétében a származékképzési reakció nem megy végbe, és a MES-felesleg megkötését, eltávolítását is csak nagyon nehezen lehet megoldani. A p-toluol-szulfonsavas (PTS) módszert vizsgáltuk önmagában, ill. triptamin és 3-indol-propionsav védőreagens jelenlétében. A PTS jelenléte a származékképzést nem zavarta, azonban csupán PTS-at alkalmazva hidrolizáló reagensként a Trp visszanyerése nagyon alacsony. Amennyiben a Trp indolgyűrűjének megvédése érdekében triptamint is adunk a rendszerhez

a hidrolízis során, a származékképzéskor csapadék képződött, így az elválasztást HPLC-vel nem tudtuk megvalósítani. 3-indol-propionsavat alkalmazva védőreagensként a származékképzés lejátszódott, a triptofán visszanyerés 75% felettinek adódott.

Az így kidolgozott módszer alkalmazásával vizsgáltuk lúgosan kezelt vágóhídi hulladékok D-Trp-tartalmának változását a kezelések hatására. A kezelések eredeti célja a vágóhídi hulladékok ártalmatlanítása volt. A kezeléseket nátrium-, illetve kálium-hidroxid-oldattal végeztük 2, 3 és 6 órán át 135, 150 és 153 °C-on. Összefoglalva elmondható, hogy az általunk alkalmazott hő- és lúgkombináció során a triptofánnak 45–50%-a D-módosulattá alakul át. Amennyiben az így kapott hidrolizált termék egyéb paraméterei meg is felelnének a korszerű takarmányozás feltételeinek, számolni kell azzal, hogy az aminosavak többsége teljes racemizációt szenved az eljárás során.

A szakirodalomban számos közlemény jelent meg, melyek a D-aminosavak élő szervezetre gyakorolt hatásáról szólnak. Nem találtunk azonban ezek között olyat, ami a D-Trp hatását vizsgálta volna, ezért kutatásunk során patkányokon teszteltük a takarmánnyal a szervezetbe jutott D-Trp hatását. Vizsgáltuk az egyszeri nagy dózisú D-Trp adagolásának következményét, valamint hosszabb távon, folyamatos adagolás mellett az egyes szervekben való felhalmozódást. Az etetési szakaszt követően meghatároztuk a patkányok májának, veséjének és lépének, valamint az egyszeri etetések esetén a béltartalomnak a D-Trp-tartalmát. Az egyszeri nagy mennyiségű D-Trp bevitel nem okozott kimutatható mennyiségű D-Trp-tartalmat a szervekben, a hosszabb idejű kezelés esetén a májban nem, a vesében és a lépben azonban ki tudtuk mutatni a D-Trp jelenlétét.

3.1.2.4. Gyors módszer a fehérje cisztintartalmának meghatározására

A hidrolízis módszerek optimalizálása után néhány aminosav esetében új módszert dolgoztunk ki azok meghatározására, illetve módosítottuk az irodalomban közölt módszereket a pontosság javítására. Kis fehérje- és cisztintartalmú anyagoknál a meghatározás metodikai nehézségein túl még azzal is számolni kell, hogy a cisztintartalom a fehérjehidrolízis során végbemenő bomlás és oxidáció miatt lényegesen kisebb lesz a valóságosnál. Mivel a metionin oxidációja a cisztinhez viszonyítva nem számottevő a fehérjehidrolízis folyamán, ezért csak a cisztin meghatározására egy gyors és termelékeny módszert dolgoztunk ki, mely a cisztinmeghatározás

pontosságát a többi aminosavéval azonos szintre emeli, a módszer termelékenysége pedig 5–15-szerese a hagyományos módon végzett meghatározásnak.

A meghatározás elve a következő: a zsírtalanított vizsgálandó anyaghoz 20 mg fehérjére 0,8 cm³ frissen készített perhangyasavat adunk, majd az oxidációt 15 percen keresztül 50 °C-on végezzük el. Mínusz 40 °C-on végzett liofilezéssel a reakciót leállítjuk, illetve eltávolítjuk a mintából a perhangyasavat. A 6 M sósavas hidrolízist követően a hidrolizátum feldolgozása után az LKB 4101 automatikus aminosav-analizátor mintaadagoló berendezésének segítségével, az áramlási paraméterek lényeges megváltoztatása nélkül három percenként egymás után öt mintát adagoltunk az ioncserélő oszlopra. Az öt minta ciszteinsavvá oxidálódott cisztinje folyamatosan három percenként egymás után jelent meg a kromatogrammon, majd az 5. minta ciszteinsava után jelent meg az 1. minta aszparaginsava. Ekkor az analízist megszakítottuk, majd az ioncserélő oszlop regenerálása és equilibrálása után folytattuk a cisztin meghatározást. Három percről két percre csökkentve a mintabevitelek közötti időt, öt helyett hét minta ciszteinsavtartalmát lehet meghatározni, bár a csúcsok elválása egymástól kissé romlik.

Meghatározva a hagyományos módon és az általunk kidolgozott gyors módszerrel a kukorica, a tejpor, a szója és a húsliszt cisztintartalmát, az oxidált mintából végzett cisztinmeghatározás mintegy 45%-kal nagyobb eredményt adott a hagyományosnál. Megállapítottuk, hogy mintánként jelentős eltérések lehetnek a cisztinvesztességben a hagyományos módszernél a mi gyors módszerünkhöz viszonyítva, ezért nagyszámú adat birtokában sem tudunk olyan szorzófaktort alkotni, melynek alkalmazásával korrektebb eredményeket kaphatnánk. Ha szeretnénk pontosan megismerni a minta cisztintartalmát, akkor a cisztint a perhangyasavas oxidációt követő többszöri egymás utáni mintafelvittel (gyors módszer) minden esetben meg kell határozni.

3.1.2.5. Cisztinmeghatározás cisztein formában a merkaptó-etán-szulfonsavas hidrolízissel

MES-OH-val végezve a fehérje hidrolízisét, a cisztin kivételével az összes aminosavra megfelelő eredményt kapunk, sőt a redukáló közeg miatt a minták metionintartalma nagyobb, mint a 6 M sósavas hidrolízis esetében. A módszer igen nagy hátránya a gyakorló szakember számára az, hogy a cisztin redukciója és a MES-OH és a cisztein szulfhidril csoportja között valószínűleg létrejövő tioéter

kötés miatt cisztint a vizsgált mintákból nem lehet kimutatni. A tioéter kötés létrejöttének közvetett bizonyítéka a képződött kénhidrogén, de ennek meghatározása alapján közvetlenül nem lehet a tioéter kötésben szereplő cisztein mennyiségére következtetni, mert a kénhidrogén a MES-OH bomlásából is származhat a hidrolízis folyamán. A kénhidrogén mellett a reakció másik végterméke a 2-amino-3-(2-szulfoetil-tio)-propionsav.

Annak bizonyítására, hogy vajon a fenti átalakulással kapott 2-amino-3-(2-szulfoetil-tio)-propionsav (a továbbiakban tioéter) ioncserés oszlopkromatográfiával elválasztható-e a többi aminosavtól, és mennyiségét hozzáadva a redukcióval keletkezett ciszteinhez, a minták cisztintartalma meghatározható-e, illetve a cisztein és a tioéter valamelyik aminosav csúcsba mosódva megghamisíthatja-e annak mérési eredményét, végeztünk kísérleteket.

Vizsgálatainkat egy kis (tejpor) és egy nagy (toll-liszt) cisztintartalmú mintával folytattuk. A mintákat orvosi ampullában, 125 °C-on, 24 órán át, 5 cm³ 3 M MES-OH-val hidrolizáltuk, majd közömbösítés után aminosav-összetételüket LKB 4101-es típusú aminosav-analizátorral határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a MES-OH-as hidrolizátum analízisekor a MES-OH csúcsa közvetlenül a frontban jelenik meg, fényelnyelése 440 nm hullámhossznál többszöröse az 540 nm-en mértnek. Cisztin standardot kezelve vagy nagy cisztintartalmú mintát hidrolizálva MES-OH-val, a MES-OH-ba részlegesen beolvadva mennyiségileg nehezen értékelhető csúcsot kaptunk, amit az általunk feltételezett tioéterként tudtunk beazonosítani. A kromatogramokról teljesen eltűnt a cisztin, és szembevető változásként tapasztaltuk a prolin jelentős mennyiségű növekedését. Fentiekből következik, hogy normál aminosav-meghatározási technikával a cisztinből keletkezett cisztein a prolinba olvadva megghamisítja annak mérési eredményét. Az aminosav-analizátor A puffere pH-jának és hőmérsékletének csökkentésével, valamint alkohol koncentrációjának növelésével el lehet egymástól választani a ciszteint és a prolint, de fenti változtatásokkal a többi aminosav (Pro és Glu, Gly és Ala) elválasztását rontjuk. A közölt változtatásokkal, valamint a cisztein standard cisztinból történő előállításával a minta cisztintartalmát cisztein formában is meg lehet határozni, a módszer azonban sorozatmérésekre nem használható, ugyanis külön-külön analízissel kellene egyrészt a cisztint, másrészt az összes többi aminosavat elválasztani és meghatározni.

Vizsgálataink felhívták a figyelmet arra is, hogy a MES-OH-as hidrolízisnél a cisztinből keletkezett cisztein a prolinnal egybeolvadva jelenik meg a kromatogrammon, és ez különösen magas cisztintartalmú fehérjék esetében a prolin vizsgálati eredményeket megghamisítja. Ugyanezek a vizsgálatok figyelmeztetnek arra is, hogy a hidrolízisnél alkalmazott redukáló anyagok a MES-OH-hoz hasonlóan – eddig nem tanulmányozott – átalakulásokat okozhatnak a fehérjehidrolízis folyamán.

3.1.2.6. A redukáló tiolcsoportot tartalmazó merkaptó-etán-szulfonsav alkalmazása a fehérje hidrolízisére és az aminosavak származékképzésére o-ftáldialdehiddel

A merkaptó-etán-szulfonsavas (MES-OH) hidrolízist korábban rutinszerűen alkalmaztuk a triptofántartalom meghatározására kis szénhidráttartalmú mintáknál. Ezt követően egy rövid ideig (30–40 perc) és magas hőmérsékleten (160–170 °C) végzett gyors hidrolízis-módszert dolgoztunk ki a fehérje triptofán- illetve metionin-tartalmának mérésére MES-OH-val végzett hidrolízissel. Az, hogy a MES-OH ugyan úgy tartalmaz tiolcsoportot mint az aminosavak származékképzésére széles körben használt merkaptó-etanol (ME), valamint a korábbi munkáink adták az ötletet arra vonatkozóan, hogy a MES-OH-t ne csak hidrolizáló ágensként, hanem származékképző reagensként is alkalmazzuk az aminosav-analitikában. Kísérleteink során a kukorica, a szója és a húsliszt aminosav-összetételét határoztuk meg 6 M sósavval, 24 órán át, 110 °C-on hidrolizált mintákból ioncserés oszlopkromatográfiával (IEC) és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) o-ftáldialdehid/merkaptó-etanol (OPA/ME) és o-ftáldialdehid/merkaptó-etán-szulfonsav (OPA/MES-OH) származékképzést követően. Ezekkel a vizsgálatokkal párhuzamosan a mintákat 3 M MES-OH-val hidrolizáltuk 24 órán át 125 °C-on, és MES-OH hozzáadása nélkül, csak OPA-val végeztük el a származékképzést.

A MES-OH-val végzett származékképzést követő analízis során metanol, nátrium-acetát és acetonitril gradiens segítségével az aminosavak szétválasztása a valin és a metionin kivételével jónak mondható. Az aminosavak elúciós sorrendje a következő: Asp, Glu, Ser, Gly, His, Thr, Ala, Arg, Tyr, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu és Lys. A Val és a Met közti felbontás az eluens erősségének csökkentésével foko-

zatosan javítható, de még nem éri el a megkívántat. A módszer igen nagy előnye az OPA/ME módszerhez képest, hogy az érzékenység mintegy ötszörösére nő, és nem kell külön származékképző reagenst alkalmazni, hisz a MES-OH-val a hidrolízis és a származékképzés is elvégezhető. Problémát jelent, hogy a nagy fehérjetartalmú mintáknál a hígítás után a MES-OH mennyisége nem elegendő a származékképzéshez, az 5% fehérjetartalomnál alacsonyabb minták esetében pedig a MES-OH a savas aminosavak elválasztását zavarhatja. 12 órával a származékképzés után a csúcsintenzitások jelentősen lecsökkennek, tehát az analízist a származékképzést követően 12 órán belül el kell végezni.

A merkaptó-etán-szulfonsavat tehát, mivel szerkezete nagyon hasonlít a merkaptó-etanolhoz, nem csak hidrolizáló ágensként, hanem származékképző reagensként is használva új módszert dolgoztunk ki az aminosavak szétválasztására OPA-merkaptó-etán-szulfonsav oszlop előtti származékképzéssel fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC). A kapott kromatogram nagyon hasonlít az OPA-merkaptó-etanolal végzett analízishez, a különbség csak annyi, hogy néhány csúcs elválása nem olyan tökéletes, a módszer előnye viszont az, hogy a szulfonsav-csoport következtében a kapott származék elúciós ideje rövidebb az OPA-merkaptó-etanolhoz viszonyítva. A módszer optimalizálását, illetve validálását elvégeztük.

3.1.3. Oszlopkromatográfiás módszerek a bakteriális eredetű fehérje meghatározására kérődzőknél

3.1.3.1. A diamino-pimelinsav meghatározása a fehérjealkotó aminosavakkal együtt

Köztudott, hogy a diamino-pimelinsav (DAPA) a baktériumok sejtfalában előforduló peptidoglikánok alkotórésze, így ez a vegyület jól használható a baktérium eredetű fehérje jelzésére és mennyiségi meghatározására. A DAPA-t aminosav-analizátorral el lehet választani a fehérjealkotó aminosavaktól, és azokkal együtt a fehérje savas hidrolízisét követően meghatározható. A módszer az aminosav-analízisre leírt paraméterek pontos betartásával jó elválást ad a DAPA-ra mindaddig, míg a DAPA és a többi aminosav koncentrációja azonos nagyságrendbe esik, illetve a DAPA melletti két aminosav – a metionin és az izoleucin – mennyisége a DAPA koncentrációjának 8–10-szeresét nem haladja meg. Ekkor

a DAPA az izoleucin, illetve metionin vállcsúcsaként jelenik meg a kromatogramon, ami a kiértékelést bizonytalanná teszi.

Fentiek miatt egy új módszert dolgoztunk ki a DAPA bendőfolyadékból, illetve bélsárból történő meghatározására, melynek lényege, hogy az analizálni kívánt beszárított bélsár, illetve bendőfolyadék mintát perhangyasavval oxidáltuk, melynek során a cisztin ciszteinsavvá, a metionin pedig metionin-szulfonná alakult. Az oxidáció hatására a metionin-szulfon az aszparaginsav és a treonin között jelenik meg a kromatogrammon, felszabadítva a valin és az izoleucin közötti területet. Az aminosavak analíziséhez használt pufferek összetételének optimalizálásával elértük, hogy a DAPA eredeti helyéről pontosan a valin és az izoleucin közé kerüljön, és így, mivel elég távol van a valintól is és az izoleucintól is, e két aminosav igen nagy koncentrációban sem zavarja az esetleg csak nyomokban előforduló DAPA meghatározását. A DAPA standardot perhangyasavval oxidálva megállapítottuk, hogy a perhangyasavas oxidáció nem befolyásolja a DAPA mennyiségét.

3.1.3.2. Gyors módszer a diamino-pimelinsav meghatározására

Mivel a perhangyasavas oxidáció után a minta metionint nem tartalmaz, és a pufferek összetételének alkalmas megváltoztatásával elérhető, hogy a DAPA a metionin helyén jelenjen meg a kromatogramon, a metionin tesztelésére kidolgozott módszereknél alkalmazott puffereket használva gyors módszert dolgoztunk ki a DAPA meghatározására. A minta perhangyasavas oxidációját követően a DAPA-t 140 x 6 mm méretű oszlopon, 55 °C hőmérsékleten, 3,28 és 4,25 pH-jú, 0,2 mólos nátrium-citrát pufferekkel határoztuk meg.

Fenti kromatográfiás körülmények között a DAPA-t megelőzően a savas és semleges aminosavak összemosódnak, majd a valint követően jól értékelhetően megjelenik a DAPA. A DAPA csúcs megjelenése után az analízist megszakítjuk, majd az oszlop nátrium-hidroxiddal történő regenerálása és A pufferrel történő equilibrálása után folytatható a következő minta DAPA-tartalmának meghatározása.

3.1.3.3. A bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározása a D-aminosav-tartalom alapján

A D- és L-aminosavak szétválasztására és meghatározására általunk kidolgozott vagy a szakirodalomból adaptált módszerekkel a következő kutatásokat végez-

tük. A bakteriális eredetű fehérje mennyiségének meghatározására a már korábban említett DAPA-n kívül a D-alanint is leírták, mint bakteriális markert, a szakirodalomban. Elsőként mi is erre az aminosavra koncentráltunk, és az OPA/TATG származékképzés során sikerült olyan kromatográfiás feltételeket teremteni, melyek segítségével a D- és L-alanint egymástól és a jelenlévő összes többi aminosav enantiomertől is tökéletesen el tudtuk választani. A bendőfolyadékból előállított baktériumok analízise során rájöttünk arra, hogy a baktériumok nem csak számottevő mennyiségű D-alanint, de azzal összemérhető mennyiségben D-aszparaginsavat és D-glutaminsavat is tartalmaznak. E felismerést követően több száz bendőfolyadék, béltartalom és bendőfolyadékból előállított baktérium-massza analízise után módszert dolgoztunk ki a bakteriális eredetű fehérje mennyiségének mérésére a D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-tartalom alapján. Ezt követően most már négy egymástól független marker alapján tudtuk a baktériumok által szintetizált fehérje mennyiségét becsülni.

3.1.4. Minimális racemizációval járó, rövid ideig és magas hőmérsékleten végzett hidrolízis fehérjék D- és L- aminosav-enantiomereinek meghatározására

Tanulmányozva az aminosavak racemizációját tiszta fehérjék, a tejpor és a szabad aminosavak hagyományos módon végzett hidrolízis körülményei között (6 M HCl, 110 °C, 24 h) és magas hőmérsékleten rövid ideig tartó hidrolízis időt alkalmazva megállapítottuk, hogy a szabad aminosavak racemizációja lényegesen lassúbb a peptidláncban kötött aminosavakhoz viszonyítva. Ugyanolyan körülmények között a szabad aminosavaknál előforduló racemizáció csak mintegy 20–40%-a a peptidkötésben lévőkhöz képest. Hagományos módszerrel végezve a fehérje hidrolízisét másfél, két és félszer nagyobb a racemizáció, mint magas hőmérsékleten (160–180 °C) a fehérje tökéletes hidrolízisét eredményező körülmények után. Ez a lényegesen alacsonyabb racemizáció magyarázható azzal, hogy magas hőmérsékleten a fehérje gyorsabban hidrolizál szabad aminosavakra, és a szabad aminosavak racemizációja lényegesen lassúbb, mint a fehérjeláncban kötötteké. Alacsony hőmérsékleten hosszabb ideig végzett hidrolízisnél a peptidláncban kötött aminosavakat hosszabb ideig érik a racemizációt kiváltó hatások, tehát minden olyan hatás, amely meggyorsítja a hidrolízist, csökkenti a racemizációt.

A tejpor esetében a racemizáció nagyobb volt, mint a tiszta fehérjéknél, melyet magyarázni lehet a jelenlévő nehézfémek racemizációt katalizáló hatásával. 48 óra alatt 110 °C-on 4 M bárium-hidroxid hatására az összes aminosav (szabad vagy peptidláncban kötött) teljes mértékben racemizálódott. Bárium-hidroxidos fehérje hidrolízissel tehát a triptofán racemizációját nem lehet meghatározni. A magas hőmérsékleten rövid ideig tartó hidrolízist (160 °C-on 60 és 90 perc, 170 °C-on 45–60 perc és 180 °C-on 30 perc) javasoljuk mindazoknak, akik nem akarnak enzimes hidrolízist alkalmazni, és szeretnék a fehérjeláncban bekövetkezett racemizáció mértékét meghatározni.

3.1.4.1. A fehérjealkotó D- és L-aminosavak szétválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával diasztereomer dipeptid formában

A DAPA mellett a D-alaninról is kimutatták, hogy alkotórésze a baktérium sejtfal peptidoglikánjainak, így ez a vegyület is jól használható a baktérium eredetű fehérje jelzésére és mennyiségi meghatározására. Ezért – a peptidkémiaiban az 1970-es években lejátszódott fejlődés figyelembe vételével – úgy döntöttünk, hogy ioncserés oszlopkromatográfiás módszert dolgozunk ki a D- és L-aminosavak diasztereomer dipeptid alakban történő elválasztására és meghatározására. A módszer kidolgozásánál törekedtünk arra, hogy azt egy aminosav-analizátorral rendelkező laboratóriumban reprodukálni lehessen, a módszer lehetőleg egyszerű lépésekből álljon, és sorozatvizsgálatra is alkalmas legyen. Fentiek figyelembe vételével a D- és L-aminosavak szétválasztására és meghatározására általunk javasolt módszer az alábbi lépéseket tartalmazza: a minta előkészítése, a fehérje sósavas hidrolízise, az aminosavak szétválasztása ioncserés oszlopkromatográfiával, a diasztereomer dipeptidek szintézise, a diasztereomer dipeptidek szétválasztása és meghatározása.

A módszer leglényegesebb pontja a diasztereomer dipeptidek szintézise, szétválasztása és meghatározása. A peptidek szintézisének az aktív észteres kondenzációt, aktív észterként az N-hidroxi-szukcinimid észtert, az acilező aminosav aminocsoportjának védésére pedig a tercier-butyl-oxi-karbonil (BOC) csoportot választottuk. A védőcsoport és az aktív észter kiválasztása után acilező aminosavként a legegyszerűbb, aszimmetria centrummal rendelkező aminosavra – az alaninra (Ala) – esett választásunk. Mivel későbbi vizsgálatainkból kitűnt, hogy az alanil diasztereomer dipeptidek elúciója időigényes, ezért második acilező ami-

nosavnak a cisztint (CySS) jelöltük, bízva abban, hogy az aktív észteres kondenzációval létrehozott tripeptidet perhangyasavval oxidálva két db dipeptidet kapunk, amelynek egyik tagja – a ciszteinsav – ioncserés oszlop-kromatográfiás körülmények között meggyorsítja a dipeptid elúcióját.

3.1.4.1.1. Az alanil-dipeptidek szintézise, szétválasztása és meghatározása

Az alanil-dipeptidek előállításához szintetizáltuk a tercier-butil-oxi-karbonil-L-alanin-N-hidroxi-szukcinimid-észtert, (t-BOC-L-Ala-ONSu), majd szintetikus aminosavakból (standard) vagy az aminosav-analizátorral elválasztott és liofilizéssel beszárított aminosavakból (minta) állítottuk elő az aktív észter segítségével az alanil diasztereomer dipeptideket. Ezzel a reakcióval szintetizáltuk a bázikus aminosavak kivételével az összes fehérjealkotó aminosav L-D és L-L diasztereomer dipeptidjét, meghatároztuk a diasztereomer alanil-dipeptidek optimális analízis körülményeit (hőmérséklet, pH), a retenciós időket és megállapítottuk, hogy a treonin és a szerin kivételével – ahol a diasztereomer dipeptidek jól értékelhető ikercsúcsként válnak csak szét – az elválások tökéletesek, és az értékelést semmilyen körülmény sem zavarja. A retenciós idők alapján csoportosítottuk azokat az aminosavakat, melyek egymás elválasztását nem zavarják, melyeket egy lépésben meg lehet határozni (pl. Asp, Ser, Pro, Ala).

3.1.4.1.2. A 2-szulfonsav-alanil-dipeptidek szintézise, szétválasztása és meghatározása

A 2-szulfonsav-alanil-dipeptidek előállításához szintetizáltuk a bis-tercier-butil-oxi-karbonil-L-cisztin-bis-N-hidroxi-szukcinimid-észtert ((t-BOC)₂-L-CySS-(ONSu)₂), majd az alanil dipeptideknél leírtak szerinti mintákból szintetizáltuk a 2-szulfonsav-alanil-diasztereomer dipeptideket.

Meghatároztuk a 2-szulfonsav-alanil diasztereomer dipeptidek optimális analízis körülményeit (pH, hőmérséklet), megmértük a retenciós időket és megállapítottuk, hogy a 2-szulfonsav-alanil dipeptidek elúciója az ioncserélő oszlopról lényegesen gyorsabb az alanil dipeptidekéénél. A diasztereomer dipeptidek elválása egymástól jónak mondható, a normál aminosav-analízis példájával élve a Thr-Ser elválásához hasonlítható. Mivel a 2-szulfonsav-alanil dipeptidek retenciós idejében az egymást követő aminosavak esetében csak minimális különbségek vannak, az alanil dipeptidekhez hasonló csoportokat itt nem lehet létrehozni. E módszer

előnye az előzőhöz képest az, hogy egy aminosav (pl. alanin) D- és L-izomerének meghatározása lényegesen kevesebb időt vesz igénybe, mint az alanil dipeptideknél; hátránya viszont az, hogy egyszerre csak egy aminosav D- és L-izomerének meghatározását lehet vele elvégezni.

3.1.4.1.3. Az analitikai eredmények felhasználása a bakteriális eredetű fehérje mennyiségének becslésére

A DAPA és a D-Ala analitikájának kidolgozása után meghatároztuk a szarvasmarha, a kecske és a juh bendőbaktériumainak aminosav-összetételét, DAPA- és D-Ala-tartalmát. Megállapítottuk, hogy a három állatfaj bendőbaktériumai fehérjéjének aminosav-összetétele, DAPA- (0,69–0,71%) és D-Ala- (2,23–2,30%) tartalma gyakorlatilag megegyezik. Mivel a három faj között e tekintetben szignifikáns különbséget nem sikerült kimutatni, nem követünk el hibát, ha mind a három fajnál ugyanazt a szorzófaktorot – DAPA esetében 143-at, D-Ala esetében 44-et – használjuk a baktériumok által szintetizált fehérje mennyiségének becslésére. Fentiek értelmében tehát ha a bendőfolyadék DAPA-tartalmát 143-mal, D-Ala-tartalmát pedig 44-gyel megszorozzuk, akkor megkapjuk a baktériumok által szintetizált fehérje mennyiségét.

3.1.5. A D- és az L-aminosav-enantiomerek meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A Göteborgi Egyetem Analitikai Kémiai Tanszékével közösen módszereket dolgoztunk ki a fehérjealkotó aminosavak D- és L-enantiomereinek keverékekből történő meghatározására fordított fázisú (RP) HPLC-vel, oszlop előtti származékképzéssel. Az első módszer szerint az aminosav-enantiomerek keverékeit 1-(9-fluorenil)-etil-kloroformáttal (FLEC) reagáltatva képeztük a származékot. Az így kapott FLEC-származékok szétválasztása a savas aminosavak kivételével tökéletes, és különösen jól alkalmazható a bázikus aminosav-enantiomerek szétválasztására. Ezzel a módszerrel az iminosav-enantiomerek cisz- és transz-formái (hidroxiprolin) tökéletesen szétválaszthatók és meghatározhatók. A módszer egyetlen hátránya a reagens rendkívüli drágasága, ezért sorozat minták vizsgálatánál inkább az orto-ftálaldehid/2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-glükopiranozid (OPA/TATG) oszlop előtti származékképzését használtuk. A glükopiranozidos származék szétválása – az ornitin és a lizin kivételével – tökéletesnek mondható,

és különösen jó a szétválás a savas aminosavak esetében. Mindkét módszer tökéletesen alkalmas – egy-két kivétellel – a fehérjealkotó aminosav-enantiomerek szétválasztására, továbbá a két módszer kombinálásával minden aminosav-enantiomer tökéletesen szétválasztható.

3.1.5.1. A kéntartalmú aminosav-enantiomerek elválasztása és meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával perhangyasavas oxidációt követően

A kéntartalmú aminosavak meghatározását élelmiszerekből és takarmányokból megnehezíti, hogy a fehérje hidrolízisnél általánosan alkalmazott körülmények között a fenti aminosavak egy része elbomlik. A veszteségek elkerülése érdekében a tiolcsoportot stabilabb funkciós csoporttá célszerű alakítani. A perhangyasavas oxidáció során a cisztein és a cisztin ciszteinsavvá, a metionin metionin-szulfonná alakul, és a fenti molekulák fehérjehidrolízis alatti vesztesége elenyésző a kiindulási aminosavak veszteségéhez képest. A fenti módszert már évtizedek óta alkalmazzák a kéntartalmú aminosavak mennyiségének meghatározására, és a biológiai minták ciszt(e)in-tartalma a hidrolízist követően ioncserés kromatográfiás módszerrel gyorsan meghatározható. Manapság egyre nagyobb az igény az aminosav-enantiomerek mennyiségének meghatározására, melyet megelőzően a perhangyasavas oxidáció alkalmazása attól függ, hogy lezajlik-e jelentős L-D átalakulás az oxidáció során. Kutatásaink során erre a kérdésre kerestünk választ, valamint nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszert fejlesztettünk ki a ciszteinsav-, és a metionin-szulfon-enantiomerek elválasztására.

A perhangyasavas oxidációt, majd azt követően a hidrolízist a szakirodalomban találtak megfelelően végeztük. Az aminosav-enantiomerek elválasztását OPA/TATG-s származékképzést követően fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) akirális oszlopon valósítottuk meg.

Az analitikai feltételek (szerves oldószer típusa, szerves oldószer-pufferoldat aránya, állófázis típusa) változtatásával megvalósítottuk a cisztin és cisztein oxidált származékának, a ciszteinsav enantiomereinek elválasztását a többi aminosav-enantiomertől izokratikus körülmények között. Megállapítottuk, hogy a metionin végső oxidált származékának, a metionin-szulfonnak az enantiomerei izokratikus körülmények között nem választhatóak el egymástól, és a savas karakterű fehérjealkotó aminosavak enantiomereitől. Ezért kidolgoztunk egy optimális

eluens összetételt, ahol a kéntartalmú aminosavak savas jellegű, oxidált származékainak enantiomereit egymástól és az egyéb fehérjealkotó aminosav-enantiomerektől (aszparaginsav, glutaminsav), gradiens elúció alkalmazásával, el tudtuk választani.

Vizsgáltuk a kéntartalmú aminosavak analízise során alkalmazott perhangyasavas oxidációt, annak hatékonyságát és racemizációra gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy az oxidáció során a racemizáció mértéke nem számottevő, amit a savas reakció körülmények magyaráznak. A cisztein átalakulásánál viszonylag alacsony hatékonyságot tapasztalunk, ezért a módszer alkalmazásakor javasoljuk az előkészítés során a standard oldatok oxidációját is. A módszer hátránya, hogy a perhangyasavas kezelés során az oxidációra érzékeny aminosavak (treonin, szerin, triptofán) részlegesen elbomlanak, ezért ezeket a perhangyasavas oxidációt követően nem lehet meghatározni, ilyen esetekben célszerű a minta analízisét perhangyasavas oxidációval és nélküle is elvégezni. Módszerünket a gyakorlatban nagy metionin- és cisztintartalmú minták (hús, tejpor, toll-liszt) kéntartalmú D-aminosav-tartalmának meghatározására használtuk.

3.1.6. Fosszilis csontok korának meghatározása az aminosavak racemizációja alapján

Az 1980-as évek közepén régész kollégáink részéről igényként merült fel a D- és az L-aszparaginsav koncentrációjának mérése fosszilis csontmintákból, ugyanis a D-aszparaginsav mennyisége, illetve a D/L-arány alapján a fosszilis csontminta korára tudtak következtetni. A közös együttműködés során kiderült, hogy a csontban lévő többi D-aminosavval eddig senki nem foglalkozott, ezért jó lenne azokat is mérni.

Az aminosavak racemizációján alapuló módszernél különös tekintettel kell lenni a hőmérsékletre, azokra a viszonyokra, melyen a minta keresztülment az élő szervezet pusztulása után napjainkig. Mivel az évezredek alatt végbemenő hőmérsékleti változásokat, hőmérsékleti ingadozásokat csak közelítőleg ismerjük, csak becsülni tudjuk a racemizációs (ill. epimerizációs) folyamat során a reakció hőmérsékletét, annak pontos meghatározására (egyes szélsőséges viszonyoktól eltekintve, pl. az óceán mélye) nincs lehetőség.

E tényből kiindulva kellett megoldást keresni arra, hogy az ismeretlen minta összetételét valamilyen módon egy más kormeghatározási módszerrel megismert

korú minta összetételéhez lehessen hasonlítani, ügyelve arra, hogy az ismert és az ismeretlen korú minta lehetőleg azonos vagy igen hasonló előéletű legyen. A legfontosabb szempont itt az volt, hogy a minta milyen talajmélységből (hőmérséklet) és milyen talajtípusból (pH) került elő, hiszen a racemizációs folyamatokat elsősorban a hőmérséklet és a pH befolyásolja.

Fentiek miatt hazánk különböző múzeumaiból összegyűjtöttünk mintegy 150 darab csontmintát, melyeknek korát előzetesen radiokarbon módszerrel meghatározták. A fehérjeépítő aminosavak közül kiválasztottunk hetet, melyek felölelik azt a tartományt, amelyben az aminosavak racemizációját, ill. epimerizációját alkalmazni lehet a kormeghatározásra, hisz tartalmazza a leggyorsabban (His, Phe), a közepes mértékben (Asp, Glu, Ala) és a leglassabban (Ile, Val) racemizálódó aminosavakat.

Az analízis adatok alapján számoltuk ki a különböző aminosavak racemizációjának felezési idejét. A racemizációs felezési idők alapján a His a 2-12 ezer év, a Phe a 3-20 ezer év, az Asp az 5-35 ezer év, az Ala pedig a 10-80 ezer év közötti minták korának meghatározására alkalmazható. Izoleucinnal a 30 ezer év, valinnal pedig az 55 ezer év feletti minták kora határozható meg. 0,1-nél kisebb, ill. 0,7-nél nagyobb D/L arányokat a kor becslésére nem használtunk, mert a meghatározás pontossága ezeken a határokon túl bizonytalan.

Mindegyik aminosav esetében kalibrációs görbéket szerkesztettünk, ahol a D/L arányokat ábrázoltuk a radiokarbon módszerrel meghatározott kor függvényében. Mindegyik görbe gyakorlatilag lineárisnak tekinthető a 0,1-0,5 D/L arány között, és ez a szakasz adja a legpontosabb eredményt a kormeghatározásra, hisz itt a D-aminosav megfelelő, jól mérhető koncentrációban van jelen. A hitelesítő görbe 0,5 után kezd el görbülni, és ez a görbület 0,6 D/L arány fölött már bizonytalanra teszi a meghatározást.

A racemizáció foka szerint az aminosavakat három csoportba lehet sorolni. Az első csoportot alkotják a gyors racemizációs idejű aminosavak: tirozin, fenilalanin és hisztidin, melyeket a fiatal (5.000-50.000 éves) csontminták korának meghatározására tudunk felhasználni. A második csoportba tartoznak azok az aminosavak, melyek a 10.000-100.000 év közötti csontmintákra használhatók. Ebbe a csoportba tartoznak az aszparaginsav, glutaminsav, treonin, szerin, alanin, metionin, lizin és arginin. A harmadik csoportot alkotó aminosavak – valin, izoleucin, leucin – az 50.000-100.000 évnél idősebb csontminták korának meghatározására

alkalmasak. Mindhárom csoportnál 3-5 hitelesítő görbével rendelkezünk, így a csoporton belüli átfedéseket biztosítani tudjuk, sőt egy-egy csontmintára esetenként 2-3 hitelesítő görbe adatait is fel tudjuk használni a kor meghatározására.

Módszerünk tehát alkalmas az 5-450 ezer év közötti korú, elsősorban fosszilis csontok korának becslésére az aminosavak racemizációja alapján, de a módszer alkalmassá tehető más fehérjetartalmú szerves anyag (korall, csiga, kagyló) korának becslésére is.

3.1.6.1. Az aminosavak racemizációján alapuló kormeghatározási módszer pontosságának növelése

A csontokban lejátszódó racemizáció tanulmányozása során rájöttünk arra, hogy a baktériumok által termelt diamono-pimelinsav (DAPA) és az L-izoleucin epimerizációjából származó D-allo-izoleucin ugyanazon a helyen jelenik meg a kromatogramon ioncserés oszlopkromatográfiával (IEC) mérve. Ezért a korábbi kutatók e két aminosavat egyként mérve a D-allo-izoleucint nagyobbnak, ennek megfelelően a vizsgált minta korát is idősebbnek mérték. A D-allo-izoleucin nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) mérésével ez a bizonytalanság a korábbi mérésekhez képest korrigálható, hisz ennél a méréstechnikánál a két vegyület egymástól jól elválasztható.

3.1.6.2. Egy magyarországi és egy erdélyi gyapjas mamut korának meghatározása az aminosavak racemizációján

Miután kidolgoztuk az igen alacsony szintű racemizációt okozó fehérje-hidrolízis módszerünket, hazánk különböző laboratóriumaiból összegyűjtöttünk mintegy 150 db fosszilis csontmintát, melyek korát korábban a Debreceni ATOMKI-ban radiokarbon módszerrel meghatározták. Meghatároztuk ezen minták D- és L-aminosav-tartalmát származékképzés után fordított fázisú folyadékkromatográfiával. Ezt követően a D- és L-aminosav mennyiségéből meghatároztuk a D/L arányokat, melyeket ábrázolva az idő függvényében ún. kalibrációs görbéket szerkesztettünk. Ezután a kalibrációs görbéket használtuk ismeretlen csontminta korának meghatározására, miután meghatároztuk annak D- és L-aminosav-tartalmát. Mivel az aminosavak racemizációját nemcsak az élő szervezet halála után eltelt idő, hanem a talaj hőmérséklete, pH-ja, nyomelemtartalma és egyéb más körülmények is befolyásolják, a radiokarbon keltezésre, mint abszolút módszerre

történő kalibrálással a környezet okozta racemizációs hibákat ki tudtuk küszöbölni.

Magyarországon Pécs mellett, Székelyföldön pedig Csíkszereda mellett talált mamutmaradványok korát határoztuk meg az aminosavak racemizációján (AAR) alapuló kormeghatározási módszerrel. Megállapítottuk, hogy a talaj pH-ja (7,14 Csíkszereda; 7,77 Pécs) jelentős mértékben nem befolyásolta az aminosavak racemizációját, ezért az AAR-módszer alkalmas ezen minták korának meghatározására. A csíkszeredai mamutagyar nyersfehérje-tartalmát 11,7%-nak, a pécsi mamutagyarét viszont csak 1,13%-nak, míg a pécsi koponyacsontét 8,17%-nak mértük, amelyből levonható az a következtetés, hogy a csíkszeredai mamutagyar jobban konzerválódott. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a minta D-allo-Ile-t gyakorlatilag nem tartalmazott, tehát ezt az aminosavat a kor becslésére felhasználni nem lehet. A D-aminosavak esetében megállapítottuk, hogy a Glu és Ala-nál a D/L-arányok mindenütt 0,1 alatt vannak, ezért korábbi kísérleti eredményeinkre alapozva ezeket az adatokat a kormeghatározásban nem tudtuk felhasználni. A csíkszeredai mamutagyar D/L-Asp arányát 0,229-nek mértük, melynek alapján az agyar korát az általunk használt hitelesítő görbe segítségével 9460 ± 470 évre becsültük. A pécsi mamutagyar D/L-Asp arányát 0,247, a koponyacsontét pedig 0,241-nek mértük, így az agyar alapján a kort 10200 ± 500 évre, a koponyacsont alapján pedig 9960 ± 500 évre becsültük. Az agyar és a csont közötti különbség, 240 év, a módszer megengedhető hibahatárán belül van. Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a két mamut fájának utolsó példányai lehettek a Kárpát-medencében.

3.1.7. Az egyén korának becslése a fogak D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-tartalma alapján

Az 1990-es évek közepén pár mérési adatot közöltek arról, hogy a fogakban lévő D-aszparaginsav mennyisége alkalmas lehet a pár évszázaddal korábban elhunytak életkorának becslésére a halál pillanatában. Ezért elvégeztük a Kaposvári Egyetem Fogorvosi Rendelőjéből, a Kaposvári Kórház Szájsebészeti Osztályáról, és a Göteborgi Egyetem Fogászati Klinikájáról begyűjtött több száz ismert korú fogminta analízisét D-aszparaginsavra. 124 db 17-86 év közötti korú fog analízise után hitelesítő görbét szerkesztettünk, melynek során a D/L arányokat, illetve a $\ln(1+D/L)/(1-D/L)$ összefüggést ábrázoltuk a kor függvényében.

Vizsgálataink során rájöttünk arra is, hogy nemcsak a D-aszparaginsav, hanem a D-glutaminsav is mérhető koncentrációban fordul elő ezekben a mintákban, és mind a D-aszparaginsav, mind a D-glutaminsav mennyisége a növekvő korral lineárisan nő. 124 minta analízise után a D/L-aszparaginsav és a D/L-glutaminsav arányokat, illetve mindkét aminosavra az $\ln(1+D/L)/(1-D/L)$ összefüggést ábrázolva a kor függvényében olyan hitelesítő görbéket kaptunk, melyekkel az egyén kora a fog analízise után megállapítható. Módszerünk pontosságát élő emberek eltávolított fogainak analízisével teszteltük, illetve egy Avar- és egy Árpád-kori temetőből származó több száz fogminta analízise alapján az általunk mért kort hasonlítottuk az egyéb antropológiai módszerekkel meghatározott korhoz. Mindkét régészeti leletkollekció esetén rendkívül szoros egyezést kaptunk az antropológiai módszerekkel és az aminosav racemizáció alapján meghatározott kor között.

A módszer pontosságának növelése érdekében meghatároztuk egy antropológiai módszerekkel 40-45 évesnek becsült női csontváz koponyájából származó metsző-, szem-, előőrlo-, és őrlőfogak D-aszparaginsav és D-glutaminsav koncentrációját és a D/L arányokat mindkét aminosavra. Vizsgálatainkból úgy tűnik, hogy a metszőfogak több glutaminsavat tartalmaznak a többiekénél, és az első metszőfog valamint az első őrlőfog aszparaginsav-tartalma is nagyobb volt a többinél. A D-aminosavakat ill. a D/L arányokat vizsgálva megállapítottuk, hogy a két metszőfog D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-tartalma, valamint a D/L arányok a legnagyobbak az összes fog közül, melyeket követtek a szemfog, az előőrlo fogak és az őrlőfogak. Legkevesebb D-aminosavat, ill. D/L aminosav arányt a harmadik őrlőfognál kaptuk. Vizsgálatainkból úgy tűnik, hogy a később kifejlődő fogak kevesebb D-aminosavat tartalmaznak, mint a korábban kibúvók, melyet a fogakban lévő D-aminosavak koncentrációján alapuló kormeghatározásnál figyelembe kell venni. Célszerű összehasonlító vizsgálatoknál azonos fogakat használni, mert a fogak közötti különbség az egyénen belül esetleg nagyobb lehet, mint az egyének közötti különbség, ami a kormeghatározást megbízhatatlanná teheti.

Kutatásaink során rájöttünk tehát arra, hogy a különböző fogak (metsző, szem, előőrlo, őrlő, bölcsesség), mivel különböző időben fejlődnek ki, ezért különböző mennyiségben tartalmazzák a D-aminosavakat, amire figyelni kell a kor meghatározásánál.

3.1.8. Gyapjúszőnyegek és textíliák korának becslése az aminosavak oxidációja és elbomlása alapján

Módszert dolgoztunk ki gyapjúszőnyegek és textíliák korának meghatározására a keratin aminosav-összetételének megváltozása alapján. 23 ismert korú gyapjúszőnyeg és textília aminosav-összetételét határoztuk meg, és az eredményeket hasonlítottuk a kezeletlen gyapjú és az új gyapjúszőnyeg összetételéhez.

A hidrolízis idő optimalizálása és az analitikai módszer pontosságának ellenőrzése után kezdtük elemezni a Magyar Iparművészeti Múzeumból és a Magyar Nemzeti Múzeumból beszerzett gyapjútartalmú fonalak és szőnyegek összetételét. A ruhákból, ill. a díszítő anyagokból csak pár milligramm anyag állt rendelkezésünkre, ezért az eredmények ezekben az esetekben egyetlen analízisből származnak, a szőnyegmintáknál viszont, mivel elegendő anyag állt rendelkezésünkre, két párhuzamos mérést végeztünk.

Megállapítottuk, hogy növekvő korrall nő a ciszteinsav mennyisége, és ennek megfelelően csökken a cisztin mennyisége. A mai gyapjúhoz viszonyítva a ciszteinsav mennyisége 4-500 év alatt tízszeresére, ezer év alatt több mint húszszorosára, 1600-1700 év alatt pedig 28-30-szorosára nőtt. Ezzel szemben a cisztintartalom már 120-140 év alatt is kevesebb mint felére, 400-500 év alatt harmadára, 1600-1700 év alatt pedig mintegy tizedére csökkent. A mai gyapjúszőnyeg összetételéhez viszonyítva az ismert korú gyapjútartalom összetételét teljesen hasonló megállapításokat tehetünk a különbséggel, ami a mai gyapjúszőnyeg és a technológiai beavatkozástól mentes gyapjú összetételében van. Tehát a mai gyapjúszőnyegből származó gyapjútartalom mért 0,31%-os ciszteinsav-tartalom 100-140 év alatt háromszorosára, 4-500 év alatt több mint ötszörösére, 1000 év alatt mintegy tízszeresére, 1600-1700 év alatt pedig mintegy 14-szeresére nőtt. Ezzel párhuzamosan a cisztintartalom 100-140 év alatt 60%-ára, 4-500 év alatt 40%-ára, 1600-1700 év alatt pedig mintegy 12-13%-ára csökkent.

Még jelentősebbek a különbségek, ha a ciszteinsav/cisztein hányadosokat hasonlítjuk össze. Ez az arány a ciszteinsav-tartalom növekedésének és a cisztin-tartalom csökkenésének megfelelően növekvő korrall nő, és az 1600-1700 éves mintáknál 300-320-szor nagyobb, mint a gyapjúnál, és 100-115-ször nagyobb mint a mai szőnyegnél.

A minták metionin- és tirozintartalmát vizsgálva megállapítottuk, hogy mind a metionin, mind a tirozintartalom csökken a korrall, sőt az egyik 1600 és az 1750

éves gyapjúszállból sem tirozint, sem metionint nem tudtunk kimutatni. A minták metionintartalma 100-140 év alatt 85%-ra, 400-500 év alatt 55%-ra, 1600-1700 év alatt pedig majdnem nullára csökkent. A tirozin esetében a csökkenés 100-140 év alatt 10-15%-os, 4-500 év alatt mintegy 30%-os, 1600-1700 év alatt pedig a tirozin is majdnem teljesen elbomlik.

A cisztin és a ciszteinsav-tartalmat ábrázolva az idő függvényében megállapítható, hogy a cisztin egy kezdeti gyors csökkenést követően az 1000-1750 év között már csak kisebb mértékben változik. Egy gyors növekedés a ciszteinsav-tartalomban is megfigyelhető a 0-500 év között, mely növekedés, a cisztintartalom csökkenéséhez hasonlóan, lelassul. A metionintartalom változása az első ötszáz év alatt hasonló a cisztintartalomhoz, ezt követően viszont meredeken zuhan tovább, és az 1600-1700-as évek felé koncentrációja nullára csökken. A tirozin folyamatosan csökken az idő függvényében, és a metioninhoz hasonlóan a 1600-1700 év után mennyisége gyakorlatilag már nulla.

Megállapítottuk tehát, hogy a ciszteinsav-tartalom nőtt, a cisztin-, a metionin- és a tirozintartalom pedig csökkent a korrall. Lineáris regresszióval egyenleteket szerkesztettünk a minták kora és a ciszteinsav-, a cisztin-, a metionin- és a tirozintartalom között, mely egyenleteknek segítségével az ismeretlen gyapjútartalmú minta kora becsülhető.

3.1.9. A ciszteinsav belső standardként történő alkalmazása az aminosav-analitikában

Az aminosav-analitikában az aminosavakkal létrehozott színreakcióhoz legáltalánosabban a ninhidrin reagenst használják. A ninhidrin érzékeny a fényre, a levegő oxigéntartalmára és a felhasznált vegyszerek tisztaságára, ezért az aminosavakkal létrehozott szín intenzitása változik (csökken) a ninhidrinoldat készítése óta eltelt idő függvényében. Gyakori kalibrációs standard futtatástól el lehet tekinteni belső standard alkalmazásával, mely mint az összes aminosav vonatkoztatási alapja, a ninhidrinnel létrejött színreakció változásokat követi, mivel az ismert koncentrációjú belső standardok analízise együtt történik a többi aminosavval. A belső standardok közül legáltalánosabban elterjedt norleucint azoknál az aminosav-analizátoroknál, illetve pufferrendszereknél, ahol az izoleucin, a leucin és a norleucin elválása nem tökéletes, nem lehet alkalmazni, mert a norleucin az izoleucin-leucin után rosszul értékelhető ikercsúcsként jelenik meg a kromatogrammon.

Az említett elválasztási nehézségek miatt a ciszteinsav belső standardként történő alkalmazására tettünk kísérletet. A ciszteinsav rendelkezik mindazokkal a tulajdonságokkal, melyek jellemzői egy belső standardnak: A természetben nem fordul elő, műtermék. A ninhidrinnel 570 nm-en intenzív színeződést hoz létre. Elválása a többi aminosavétól jó, a többi aminosav elválását nem zavarja. Mint a cisztein végső oxidációs terméke, igen stabil vegyület.

Készülékünket tíz standard aminosav keverék futtatásával kalibráltuk be a ciszteinsavra, és a standardoldat koncentrációjából, a bemérésből, a molekulatömegből és a kapott csúcs alatti területekből minden aminosavra meghatároztuk a ciszteinsav equivalens arányossági konstansokat. Ezek segítségével az ismeretlen aminosav mennyisége számítható. Tíz darab teszt-kromatogram értékelése után kiszámoltuk a konstansok átlagát és a szórásokat. A szórások adják meg azt a hibát, mellyel az egyes aminosavakat meg lehet határozni. A hagyományos és a ciszteinsav belső standardra történő vonatkoztatással kapott eredményeket összehasonlítva a következő megállapításokat tehetjük: a hagyományos értékelésnél az egyes aminosavak mennyisége és természetesen ezek összege is csökken, míg ciszteinsav belső standarddal értékelve gyakorlatilag változatlan marad a ninhidrinkészítés után eltelt idő függvényében.

Az előzőeket összefoglalva megállapítható, hogy a ciszteinsav belső standard alkalmazásával a ninhidrin bomlásából, a fotométerlámpa megváltozott fényerősségéből, a fotocella minőségéből és az erősítőrendszer állapotváltozásából adódó hibákat – mivel a változások a belső standardra ugyanúgy hatnak, mint a meghatározni kívánt aminosavakra – ki lehet küszöbölni.

3.1.10. A húslisztek toll-liszt tartalmának meghatározása ioncserés oszlop-kromatográfiával

Az 1980-as évek elején hazánkban nem volt módszer a húsliszthez szándékosan vagy a technológiai hiányosságok következtében hozzákevert toll-liszt részarányának meghatározására. A toll fehérjetartalma magas (75-85%), a vegyes állati fehérjelisztté vagy a csonttal kevert húslisztté jóval alacsonyabb (40-50%), ezért a nagyobb fehérjetartalom érdekében a húslisztet gyakran toll-liszttel hamisították. A feldolgozatlan toll emészthetetlen, ezért hasznosíthatatlan az állat számára, aminosav-összetétele pedig olyan, hogy bármilyen egyéb fehérjéhez keverve rontja annak biológiai értékét. A toll fehérje, a keratin sok cisztint (8-10 g/100 g

fehérje) is tartalmazhat, míg pl. lizintartalma (0,8-1,2%) rendkívül alacsony. Meghatározva a hús és a toll aminosav-összetételét olyan faktorokat szerkesztettünk, ahol a cisztein a számlálóban, a lizin pedig a nevezőben szerepelt. E faktorok segítségével 5% toll-liszt húsliszthez történő keverése kimutatható volt.

Próbálkoztunk a toll-liszt perhangyasavas oxidációjával és részleges hidrolízisével olyan frakciókat, peptideket és peptid töredékeket azonosítani, melyek csak a tollból keletkezhetnek, a húsból nem voltak kimutathatók, és amelyek alapján ugyancsak 5% toll-liszt húsliszthez történő keverése megállapítható volt.

Mindkét esetben a módszer a hús és a toll rendkívül eltérő aminosav-összetelének meghatározásán alapult. Az analíziseket ioncserés oszlopkromatográfiával, LKB 4101-es típusú aminosav-analizátorral végeztük.

3.2. Az állat- és takarmányozástudomány területén elért új tudományos eredmények

3.2.1. A kolosztrum és a tej összetétele különböző genotípusú szarvasmarhák-nál

3.2.1.1. A kolosztrum összetétele különböző genotípusú szarvasmarhák-nál

Kísérleteinket magyartarka (Mt), holstein-fríz (Hf), magyartarka x holstein-fríz F_1 (MtxHf) hungarofríz B (50% jersey, 25% Hf, 25% Mt), holstein-fríz apaságú (62,5% Hf, 25% jersey, 12,5% Mt) és jersey apaságú (62,5% jersey, 31,2% Hf, 6,3% Mt), a továbbiakban HFB, Hfap, Jap fajtájú szarvasmarhával végeztük. A tehenektől az ellést követően fél óra múlva, majd az ellés után 12. és a 24. órában, valamint a 2., 3., és 5. napon vettünk kolosztrum-, a laktáció 7., 9. és 30. napján, majd a havonkénti befejeések alkalmával a laktáció 10–11. hónapjáig pedig tejmintát. A mintavétel alkalmával a kolosztrumból másfél-két liternyi mennyiséget fejtünk ki kézzel, a laktáció további részében a tejmintavétel a teljesen kifejt tőgy elegytejéből történt. A kapott eredményeket a Hfap és a Jap genotípusok példáján mutatjuk be.

3.2.1.1.1. A kolosztrum szárazanyag- és fehérjetartalma valamint fehérjefrakciói

Az elsőfejű kolosztrum szárazanyag-tartalma a két fajta átlagában 24,74%, összesfehérje-tartalma 14,94%, savófehérje-tartalma 10,07%, kazeintartalma 4,87%, NPNx6,38- (számított fehérje) tartalma pedig 0,43%. A kolosztrum összetéte-

lének alakulását vizsgálva az ellés után eltelt idő függvényében megállapítottuk, hogy a szárazanyag-, összesfehérje-, savófehérje-tartalomban a döntő változás az ellés utáni 24 óra alatt zajlik le, s ezt követően már csak csekély mértékben módosul a kolosztrum és az átmeneti tej összetétele. A kazein és az NPN esetében a változás fokozatos, és mindkét komponens csak az ellés utáni 10–30. nap között éri el a normális tejre jellemző értéket.

Az elsőfejű kolosztrum szárazanyag-tartalma egy Jap tehénél volt a legkisebb (19,4%) és egy HFap-nál a legnagyobb (31,2%). Egy Jap tehén kolosztruma tartalmazta a legkevesebb összesfehérjét 10,23%-kal és egy HFap-é a legtöbbet, 21,7%-kal. A legkisebb savófehérjét egy Jap (7,32%), a legnagyobbat pedig egy HFap tehén (13,21%) kolosztrumában mértük. A legkisebb és a legnagyobb kazeintartalmat is egy HFap tehén kolosztrumában mértük 2,91, illetve 7,12%-kal. Egy Jap tehén kolosztrumának volt a legkisebb (0,29%) és egy HFap-nak a legnagyobb (0,53%) az NPNx6,38-tartalma.

Az elsőfejű kolosztrum IgG-tartalma a HFap és a Jap fajtánál átlagosan 111,3 mg/cm³, ami 24 óra alatt átlagosan 30,85 mg/cm³-re csökkent.

Méréseink szerint a jersey génhányad növekedése nem változtatja meg számottevően a kolosztrum IgG-tartalmát. A fehérjefrakciókhoz hasonlóan a kolosztrum IgG-tartalmában az egyedek között nem találtunk szélsőséges eltéréseket. Az elsőfejű kolosztrum IgG-tartalma egy Jap tehénél volt a legkisebb 61,4 mg/cm³-rel, és egy HFap tehénél a legnagyobb 142,4 mg/cm³-rel.

A kolosztrum szárazanyag-tartalma és fehérjefrakciói mind a két fajtánál logaritmikus összefüggés szerint csökkentek az ellés után eltelt idő függvényében. A HFap tehének kolosztrumának immunglobulin-G-tartalma az ellés utáni első napon szignifikánsan nagyobb, mint a Jap-é. A többi vizsgált tejalkotó összetételében az első napon, valamint az összes vizsgált tejalkotó összetételében az ellés utáni 2–3. napon a két genotípus között szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. Az ellés utáni 3–4. naptól a Jap kolosztruma, átmeneti teje és teje szignifikánsan több szárazanyagot, összesfehérjét, savófehérjét és kazeint tartalmaz mint a HFap-é. A Jap és a HFB kolosztrumának összetételében egyetlen időpontban és egyetlen komponens esetében sem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni.

3.2.1.1.2. A kolosztrum és a kolosztrumfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke

Megállapítottuk, hogy a kolosztrum aminosav-tartalma az ellés utáni idő függvényében párhuzamosan változik a kolosztrum összesfehérje-tartalmával, tehát az ellés utáni első napon a HFap kolosztruma tartalmazza a több aminosavat, a 4. naptól pedig a Jap kolosztrumának lesz nagyobb az aminosav-tartalma. A kolosztrum aminosav-tartalma mind a két vizsgált fajtánál logaritmikusan csökken az ellés után eltelt idő függvényében.

A kolosztrumfehérjében (gramm aminosav/100 g fehérje) az esszenciális aminosavak többsége (treonin, valin, cisztin, tirozin) csökken, a nemesszenciális-aminosavak közül pedig a kolosztrumfehérje aminosav-tartalmának több mint 30%-át kitevő glutaminsav és prolin mennyisége nő az ellés után eltelt idő függvényében. A nemesszenciális aminosavak változása ezzel ellentétes.

Az ellés utáni első 24 óra alatt a HFap kolosztrum fehérjéje tartalmazza a több, a Jap-é pedig a kevesebb esszenciális-aminosavat. A különbségek nem szignifikánsak. Az esszenciális aminosav-összegben a genotípusok között fennálló különbségeket a kolosztrumfehérje biológiai értékére végzett számítások alátámasztják. Az ellés utáni első három mintavételnél a HFap kolosztrum fehérjéjének biológiai értéke nagyobb, mint a Jap-é, a számolt különbségek azonban nem szignifikánsak.

A kolosztrumfehérje aminosavai közötti összefüggéseket vizsgálva szoros pozitív korrelációt kaptunk az esszenciális aminosavak (Val-Thr, Cys-Val, Thr-Cys) és a nemesszenciális aminosavak (Glu-Pro) között, és szoros negatív korrelációt kaptunk az esszenciális és nemesszenciális aminosavak (Glu-Val, Glu-Thr, Glu-Cys, Pro-Val, Pro-Thr, Pro-Cys) között. A szoros negatív korreláció a Glu, a Pro és az esszenciális aminosav-összeg, valamint a szoros pozitív korreláció a Thr, Cys és Val, valamint az esszenciális aminosav-összeg között lehetővé teszi a kolosztrum, illetve tejfehérje biológiai értékének becslését a felsorolt aminosavak segítségével.

3.2.1.1.3. A kolosztrum makro- és mikroelem-tartalma

Az elsőfejű kolosztrum hamutartalmát 1,119–1,157% közöttinek, káliumtartalmát 1829–2014 mg/kg, nátriumtartalmát 1174–1220 mg/kg, kalciumtartalmát 2419–2714 mg/kg, foszfortartalmát pedig 1732–2182 mg/kg közöttinek mértük.

Az elsőfejésű kolosztrum magnéziumtartalmát 310–397 mg/kg, cinktartalmát 20–25 mg/kg, vastartalmát 4,85–4,86 mg/kg, réztartalmát 0,520–0,641 mg/kg, mangántartalmát pedig 0,100–0,107 mg/kg közöttinek mértük. Megállapítottuk, hogy a kolosztrum hamu-, valamint makro- és mikroelemtartalma logaritmikusan csökken az ellés után eltelt idő függvényében. A genotípusok között kolosztrumuk és átmeneti tejük ásványianyag-tartalmában szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni.

3.2.1.1.4. A kolosztrum C-vitamin-tartalma

Az elsőfejésű kolosztrum C-vitamin-tartalmát 32,5–34,5 mg/kg-nak mértük, mely 24 óra alatt 20,73, 5–10 nap alatt pedig 15,18–15,60 mg/kg-ra csökkent. Azonos mintavételi időpontokban a genotípusok között kolosztrumuk C-vitamin-tartalmában szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. Az elsőfejésű kolosztrum esetében a legnagyobb C-vitamin-tartalmat egy Hf tehén tejében (42,4 mg/kg), a legkisebbet pedig egy Mt tehén tejében (19,8 mg/kg) mértük.

3.2.1.1.5. Ikreket ellett szarvasmarhák kolosztrumának összetétele

Az előzőekben ismertetett vizsgálatokkal párhuzamosan 17 ikreket és 17 egyet ellett HFap, egy másik kísérletben 15 ikreket és 15 egyet ellett HFB tehén elsőfejésű kolosztrumát gyűjtöttük össze. A 17 ikret ellett HFap tehén közül öt bika-borjakat, öt üszőborjakat, hét pedig vegyes ivarú borjakat ellett, a 15 HFB tehén közül négy bikákat, három üszőket, nyolc pedig vegyes ivarú ikreket ellett. Két kísérlet 32 tehene átlagában az elsőfejésű kolosztrum szárazanyag-tartalma ikerelléskor 30,00%, egyes elléskor 25,03%, összesfehérje-tartalma 16,79 és 14,50%, valódifehérje-tartalma 16,37 és 14,00%, savófehérje-tartalma 12,64 és 10,10%, valódi savófehérje-tartalma 12,22 és 9,61%, kazein-tartalma 4,15 és 4,41%, NP-Nx6,38-tartalma pedig 0,42 és 0,50% volt. Az ikreket ellett tehének elsőfejésű kolosztrumának immunglobulin-G-tartalmát 131,93, az egyet elletteknél pedig 106,58 mg/cm³-nek mértük. A különbség 25,35 mg/cm³. A biológiai érték a két kísérlet átlagában az ikreket ellett teheneknél 122,10, az egyet elletteknél pedig 112,70 volt.

Megállapítottuk azt is, hogy a különböző ivarú ikreket ellett tehének kolosztrumának összetételében nincs különbség, úgy tűnik tehát, hogy az utódok neme ikerelés esetén nem befolyásolja a kolosztrum összetételét. Az ikreket ellettek

kolosztruma szignifikánsan több szárazanyagot, összesfehérjét, valódi fehérjét, savófehérjét, valódi savófehérjét és immunglobulin-G-t tartalmaz mint az egyet elletteké, a kazein és az NPN-tartalomban viszont nem volt szignifikáns különbség a két csoport között.

Az ikreket ellett tehének kolosztrumának aminosav-összetétel alapján számolt biológiai értéke mindkét kísérletben 9,4-del nagyobb mint az egyet elletteké. A nagyobb biológiai érték magyarázható a kolosztrum nagyobb savófehérje-tartalmával, mert a savófehérje biológiai értéke lényegesen nagyobb a kazeinénél. A kolosztrum makro- és mikroelemtartalmában nincs különbség az egyet és ikreket ellettek között.

3.2.1.1.6. Hármast ellett tehének kolosztrumának összetétele

Három HFap és két Hf genotípusú, három ikerborjút ellett tehén elsőfejésű kolosztrumát elemezve megállapítottuk, hogy az öt tehén átlagában a szárazanyag-tartalom 31,80%, az összesfehérjére-tartalom 18,00%, a valódifehérje-tartalom 17,46%, a savófehérje-tartalom 13,79%, a valódi savófehérje-tartalom 13,61% volt, az immunglobulin G-re pedig 136,42 mg/ml értéket kaptunk. Egyes ellésnél az IgG-tartalmat 104,51, ikerelésnél 128,15, hármast ellésnél pedig 136,42 mg/ml-nek mértük, ami az egyes és a hármast ellést összehasonlítva szakmailag releváns különbséget jelent. A hármast ellett tehének kolosztruma ugyan 8,27 mg/ml-rel több IgG-t tartalmazott, mint a kettőt elletteké, a különbség azonban nem volt jelentős a két csoport között.

Mi okozza a különbségeket ez egyet, a kettőt és a hármast ellett tehének között kolosztrumuk összetételében? Egyértelműen adódik egyfajta válasz: A fehérje-frakciókban kapott különbségek elsősorban az IgG-, ill. savófehérje-többletnek köszönhetők. De mi okozhatja a vemhesség alatt ezt a különbséget a csoportok között? A tejmirigy működését szabályozó hormonok közül egyetlen olyan hormon van, amelynek koncentrációját az ikervemhesség befolyásolhatja, ez pedig a placentáris laktogén, PL, (vagy más néven korionmamotrop hormon), amit a méhlepény termel, és a sejtféhrje szintézist, a sejtosztódást fokozza a szervezetben. Az ösztrogének mellett a mammogenezis döntő fontosságú hormonja. Mivel embernél a PL termelés és a placenta nagysága között szoros az összefüggés, feltevezésünk szerint a két, ill. három placenta több placentáris laktogént termel, mint az egy, melynek következménye a fokozott fehérjetermelés, az immunglobu-

linok és a különböző fehérjefrakciók megnövekedett koncentrációja az első fejésű kolosztrumban.

3.2.1.2. A tej összetétele különböző genotípusú szarvasmarháknál

3.2.1.2.1. Az első és az utolsó tejsugarak összetétele

Megállapítottuk, hogy az első tejsugarak szignifikánsan kevesebb szárazanyagot, hamut és zsírt, és szignifikánsan több összesfehérjét, valódi fehérjét és kazeint tartalmaznak mint az utolsók. Nem volt szignifikáns különbség az első és utolsó tejsugarak fehérjéjének aminosav-összetételében, a fehérje biológiai értékében valamint makro- és mikroelemtartalmában. Az összesfehérje 0,23%-kal, a zsírtartalom pedig 7,0%-kal nőtt a fejés folyamán.

3.2.1.2.2. A tej szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói

A HFap tejének szárazanyag-tartalma minden mintavételkor a laktáció folyamán és a laktáció átlagában (11,85%) szignifikánsan kisebb mint a Jap-é (12,8%). A szárazanyag-tartalom mindkét genotípusnál a laktáció első és második hónapjában volt a legalacsonyabb (HFap: 11,44%, Jap: 12,35%), majd folyamatosan nőtt a laktáció végéig (12,60; 13,97%). Hasonló változás mutatkozik a fehérjetartalomban és az összes fehérjefrakció esetében is. Az összesfehérje-tartalom a HFap-nál a laktáció első két hónapjában mért 3,24–3,48%-ról a tizedik hónapig 3,90%-ra nő. Ugyanezek az adatok a Jap esetében 3,48–3,57, ill. 4,42%. Ugyanezekben az időpontokban a valódifehérje-tartalom a HFap esetében 3,10–3,17%-ról 3,74%-ra, a Jap-nál 3,34–3,42%-ról 4,25%-ra, a savófehérje-tartalom 0,651–0,670%-ról 0,835%-ra, ill. 0,691–0,702%-ról 0,880%-ra, a valódi savófehérje-tartalom 0,512–0,530%-ról 0,669%-ra, ill. 0,549–0,555%-ról 0,708%-ra, a kazeintartalom 1,59–2,64%-ról 3,07%-ra, ill. 2,79–2,87%-ról 3,54%-ra, az NPNx6,38-tartalom pedig 0,139–0,140%-ról 0,166%-ra, ill. 0,142–0,147%-ról 0,172%-ra nőtt.

A laktáció átlagában fajták szerint a tej fehérjetartalma és fehérjefrakciói az alábbiak voltak: Összesfehérje: Mt (magyartartka) 3,70%, Hf (holstein-fríz) 3,33%, MtxHf (magyartarka x holstein-fríz F₁) 3,59%, HFap 3,51%, HFB 3,92%, Jap 4,13%. Valódi fehérje: 3,55; 3,18; 3,45; 3,36; 3,77; 3,97%, savófehérje: 0,757; 0,723; 0,743; 0,742; 0,779; 0,791%, valódi savófehérje: 0,605; 0,573; 0,599; 0,589; 0,622; 0,632%, kazein: 2,943; 2,607; 2,847; 2,768; 3,145; 3,339%, NPNx6,38: 0,152; 0,150; 0,144; 0,153; 0,156; 0,159%.

Vizsgálataink szerint a laktációs állapot szignifikánsan befolyásolja a tej fehérjetartalmát és fehérjefrakcióit. A HFap-nál a laktáció elején és végén fejt tej összesfehérje-tartalmában a különbség 0,66%, a Jap-nál pedig eléri a 0,90%-ot. Megállapítottuk, hogy a tej szárazanyag-, összesfehérje-, valódifehérje-, savófehérje-, valódi savófehérje- és kazeintartalma a laktáció első hónapjától a második-harmadik hónapig a HFap és a Jap fajtáknál nem mutat lényeges változást, majd a továbbiakban végig emelkedik a laktáció folyamán. A tej NPN-tartalma mind a két fajtánál emelkedik a laktáció alatt.

Az általunk vizsgált hat fajta tejének összetételét összehasonlítva megállapítottuk, hogy a Mt és a MtxHf tejének szárazanyag-, összesfehérje-, valódifehérje- és kazeintartalma szignifikánsan nagyobb mint a Hf-é, a savófehérje-, a valódi savófehérje- és az NPN-tartalomban viszont a három fajta között szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. A Jap és a HFB fajták teje az NPN kivételével az összes fehérjefrakcióból szignifikánsan többet tartalmaz mint a HFap-é, a Jap és a HFB között viszont egyetlen mintavételkor és egyetlen komponens esetében sem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni. A tejfehérje frakciókat összehasonlítva megállapítható, hogy az NPN kivételével az összes fehérjefrakció esetében egy holstein-fríz tehénél mértük a legkisebb, egy Jap tehénél pedig a legnagyobb értéket.

Vizsgálva a fehérjefrakciók megoszlását az összesfehérje százalékában megállapítottuk, hogy a tej valódifehérje aránya a Mt és a MtxHf-nél gyakorlatilag azonos (95,95–96,10%), és mindkettőnél nagyobb mint a Hf-é (95,50%). A Mt tehén tejének kazein aránya (79,54%) a nagyobb, a Hf-é a kisebb (78,29%), a MtxHf-ek pedig közbülső értéket mutatnak a két kiindulási genotípus között (79,30%). A Hf teje nagyobb arányban tartalmazza a savófehérjét (21,71%) mint a Mt-é (20,46%), és a MtxHf-ek itt is közbülső helyet foglalnak el (20,70%). Az NPNx6,38 aránya a Hf-nél a nagyobb, a Mt-é és MtxHf-é pedig gyakorlatilag azonos.

A valódi fehérje (95,73; 96,15%) és az NPN aránya az összes fehérjén belül a HFB és a Jap tehénknél gyakorlatilag megegyezik. A HFap-nál ehhez képest kisebb a valódi fehérje és nagyobb az NPN aránya. A Jap tejében kisebb a savófehérje és a valódi savófehérje aránya (19,15; 15,30%), mint a HFap-nál (19,87;

15,87%), a HFB pedig a Jap-hoz közelítő közbülső értéket mutat. Fentiekből már következik, hogy a Jap és a HFB tejének kazein aránya nagyobb mint a HFap-é.

A vizsgált fajtákat aszerint, hogy tejük mennyi fehérjét tartalmaz és a fehérjén belül mennyi a savófehérje és a kazein aránya, két csoportba lehet sorolni. Az első csoportba tartozik a Jap, a HFB és a Mt, melyek teje koncentráltabb mint a második csoportot alkotó Hf és HFap-é. Az első csoportba tartozó teheneknél az összesfehérjén belül nagyobb a valódi fehérje és a kazein aránya, a második csoportnál pedig a savófehérje aránya. A második csoport tejfehérjéjének biológiai értéke a nagyobb arányban jelenlévő savófehérje miatt nagyobb mint az első csoporté.

Mivel a sajtgyártás fő fehérjéje a kazein, ezért a koncentráltabb tejet és az összesfehérjén belül nagyobb arányú kazeint tartalmazó Jap, HFB és Mt teje alkalmasabb a tejipari feldolgozásra, mint a hígabb, és az összesfehérjén belül több savófehérjét tartalmazó Hf és HFap teje. A fogyasztók által folyadéktejként történő elfogyasztásra viszont alkalmasabb a hígabb tejet, kevesebb tejfehérjét, és a tejfehérjén belül több nagy biológiai értékű savófehérjét tartalmazó Hf és HFap teje. A MtxHf fajta minden tekintetben közbülső értéket képvisel a két csoportba beosztott genotípusok között.

3.2.1.2.3. A tej és a tejfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke

A tej aminosav-tartalma a laktáció 2. hónapjáig csökken, majd egyenletesen növekszik a laktáció végéig. Ez alól csak a cisztin kivétel, amely a laktáció első két hónapjában nem változik lényegesen, majd a laktáció végén csekély mértékű csökkenést mutat.

A genotípus csoportokon belül vizsgálva a tejfehérje összetételét megállapítható, hogy az egyedek között nincs lényeges eltérés az aminosav-összetételben. Az egyedek közötti eltérés azonban ennek ellenére nagyobb, mint a genotípusok közötti eltérés, ezért a fajták között tejfehérjéjük aminosav-összetételében fennálló különbségekről nem lehet beszélni. A tejfehérje aminosav-összetételének változását vizsgálva a laktáció folyamán megállapítottuk, hogy minden aminosavra jellemző törvényszerű változást nem lehet kimutatni. Szembetűnő a Glu maximumgörbe szerinti változása, a Cys, a Val, a Ser és a Leu minimális csökkenése, valamint a Thr és a Phe növekvő tendenciája. A felsoroltakon kívül az összes többi

aminosav a mérési módszer hibahatárát megközelítő ingadozást mutat a tejfehérjében a laktáció folyamán.

A tejfehérje esszenciális aminosavainak összege a laktáció 2. hónapjában a legnagyobb, és ez az érték a laktáció 5–10. hónapja között határozott növekedést mutat. A tejfehérje biológiai értéke a laktáció 2. hónapjában éri el a maximumát, majd némi csökkenést követően az 5–10. hónap között határozott emelkedést mutatva megközelíti a 2. havi értéket. Mivel a tej összesfehérje-tartalma a laktáció 2. hónapjában a legkisebb, és ezt követően folyamatosan emelkedik, feltételezzük, hogy kisebb fehérjetartalommal a fehérje nagyobb esszenciális aminosav-tartalma és nagyobb biológiai értéke jár együtt.

Fajták szerint vizsgálva az esszenciális és nemesszenciális aminosavak összegét, valamint az aminosav-összetétel alapján számolt biológiai értéket megállapítottuk, hogy a Hf és a HFap tejfehérjéjének biológiai értéke nagyobb, mint a Mt, a HFB és a Jap-é. Ez a tény teljesen egybevág az előző fejezet azon megállapításával, miszerint a Hf és a HFap tejfehérjéjét nagyobb arányban alkotja a savófehérje, mint a Mt, a HFB és Jap-ét, hiszen köztudott, hogy a savófehérje biológiai értéke lényegesen nagyobb mint a kazeiné. Annak ellenére, hogy a Hf és HFap tejfehérjéjének biológiai értéke mintegy 5–7%-kal nagyobb, mint a Mt, a HFB és a Jap-é, a genotípusok között sem az esszenciális aminosav összegben, sem a biológiai értékben nem volt szignifikáns különbség.

3.2.1.2.4. A tej makro- és mikroelem-tartalma

A laktáció átlagában, fajták szerint a tej hamu-, valamint makro- és mikroelem-tartalma az alábbiak szerint alakult: hamu: Mt 0,753%, Hf 0,717%, MtxHf 0,739%, HFap 0,729%, HFB 0,770%, Jap 0,772%, kálium: 1204; 1252; 1348; 1242; 1269; 1372 mg/kg, nátrium: 504; 401; 564; 518; 520; 504 mg/kg, kalcium: 1287; 1080; 1211; 1197; 1280; 1272 mg/kg, foszfor: 996; 902; 943; 961; 1046; 1026 mg/kg, magnézium: 139; 129; 133; 125; 137; 144 mg/kg, cink: 5,63; 4,57; 4,47; 4,34; 4,51; 4,84 mg/kg, vas: 1,07; 0,86; 0,84; 1,05; 0,92; 1,05 mg/kg, réz: 0,302; 0,271; 0,360; 0,361; 0,347; 0,350 mg/kg, mangán: 0,093; 0,080; 0,067; 0,084; 0,094; 0,088 mg/kg.

A tej hamutartalma a laktáció 1. hónapjától (0,747%) a 2. hónapig csökken (0,743%), majd fokozatosan emelkedik a laktáció végéig (0,769%). A Jap teje tartalmazza a több (1372 mg/kg), a HFap-é pedig a kevesebb (1242 mg/kg) káliumot; a HFap teje a több (518 mg/kg), a Jap-é pedig a kevesebb (504 mg/kg) nátriumot.

A tej nátriumtartalma (500–550 mg/kg) a laktáció 2–3. hónapjáig csökken, majd fokozatosan emelkedik a laktáció végéig. A Jap tejének mind kalcium- (1272 mg/kg) mind foszfortartalma (1026 mg/kg) nagyobb mint a HFap-é (1197, illetve 961 mg/kg). A laktáció 4–6. hónapjáig csökken a tej kalciumtartalma, majd a továbbiakban a laktáció végéig emelkedik. A tej foszfortartalma a laktáció 4. hónapjáig csökken, majd a 6. hónaptól fokozatosan emelkedik a laktáció végéig. A Jap tejének nagyobb (144 mg/kg) a magnéziumtartalma mint a HFap-é. A Jap teje tartalmazza a több (4,85 mg/kg), a HFap-é pedig a kevesebb (4,34 mg/kg) cinket, a tej vastartalma viszont mindkét fajtánál azonosan 1,05 mg/kg. A Jap tejének réztartalma (0,350 mg/kg) némileg kisebb, mangántartalma viszont némileg nagyobb (0,088 mg/kg) mint a HFap-é (0,361 és 0,084 mg/kg).

A HFap, a HFB és a Jap teje makro- és mikroelem-tartalmát hasonlítva a Mt, a MtxHf és Hf fajtához megállapítható, hogy a Hf és a HFap tejének értékei a legtöbb esetben jó egyezést mutattak. A HFB és a Jap teje – nagyobb szárazanyag- és hamutartalmának köszönhetően – makro- és mikroelem-tartalmát tekintve igen hasonló a Mt-hoz, és több esetben gazdagabb e tekintetben mint a Hf-é és a MtxHf-é.

A tej makro- és mikroelem-tartalmának változását vizsgálva a laktáció folyamán megállapítottuk, hogy a tej hamu-, nátrium-, vas- és mangántartalma a laktáció 2–3. hónapjában éri el minimumát, majd a továbbiakban nő a laktáció folyamán. A tej kalcium-, foszfor- és réztartalma a laktáció 5–7. hónapjában éri el legkisebb értékét, a tej kálium- és cinktartalma pedig folyamatosan csökken a laktáció folyamán. A tej nátrium-, cink-, vas- és mangántartalmának változását egyenes, hamu-, kálium-, kalcium-, foszfor-, magnézium- és réztartalmának változását pedig másodfokú polinommal tudtuk leírni. A Hf és a Jap teje makro- és mikroelem-tartalmát vizsgálva megállapítottuk, hogy a Jap fajták teje több hamut, káliumot, nátriumot, kalciumot, foszfort, magnéziumot, cinket és mangánt, és kevesebb vasat és rezet tartalmaz mint a HFap-é. A különbségek azonban csak a hamu esetében szignifikánsak.

3.2.2. A juh kolosztrumának és tejének összetétele

3.2.2.1. A juh kolosztrumának összetétele

3.2.2.1.1. A kolosztrum szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói

A magyar fésűsmerinó, az awassi, a langhe, a szarda, a cigája, a cikta, a fekete racka, a fehér racka, a karakül, a kent és a vadjuh elsőfejésű kolosztrumának és a laktáció 20–40. napja közt fejt tejének szárazanyag- és fehérjetartalmát, valamint fehérjefrakcióit vizsgáltuk.

A magyar fésűsmerinó kolosztrum összetételét elemezve megállapítottuk, hogy az összes vizsgált alkotórész rohamosan csökken az ellés utáni 2–3. napig, az 5. nap után a savófehérje és a valódi savófehérje kivételével az összes többi alkotórész állandó szintre áll be, míg e két komponens csak az ellés utáni 20. nap után éri el a normális juhtej szintjét. A fehérjefrakciók megoszlását vizsgálva az összesfehérje százalékában, valamint a valódi savófehérje és az NPN megoszlását vizsgálva a savófehérje százalékában megállapítottuk, hogy a savófehérje és a valódi savófehérje aránya lényegesen csökken, a kazein és az NPN aránya nő, a valódi fehérje aránya pedig alig változik a laktáció első hónapjában. A savófehérjén belül a valódi savófehérje aránya erőteljesen csökken, az NPN aránya pedig mintegy ötszörösére nő a laktáció 30. napjáig. A mért eredmények az ellés után azonnal, valamint a laktáció első és ötödik napján az alábbiak voltak: Szárazanyag: 28,01; 22,38; 18,73%, összesfehérje: 18,21; 9,96; 6,37%, valódi fehérje: 17,80; 9,59; 6,11%, savófehérje: 12,53; 6,43; 2,12%, valódi savófehérje: 12,12; 6,06; 1,86%, kazein: 5,68; 3,53; 4,25%, NPNx6,38: 0,41; 0,37; 0,26%.

Egy másik kísérlet sorozatban a különböző fajtájú juhok elsőfejésű kolosztrumának összetételét összehasonlítva megállapítottuk, hogy a fehér és a fekete racka kolosztrumának szárazanyag-tartalma a legnagyobb, a cigája, a cikta és a szarda kolosztrumának szárazanyag-tartalma a legkisebb, míg a többi fajta közbülső értéket foglal el a felsorolt genotípusok között. (A karakült, a kentet és a vadjuhot az értékelésből a kis vizsgált egyedszám miatt kihagytuk.) A mért értékek a következők voltak: Magyar fésűsmerinó: szárazanyag: 34,80%; összes fehérje: 19,47%; valódi fehérje: 19,00%; savófehérje: 13,25%; valódi savófehérje: 12,76%; kazein: 6,31%; NPNx6,38: 0,475%; hamu: 1,060%. Awassi: 34,79; 16,79; 16,41; 10,08; 9,71; 6,71; 0,373; 0,984%. Langhe: 33,73; 18,63; 17,72; 10,25; 9,77; 8,38; 0,475; 1,134%. Szarda: 32,91; 18,15; 17,67; 11,40; 10,92; 6,75; 0,476; 1,042%. Cigája:

30,93; 15,03; 14,45; 9,95; 9,37; 5,08; 0,576; 0,936%. Cikta: 30,46; 15,30; 14,88; 8,86; 8,44; 6,44; 0,416; 1,072%. Fekete racka: 41,91; 21,10; 20,47; 14,98; 14,35; 6,12; 0,632; 1,121%. Fehér racka: 35,80; 19,62; 19,05; 12,08; 11,53; 7,52; 0,552; 1,108%. Karakül: 35,56; 19,55; 18,99; 10,56; 10,05; 8,94; 0,512; 1,160%. Kent: 38,05; 23,90; 23,18; 17,60; 16,88; 6,30; 0,720; 1,131%. Vadjuh: 33,57; 18,90; 18,40; 10,32; 9,82; 8,58; 0,504; 1,118%.

A kolosztrum összesfehérje-, valódifehérje-, savófehérje- és valódi savófehérje-tartalma a fekete és a fehér rackánál és a magyar fésűsmerinónál a legnagyobb, a cigájánál, a ciklánál és az awassinál a legkisebb, a langhe és a szarda pedig közbülső értéket foglal el a felsorolt genotípusok között. A kolosztrum kazeintartalma a langhe-nál és a fehér rackánál a legnagyobb, a többi genotípus kolosztrumának kazeintartalma pedig csaknem azonos. A kolosztrum NPN-tartalmában a legnagyobb értéket a fehér rackánál és a cigájánál, a legkisebbet pedig az awassinál és a ciklánál mértük.

3.2.2.1.2. A kolosztrum és a kolosztrumfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke

A magyar fésűsmerinó kolosztruma és teje aminosav-tartalmának, valamint a kolosztrum- és a tejfehérje aminosav-összetételének alakulását az ellés után eltelt idő függvényében vizsgálva megállapítható, hogy a juh kolosztruma mintegy háromszor annyi aminosavat tartalmaz mint az ellés utáni 2-5. napon fejt átmeneti tej vagy a laktáció 30. napján fejt tej. A csökkenés nyilvánvaló, hisz a kolosztrum aminosav-tartalma párhuzamosan változik a kolosztrum összesfehérje-tartalmával.

A juhtej fehérje aminosav-összetételének változását vizsgálva az ellés után eltelt idő függvényében megállapítható, hogy az aminosavak közül az Asp, a Thr, a Ser, a Gly, az Ala, a Cys és a Val csökken, a Glu, a Pro, a Met, az Ile, a Leu és a Lys nő, a Tyr, a Phe, az Arg és a Trp pedig nem mutat lényeges változást a kolosztrum-periódus alatt. A kolosztrumfehérje esszenciális és nemesszenciális aminosavait vizsgálva kitűnik, hogy az esszenciális aminosavak egyrésze csökken (legszembe-tűnőbb a csökkenés a treonin, a valin és a cistin esetében), a nemesszenciális aminosavak közül pedig az aminosavak több mint egyharmadát kitevő glutaminsav és prolin mennyisége nő a kolosztrum- illetve a tejfehérjében az ellés után eltelt idő függvényében. Az esszenciális aminosavak egy része csökkenésének, valamint

a glutaminsav és a prolin növekedésének megfelelően az ellés után közvetlenül fejt kolosztrum fehérjéjének a biológiai értéke a legnagyobb (108,5). A biológiai érték 48 óra alatt 101,2-re, öt nap alatt pedig 78,74-re csökken, és úgy tűnik, hogy ez az érték a laktáció első hónapja végéig már nem változik.

3.2.2.1.3. A kolosztrum makro- és mikroelem-tartalma

A magyar fésűsmerinó kolosztruma és teje hamu-, valamint makro- és mikroelem-tartalmának alakulása az ellés után eltelt idő függvényében a következő. Az első adat a közvetlenül ellés után fejt, a második a második napon fejt kolosztrum-ra, a harmadik az ötödik napon fejt átmeneti tejre, a negyedik pedig 30. napon fejt tejre vonatkozik. Hamu: 1,028; 0,957; 0,959; 0,954%, kálium: 1481; 1352; 1341; 1329 mg/kg, nátrium: 949; 699; 670; 518 mg/kg, kalcium: 2437; 1977; 1889; 1892 mg/kg, foszfor: 1829; 1538; 1482; 1353 mg/kg, magnézium: 235; 163; 148; 151 mg/kg, cink: 26,5; 12,2; 7,9; 5,8 mg/kg, vas: 2,86; 1,92; 1,23; 1,19 mg/kg, réz: 1,385; 1,070; 0,838; 0,642 mg/kg, mangán: 0,302; 0,167; 0,143; 0,112 mg/kg. Megállapítható, hogy a kolosztrum hamu- és káliumtartalma csak minimálisan változik, nátriumtartalma felére, kalcium-, foszfor- és magnéziumtartalma pedig mintegy kétharmadára csökken a laktáció 30. napjáig. A mikroelemeket vizsgálva megállapítottuk, hogy a kolosztrum periódusban ötödére csökken a cinktartalom, felére a réz-, felére-egyharmadára a vas- és egyharmadára a mangántartalom. A langhe, a fekete és a fehér racka kolosztrumának hamutartalma a legnagyobb, az awassié és a cigájáé pedig a legkisebb. (A karakül, a kent és a vadjuh adatait az értékelésből a kis egyedszám miatt kihagytuk.)

3.2.2.1.4. Ikreket ellett juhok kolosztrumának összetétele

A 11 egyet és a hét ikreket ellett magyar fésűsmerinó kolosztrumának összetétele az alábbiak szerint alakult közvetlenül az ellés után: Szárazanyag: egyet ellett: 26,51%, ikreket ellett: 30,28%, összesfehérje: 16,98; 20,14%, valódi fehérje: 16,58; 19,71%, savófehérje: 11,08; 14,81%, valódi savófehérje: 10,68; 14,38%, kazein: 5,89; 5,63%, NPNx6,38: 0,401; 0,432%. Az ikreket ellett juhok kolosztruma közvetlenül az ellés után 3,8%-kal több szárazanyagot, 3,2%-kal több összesfehérjét és valódi fehérjét, 3,7%-kal több savófehérjét és valódi savófehérjét, 0,06%-kal több NPNx6,38-at és 0,26%-kal kevesebb kazeint tartalmaz, mint az egyet ellettek. A különbségek a kazein és NPN-tartalom kivételével szignifikánsak. Az

ellés után 24 és 48 óra múlva az egyet, illetve ikreket ellett anyaállatok koloszt-ruma már azonos összetételű volt. Az elsőfejű juhkoloszttrum $19,7 \text{ mg/cm}^3$ -rel szignifikánsan több immunglobulin-G-t tartalmaz az ikreket elletteknél az egyet ellettekhez viszonyítva.

Egy másik kísérletben 22 egyet és 24 ikreket ellett magyar fésűsmerinó elsőfe-jű koloszttrumát elemezve megállapítottuk, hogy az ikreket ellett anyák elsőfe-jű koloszttruma 3,7%-kal több szárazanyagot, 3,0%-kal több összesfehérjét és va-lódi fehérjét, 3,4%-kal több savófehérjét és valódi savófehérjét tartalmazott, mint az egyet elletteké. A különbségek szignifikánsak. Az ikreket ellettek koloszttruma $22,4 \text{ mg/cm}^3$ -rel több immunglobulin-G-t tartalmazott mint az egyet elletteké. A különbség szignifikáns.

3.2.2.2. A juh tejének összetétele

3.2.2.2.1. A tej szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói

A különböző fajtájú juhok tejének összetételét a laktáció 20–40. napjának átlagá-ban vizsgálva megállapítottuk, hogy a viszonyok lényegesen megváltoztak a ko-looszttrum összetételénél tárgyaltakhoz képest. A kapott mérési adatok az alábbiak: Magyar fésűsmerinó: szárazanyag: 18,79%; összes fehérje: 5,94%; valódi fehérje: 5,70%; savófehérje: 1,32%; valódi savófehérje: 1,08%; kazein: 4,61%; NPNx6,38: 0,241%; hamu: 0,953%. Awassi: 18,61; 4,62; 4,33; 1,06; 0,76; 3,59; 0,292; 0,903%, Langhe: 18,05; 5,71; 5,34; 1,28; 0,96; 4,43; 0,208; 0,968%. Szarda: 16,16; 4,86; 4,61; 1,33; 1,08; 3,53; 0,247; 0,868%. Cigája: 17,60; 5,53; 5,18; 1,54; 1,19; 3,99; 0,349; 0,895%. Cikta: 17,15; 5,21; 4,96; 1,33; 1,07; 3,88; 0,257; 0,918%. Fekete racka: 15,75; 5,52; 5,22; 1,23; 0,93; 4,29; 0,300; 0,885%. Fehér racka: 16,71; 5,92; 5,67; 1,30; 1,05; 4,63; 0,247; 0,901%. Karakül: 21,60; 5,57; 5,30; 1,46; 1,18; 4,11; 0,278; 0,913%. Kent: 18,00; 5,15; 4,82; 1,14; 0,81; 4,01; 0,330; 0,951%.

A tej szárazanyag-tartalma a merinónál és az awassinál a legnagyobb, a szar-dánál és a fekete, valamint fehér rackánál a legkisebb. A merinó, a fekete racka és a langhe tejének a legnagyobb, az awassi és a szarda tejének pedig a legkisebb az összes- és valódifehérje-tartalma. A merinó és a cigája tejének a legnagyobb a sa-vófehérje- és a valódi savófehérje-tartalma. A nagyobb kazeintartalmat a merinó, a langhe és a fekete és a fehér racka, a kisebbet pedig a cigája, a cikta, a szarda és az awassi tejében mértük. Legnagyobb a fekete racka és a cigája tejének NPN-tar-talma.

A magyar fésűsmerinó, az awassi, a langhe, a fekete és fehér rackánál a kazein aránya az összes fehérjén belül 77,6–78,2% között, a savófehérje aránya pedig 21,8–22,4% között változik. A szarda, a cigája és a cikta teje az összesfehérjén be-lül lényegesen kevesebb kazeint (72,2–74,5%) és több savófehérjét (25,5–27,8%) tartalmaz.

3.2.2.2.2. A tej és a tejfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke

A laktáció 30. napján fejt juhteje aminosav-tartalmát, és a juhteje fehérje amini-sav-összetételét elemezve megállapítható, hogy a gyermek esszenciális-amino-sav-szükségletét juhtejjel teljes mértékben ki lehet elégíteni.

A juhteje fehérje aminosav-összetételét a kecskééhez és a szarvasmarháéhoz hasonlítva megállapítottuk, hogy a juhteje fehérje Asp-, Glu-, Gly-, Ala-, Cys-, Tyr-, Phe-, Lys-, Arg- és Trp-tartalma nagyobb mind a kecske, mind a szarvas-marháénál. A juhteje fehérje több Thr-t, Pro-t, Met-t és His-t tartalmaz, mint a tehéné, de kevesebbet mint a kecskéé. A juhteje fehérje tartalmazza a legkevesebb Ser-t, Val-t és Ile-t, Leu-tartalma viszont nagyobb mint a kecskéé, de kisebb mint a szarvasmarháé. A felsorolt különbségek esetenként statisztikailag bizonyíthatók.

Összehasonlítva a kecsketej-, a juhtej- és a tehéntej fehérje biológiai értékét megállapítottuk, hogy a három állatfaj közül a kecske tejfehérjéjének biológiai értéke a legnagyobb, a tehéntejé a legkisebb, a juhtej pedig a tehéntejhez közel eső közbülső értéket mutat. A biológiai értékben tapasztalt különbségeket magyaráz-za egyfelől az, hogy a kecsketej jóval nagyobb arányban tartalmaz savófehérjét, mint a juh- és a tehéntej, másrészt a kecsketej fehérjéje több treonint tartalmaz.

3.2.2.2.3. A tej makro- és mikroelem-tartalma

A juhtej hamutartalma a langhe-nél és a merinónál a legnagyobb, a szardánál, a cigájánál és a fekete rackánál pedig a legkisebb. A laktáció 20–40. napja közt fejt tejminták átlagos káliumtartalma 1329 mg/kg , nátriumtartalma 518 mg/kg , kal-ciumtartalma 1892 mg/kg , foszfortartalma 1353 mg/kg , magnéziumtartalma 151 mg/kg , cinktartalma $5,8 \text{ mg/kg}$, vastartalma $1,19 \text{ mg/kg}$, a réztartalma $0,642 \text{ mg/kg}$, mangántartalma pedig $0,112 \text{ mg/kg}$ volt.

Összehasonlítva a laktáció első hónapjának végén fejt juhtej, kecsketej és te-héntej makro- és mikroelem-tartalmát megállapítottuk, hogy a három faj tejének kálium-, nátrium-, magnézium- és mangántartalma nem különbözik szignifikán-

san egymástól. A juhtej hamu-, valamint kalcium- és foszfortartalma szignifikánsan nagyobb mind a kecske-, mind a tehéntejénél. A juhtej cinktartalma szignifikánsan nagyobb, vastartalma pedig szignifikánsan kisebb, mint a kecsketejé. A juh teje réztartalma szignifikánsan nagyobb mint a tehéntejé.

3.2.2.4. Eltérő genotípusú juhok kolosztrumának és tejének összetétele

Vizsgáltuk 104 magyar fésűs merinó (MFM), 20 awassi, 14 langhe, 22 szarda, 16 cigája, 11 cikta, 12 fekete racka, 8 fehér racka, 4 karakül, 3 kent és 1 vad-juh kolosztrumának, átmeneti tejének és tejének szárazanyag-, összesfehérje-, valódifehérje-, savófehérje, valódi savófehérje-, immunglobulin-G-, kazein- és NPN-tartalmát, hamu- és mikro-, ill. makroelem-tartalmát, aminosav-tartalmát, valamint a fehérje aminosav-összetételét és biológiai értékét a laktáció 40. napjáig. A fajták között különbségeket és azonosságokat állapítottunk meg, valamint hasonlítottuk a juhtej összetételét a kecskééhez és a tehénéhez. Azt találtuk, hogy az ikreket ellett juhok elsőfejű kolosztruma szignifikánsan több szárazanyagot, összesfehérjét, savófehérjét, valódi fehérjét, valódi savófehérjét és IgG-t tartalmaz mint az egyet ellettek. Az ikreket ellett anyák kolosztrumának biológiai értéke is nagyobb az egyet ellettekénél. A kazein- és az NPN-, valamint a makro- és mikroelem-tartalomban nem találtunk szignifikáns különbséget. A felsorolt eltérések csak az elsőfejű kolosztrumban mutathatók ki, ugyanis az ikreket és egyet ellett juhok kolosztrumának összetétele 24, illetve 48 órával az ellés után – minden általunk vizsgált tulajdonság tekintetében – azonos volt. Vizsgálataink szerint a magyar fésűsmerinó, az awassi, a langhe, a fekete és a fehér racka tejfehérjét nagyobb arányban alkotja a kazein és kisebb arányban a savófehérje, mint a szardáét, a cigájáét és a ciktaét. Ennek megfelelően ezen előbbi fajták teje alkalmasabb a sajtkészítésre, az utóbbiaké pedig – a nagyobb biológiai értékű savófehérje arány miatt – folyékony tejtermékként történő feldolgozásra. Méréseink szerint a juhtej fehérje biológiai értéke gyakorlatilag megegyezik a tehéntejével, és mindkettő kisebb a kecsketejénél.

3.2.3. A kecske kolosztrumának és tejének összetétele

3.2.3.1. A kecske kolosztrumának összetétele

A nemesített magyar fehér, a szánentáli, az alpesi és a parlagi kecske kolosztrumának szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint a különböző fehérjefrakciók

rohamosan csökkennek az ellés utáni 2–3. napig, majd az 5. nap után a szárazanyag-tartalom és a fehérjefrakciók – az összesfehérje és a kazein kivételével – állandó, a normális kecsketejre jellemző szintre állnak be, míg e két komponens csak a 7–30. nap között éri el a normális tejre jellemző szintet.

Az elsőfejű kolosztrum szárazanyag-tartalmát 28,73%-nak, összesfehérje-tartalmát 16,62%-nak, valódifehérje-tartalmát 16,23%-nak, savófehérje-tartalmát 11,81%-nak, valódi savófehérje-tartalmát 10,43%-nak, kazeintartalmát 5,80%-nak, NPN x 6,38-tartalmát pedig 0,383%-nak mértük. Ezek az értékek az ellés utáni 24. órában és az 5. napon a következőképpen alakultak: szárazanyag: 20,10; 13,34%, összesfehérje-tartalom: 7,59; 4,04%, valódifehérje-tartalom: 7,37; 3,89%, savófehérje-tartalom: 3,19; 1,05%, valódi savófehérje-tartalom: 2,98; 0,90%, kazeintartalom: 4,40; 2,99%, NPN x 6,38-tartalom: 0,215; 0,181%.

A fehérjefrakciók megoszlását vizsgálva az összesfehérje százalékában megállapítható, hogy a kolosztrum valódifehérje aránya a laktáció 7. napjáig folyamatosan csökken, és csak ezután éri el a kecsketejre jellemző 94–95% körüli szintet. Ennek megfelelően az NPN aránya a kecsketejben fokozatosan emelkedik, és csak a 7. nap után éri el a kecsketejre jellemző 5–6%-os arányt. A savófehérje és a valódi savófehérje aránya az ellés után közvetlenül mért 63–65%-ról 24 óra alatt 39–42%-ra csökken, és az ellés utáni 48. órában már csak 27,5–30,5%-ot ér el. A csökkenés tovább folytatódik, és az arány az 5. napon már eléri a normális tejre jellemző 23–29%-os szintet. A kolosztrum kazein aránya az ellés után közvetlenül mért 34,90%-ról rohamosan nő, és már az 5. napon eléri a normális tejre jellemző 70–74% körüli szintet.

3.2.3.1.1. A kolosztrum és a kolosztrumfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke

A kecske elsőfejű kolosztruma mintegy háromszor annyi aminosavat tartalmaz, mint az ellés utáni 2–5. napon fejt átmeneti tej, és ötször-hatszor annyit, mint a laktáció 7. napjától fejt normális tej. A kolosztrum- és a tejfehérje aminosav-összetételét vizsgálva az idő függvényében megállapítható, hogy az esszenciális aminosavak nagyobb része csökken (Thr, Val, Cys) vagy változatlan marad (Leu, Lys, Tyr, Phe), a nemesszenciális aminosavak közül pedig az összes aminosav csaknem egyharmadát kitevő Glu és Pro nő a tejfehérjében az ellés után eltelt idő függvényében.

A kecsketej fehérje aminosav-összetétel alapján számolt biológiai értéke az ellés után a legnagyobb (127,44), majd a továbbiakban folyamatosan csökken, és csak a 7. nap után éri el a normális kecsketejre jellemző 95–100 körüli értéket.

3.2.3.1.2. A kolosztrum makro- és mikroelem-tartalma

A kolosztrum, az átmeneti tej és a tej hamutartalma, valamint makro- és mikroelemei közvetlenül az ellés után, az ellés utáni 24. órában és az 5. napon a következőképpen alakultak: hamu: 1,172; 0,967; 0,839%, kálium: 1514; 1516; 1447 mg/kg, nátrium: 601; 485; 381 mg/kg, kalcium: 2303; 1933; 1498 mg/kg, foszfor: 2095; 1576; 1162 mg/kg, magnézium: 294; 167; 124 mg/kg, cink: 21,78; 8,88; 6,12 mg/kg, vas: 2,20; 2,06; 1,79 mg/kg, réz: 0,734; 0,755; 0,555 mg/kg, mangán: 0,119; 0,095; 0,073 mg/kg. A kálium kivételével a hamu és a makro- és mikroelemek logaritmikusan csökkennek az ellés után eltelt idő függvényében.

A makro- és mikroelemeket egyenként vizsgálva megállapítottuk, hogy a legnagyobb változás a cink- és magnéziumtartalomban figyelhető meg a vizsgált periódusban. Mintegy felére csökken a foszfortartalom, 60–65%-ára a kalcium- és a mangántartalom, 70–75%-ára pedig a hamu-, a nátrium-, a vas- és a réztartalom. Gyakorlatilag nem változik a kolosztrumperiódus alatt a kálium mennyisége.

3.2.3.1.3. Ikreket ellett kecskék kolosztrumának összetétele

Az ikreket ellett kecskék kolosztruma közvetlenül az ellés után mintegy 5,9%-kal több szárazanyagot, 3,4%-kal több összesfehérjét, 3,7%-kal több savófehérjét és valódi savófehérjét, fél százalékkal több kazeint és 0,06%-kal több számított fehérjét (NPNx6,38) tartalmaz mint az egyet elletteké. A mérési eredmények az alábbiak, ahol az első az egyet, a második a kettőt ellett kecskék értékeit mutatja: szárazanyag: 26,38; 32,25, összesfehérje: 15,28; 18,65, valódi fehérje: 14,92; 18,20, savófehérje: 9,01; 12,68, valódi savófehérje: 8,58; 12,26, kazein: 5,61; 6,08, NPNx6,38: 0,358; 0,420%. A különbségek a szárazanyag és az összesfehérje, a valódi fehérje, a savófehérje és a valódi savófehérje esetében szignifikánsak. A kazein- és a számított fehérje- (NPNx6,38) tartalomban a két csoport között szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. Ezek a különbségek 24, illetve 48 órával az ellés után megszűnnek.

Az elsőfejű kolosztrum 20,2 mg/cm³-rel több immunglobulin-G-t tartalmaz az ikreket ellett anyakecskéknél az egyet ellettekhez viszonyítva. A különbség

szignifikáns. Az ellés után közvetlenül, de 24 óra múlva is az ikreket ellett kecskék kolosztrum fehérjéjének biológiai értéke nagyobb az egyet ellettekénél. A mért értékek: immunglobulin-G: 112,2; 132,4 mg/ml, biológiai érték: 127,4; 137,8. 48 órával az ellés után a két csoport kolosztrum fehérjéjének biológiai értéke már azonos, és nem találtunk különbséget a kolosztrum makro- és mikroelem-tartalmában sem az egyet és ikreket ellett kecskék között.

3.2.3.2. A kecske tejének összetétele

3.2.3.2.1. A tej szárazanyag- és fehérjetartalma, valamint fehérjefrakciói

A szánentáli, az alpesi és a parlagi kecskék tejének szárazanyag-tartalma a laktáció elején és utolsó harmadában vett minták átlagában 12,27%, a kecsketej összes- és valódifehérje-tartalma ugyanezen időszak alatt 3,29–4,11%, illetve 3,08–3,84%. A két fehérjefrakció növekedése a laktáció végére fajták átlagában eléri a 6,92, illetve 6,59%-ot. A mintavételi hónapok és a fajták átlagában a kecsketej savófehérje-tartalma 0,944%, valódi savófehérje-tartalma pedig 0,721%. A laktáció végére mindkét frakció lényegesen megnő, és fajták átlagában eléri a 3,86, illetve a 3,54%-ot.

A kecsketej kazeintartalma nem különbözik lényegesen a laktáció elején (2,37%) és a laktáció végén (3,05%) fejt tejmintákban, átlagosan 2,55%. A laktáció végére a tej NPNx6,38-tartalma (0,326%) több mint másfélszeresére nő a laktáció elejéhez (0,200%) képest, a mintavételi hónapok és a fajták átlagában 0,271%.

Az összes fehérje százalékában a valódifehérje arány 93,32–93,77%, a három fajta átlagos kazeinszáma pedig 73,03. Az NPNx6,38 aránya az összesfehérje százalékában 6,39%. A vizsgált alkotórészekben – azonos laktációs állapotban – nincs szignifikáns különbség a három fajta között. A tej szárazanyag-, kazein-, valamint NPN-tartalma mérsékelten nő a laktáció folyamán, a tej savófehérje-, valódi savófehérje-, valódifehérje- és összesfehérje-tartalma pedig ugrásszerűen megnövekszik az elapasztás előtti időszakban.

A tej valódi fehérje aránya a szánentáli fajtánál a legnagyobb, a parlaginál a legkisebb, a különbség azonban nem szignifikáns. A savófehérje és a valódi savófehérje aránya az alpesi fajtánál a legnagyobb, a parlaginál a legkisebb, ebből következően a kazein aránya a parlagi fajtánál a legnagyobb, a másik kettőnél pedig gyakorlatilag egybeesik. A parlagi fajtánál a legnagyobb, a szánentálinál pedig a legkisebb az NPN aránya. A savófehérje-tartalmon belül a parlagi fajta

valódi savófehérje aránya a legkisebb, az NPN aránya pedig a legnagyobb, míg a számentálnál a legnagyobb a valódi savófehérje és legkisebb az NPN aránya. A felsorolt különbségek egyetlen esetben sem szignifikánsak.

3.2.3.2.2. A tej és a tejfehérje aminosav-összetétele és biológiai értéke

A parlagi fajta tejfehérjéje több Asp-t, Ser-t és Pro-t, és kevesebb Ile-t, Leu-t és His-t tartalmaz mint a másik két fajtáé. A különbségek szignifikánsak. Az összes többi esetben a különbségek nem szignifikánsak, és nem volt statisztikailag is bizonyítható különbség a számentáli és az alpesi kecskék tejfehérjéjének aminosav-összetételében.

A kecsketej fehérje biológiai értéke a három fajta együttes átlagában a laktáció végén (101,5) mintegy 10%-kal nagyobb, mint a laktáció elején. A három fajta között a tejfehérje biológiai értékének növekedését a laktáció végére az alpesi és a parlagi fajtánál szignifikancia vizsgálatokkal is lehet bizonyítani. A laktáció átlagában a tejfehérje biológiai értéke a számentáli (97,28) és az alpesi (98,24) fajtáknál csaknem egybeesik, és mindkettő mintegy 10%-kal nagyobb a parlagi fajtáénál (88,8). A kecsketej fehérje biológiai értéke lényegesen nagyobb, mint a tehéntej fehérjéé. A biológiai értékben tapasztalt eltérés a kecsketej nagyobb savófehérje arányával és több metionin- és treonintartalmával magyarázható.

3.2.3.2.3. A tej makro- és mikroelem-tartalma

Azonos laktációs stádiumban, illetve mintavételi időpontban nincs szignifikáns különbség a vizsgált kecskefajták között a tej makro- és mikroelem-tartalmában. A laktáció folyamán nő a tej hamu-, nátrium-, kalcium-, foszfor-, magnézium- és mangántartalma; kálium-, cink-, vas- és réztartalma pedig csökken. A kecsketej szignifikánsan több hamut, kalciumot, káliumot, vasat és rezt; szignifikánsan kevesebb cinket tartalmaz, mint a tehéntej; a tej nátrium-, foszfor-, magnézium- és mangántartalmában pedig nincs szignifikáns különbség a két faj között.

A kecsketej hamutartalmát a laktáció első hónapja végén a számentáli fajtánál 0,857, az alpesinél 0,796, a parlaginál pedig 0,825%-nak mértük. Ebben a sorrendben a káliumtartalom 1543, 1592, 1515, a nátriumtartalom 438, 440, 432, a kalciumtartalom 1498, 1433, 1547, a foszfortartalom 954, 981, 964, a magnéziumtartalom 153, 152, 161, a cinktartalom 3,57; 3,67; 3,58, a vastartalom 1,75;

2,02; 2,02, a réztartalom 0,529; 0,591; 0,557, a magántartalom 0,061; 0,067; 0,067 mg/kg volt.

3.2.3.2.4. A kecsketej C-vitamin-tartalma

A három genotípus együttes átlagában a kecsketej szignifikánsan több (24,6 mg/kg) C-vitamint tartalmaz a laktáció elején, mint a laktáció harmadik harmadában (19,6), vagy mint a laktáció végén (15,0). A laktáció elején a kecsketej több mint másfélszer annyi C-vitamint tartalmaz mint a tehéntej. A laktáció későbbi szakaszában a két faj között a különbségek csökkennek, és a laktáció végén már nincs szignifikáns különbség a tehéntej és a kecsketej C-vitamin-tartalmában.

3.2.4. A szarvas kolosztrumának és tejének összetétele

3.2.4.1. A szarvas kolosztrumának összetétele

A szarvas kolosztruma 26,82% szárazanyagot, 14,80% összesfehérjét, 14,28% valódi fehérjét, 8,60% savófehérjét, 8,08% valódi savófehérjét, 6,20% kazeint és 0,52% NPNx6,38-at tartalmazott. A kolosztrum - az összesfehérje-tartalomnak megfelelően - minden aminosavból kb. kétszer annyit tartalmaz mint a tej (Thr 0,67%; Cys 0,12%; Val 0,85%; Met 0,59%; Lys 1,23%; Met + Cys 0,71%). Az esszenciális aminosavak nagyobb részénél (pl. Thr, Cys, Ile) a különbség még szembetűnőbb. A kolosztrum 45%-kal több zsírt (11,8%), 0,14%-kal több hamut (1,28%), és ennek megfelelően makro- és mikroelemekből másfélszer többet tartalmaz (kálium 1893 mg/kg, nátrium 892 mg/kg, kalcium 3144 mg/kg, magnézium 496 mg/kg, foszfor 2326 mg/kg, cink 26,4 mg/kg, vas 8,74 mg/kg, réz 0,67 mg/kg, mangán 0,211 mg/kg), mint a tej. A kolosztrum zsíroldható vitamintartalma másfélszer nagyobb a tejénél, C-vitamin-tartalma pedig annak több mint kétszerese (A-vitamin 0,94 mg/kg, D-vitamin 0,021 mg/kg, E-vitamin 1,93 mg/kg, K-vitamin 0,098 mg/kg, C-vitamin 48,1 mg/kg). A szarvaskolosztrum immunglobulin-G tartalmát – antiszarvasmarha immunglobulin-G-vel – 67 mg/cm³-nek mértük. Az alacsony érték magyarázatául szolgálhat a borjak éjszakai, illetve hajnali születése, és a kb. délelőtt 10 órai mintavétel közötti időszakban bekövetkezett szopás és a megindult tejelválasztás.

3.2.4.2. A szarvas (őz, dámszarvas) tejének összetétele

A szarvas tejt a tehéntejhez hasonlítva megállapítottuk, hogy a szarvastej másfél-kétszer több szárazanyagot és minden fehérjefrakcióból körülbelül kétszer többet tartalmaz mint a tehéntej. Az összesfehérjén belül a fehérjefrakciók aránya közelítőleg megegyezik, és csak az NPN esetében van szignifikáns különbség a szarvastej javára. (Az összeállításban, és a későbbiekben is, az első adat a szarvas, a második az őz, a harmadik pedig a dámszarvas tejére kapott eredményeket tartalmazza. Összesfehérje 7,05; 7,01; 6,90%; valódi fehérje 6,69; 6,42; 6,48%; savófehérje 1,42; 1,43; 1,38%; valódi savófehérje 1,06; 0,84; 0,96%; kazein 5,63; 5,58; 5,52%; nem fehérje nitrogén x 6,38: 0,36; 0,59; 0,42%).

A tej összesfehérje-tartalmának megfelelően a szarvas teje minden aminosavból körülbelül a dupláját tartalmazza mint a szarvasmarháé. A tejfehérje aminosav-összetételét összehasonlítva kitűnt, hogy a tehéntej fehérje kevesebb treonint és lizint tartalmaz mint a szarvasé, és még szembetűnőbb a különbség a metionin esetében, ahol az eltérés megközelíti a 30%-ot. A tejfehérje aminosav-összetételében megállapított különbségek ellenére véleményünk szerint a szarvasborjak tehéntejre alapozott felnevelésénél csak a metionin pótlására kell figyelemmel lenni. (Szarvas/őz/dámszarvas: treonin 0,29; 0,30; 0,26%; szerin 0,40; 0,37; 0,35%; cisztin 0,051; 0,059; 0,054%; valin 0,37; 0,40; 0,32%; metionin 0,23; 0,23; 0,20%; izoleucin 0,29; 0,29; 0,27%; leucin 0,64; 0,64; 0,58%; fenilalanin 0,31; 0,29; 0,26%; lizin 0,57; 0,55; 0,49%; triptofán 0,11; 0,11; 0,10%).

A szarvas teje szignifikánsan több hamut, kalciumot, foszfort, cinket, vasat és mangánt tartalmaz mint a szarvasmarháé, míg a nátrium, a magnézium és a réz esetében nem tudtunk a két faj között szignifikáns különbséget kimutatni. (Szarvas/őz/dámszarvas: hamu 1,14; 1,40; 0,96%; kálium 1546; 1606; 1499 mg/kg; nátrium 454; 903; 432 mg/kg; kalcium 2617; 3513; 1918 mg/kg; foszfor 1774; 2188; 1151 mg/kg; magnézium 155,4; 220,8; 167,9 mg/kg; cink 12,9; 15,7; 10,6 mg/kg; vas 1,78; 4,62; 4,32 mg/kg; réz 0,338; 0,482; 0,499 mg/kg; mangán 0,169; 0,301; 0,168 mg/kg.)

A szarvas teje kétszer annyi zsírt (szarvas/őz/dámszarvas: 7,71; 11,90; 8,35%) tartalmaz mint a szarvasmarháé. A szarvas és a szarvasmarha tejzsírjának zsírsav-összetételét összehasonlítva megállapítottuk, hogy a szarvas tej szignifikánsan több kaprinsavat, mirisztinsavat, sztearinsavat, arachidonsavat és linolénsavat, kevesebb kaprinsavat, palmitinsavat és heptadecénsavat, és szignifikánsan kevesebb

vajsavat, mirisztolajsavat és behénsavat tartalmaz mint a szarvasmarha tejzsírja. Az összes többi vizsgált esetben a két faj tejzsírjának zsírsav-összetételében szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. A felsoroltak közül a leglényegesebb a palmitinsav és a sztearinsav esetén talált különbség, míg az összes többi esetben – legyen bár a különbség szignifikáns – a szarvasborjak tehéntejből készült tejpótlóval történő felnevelésénél különösebb figyelmet nem kell fordítani.

A szarvas és a szarvasmarha tejének A-, D-, E-, K- és C-vitamin-tartalmát összehasonlítva megállapítottuk, hogy a szarvas teje 1,7-szer több A-vitamint, majdnem ötször több D-vitamint, 1,2-szer több K-vitamint és mintegy másfélszer több C-vitamint tartalmaz mint a szarvasmarha teje. A felsorolt különbségek a két faj között szignifikánsak. A felsoroltakkal ellentétben nem találtunk különbséget a szarvas és a tehéntej E-vitamin-tartalmában. (Szarvas/őz/dámszarvas: A-vitamin 0,588; 2,084; 0,531 mg/kg; D-vitamin 0,0139; 0,0354; 0,0122 mg/kg; E-vitamin 1,383; 2,182; 1,271 mg/kg; K-vitamin 0,057; 0,084; 0,058 mg/kg; C-vitamin 11,4; 31,8; 24,8 mg/kg).

3.2.4.3. A szarvastej-pótló előállítása

A szarvasborjak tehéntejre alapozott felnevelésénél feltétlenül figyelmet kell fordítani az aminosav- (metionin, esetleg lizin), az ásványianyag- és a vitamin-kiegészítésre. A figyelmet a makro- és mikroelemek közül elsősorban a kalciumra és a foszforra, illetve a cinkre, a vasra és a mangánra kell fordítani. A vitaminok közül különös figyelmet érdemel a D-vitamin pótlása, hisz ebből a szarvastej majdnem ötször, míg az összes többi vitaminból csak kb. másfélszer tartalmaz többet, mint a tehéntej.

A kereskedelembe kapható tejeredetű alapanyagok összetételét áttanulmányozva rájöttünk arra, hogy azokból még csak közelítő összetételben sem tudjuk előállítani a szarvastejet, ezért kérésünkre a Csornai Tejporgyárban előállították az ún. zsíros laktózzzegény tejfehérje koncentrátumot, mely mintegy 40–43% fehérjét, 40–41% zsírt, 6% tejcukrot és 7,0% ásványi anyagot tartalmazott. Ezen anyag 80%-át 20% zsíros tejjel összekeverve, a keverékből 20% szárazanyag-tartalmú tejet előállítva, makroösszetételét tekintve megkaptuk a szarvastejet. A szarvas- és a tehéntej összehasonlításánál elmondottakat figyelembe véve, valamint tekintettel a tejporgyártás során bekövetkező lizin-károsodásra, 100 kg szarvastej-pótlóhoz 160 g L-lizint, 100 g DL-metionint, 80 g Phylasol Combi vitaminpremixet, és 60

g ásványianyag kiegészítőt keverve előállított szarvastej-pótló mind makro- mind mikro-összetételében igen jó egyezést mutat a szarvastejre kapott analíziseink adataival. A gyakorlati tapasztalatok bizonyítják, hogy a fentiek szerint előállított mesterséges szarvastej-pótló minden tekintetben megfelel a szarvasborjú-nevelés által támasztott követelményeknek.

3.2.5. Az őz és a dámszarvas tejének összetétele

Az előző fejezetekben közölt adatokat összehasonlítva megállapítható, hogy az őz teje – valószínűleg a 11,9% zsírtartalomnak köszönhetően – 4%-kal több szárazanyagot tartalmaz mint a másik két fajé. A három faj között tejük fehérjetartalmában és a fehérjefrakciók mennyiségében és arányában nem volt különbség. Legnagyobb a különbség az NPN-tartalomban, melyből az őz teje tartalmazza a legtöbbet. A három faj tejének és tejfehérjéjének aminosav-összetételében nem találtunk lényeges különbséget. Lényeges a különbség viszont a makro- és mikroelem-tartalomban. Míg a szarvas és a dámszarvas tejének makro- és mikroelem-tartalma a vizsgált elemek többségénél csaknem azonos, addig az őz teje – a kálium- és a réztartalom kivételével – lényegesen több makro- és mikroelemet tartalmazott a másik két fajénál.

A tejszír zsírsav-összetételét hasonlítva egymáshoz megállapítottuk, hogy a 4–16 szénatomszámú tartományban kivétel nélkül az őz tejszíre tartalmazza a legkevesebb, a 18–22 szénatomszámú tartományban pedig a legtöbb zsírsavat. Így az őz tejszíre tartalmazza a legtöbb esszenciális linolsavat, linolénsavat és arachidonsavat. A szarvas és a dámszarvas tejének vitamintartalma igen jó egyezést mutat egymással, a középértékek több esetben csaknem egybeesnek. Az őz teje viszont mind az öt vizsgált vitaminból lényegesen többet tartalmaz, mint a szarvas és a dámszarvasé. Az őz teje A-vitaminból három és félszer, D-vitaminból két és félszer, E-, K- és C-vitaminból pedig másfélszer tartalmaz többet a szarvasénál és a dámszarvasénál.

3.2.6. Kérdő háziállataink kolosztrum és tejösszetétele. (Összefoglalás)

Vizsgáltuk a fajtaátalakító és a kétfajtás váltogató keresztezéssel kapott különböző genotípusú szarvasmarha fajták (magyartarka, holstein-fríz, magyartarka x holstein-fríz F₁, hungarofríz, jersey apaságú, holstein-fríz apaságú), kecskék (nemesített magyar fehér, szánentáli, alpesi, parlagi) és a magyar fésűsmerinó, awassi,

cigája, langhe, fekete és fehér racka, cikta, karakül és a vadjuh kolosztrumának és tejének szárazanyag- és fehérjetartalmát, fehérjefrakcióit, IgG-tartalmát, a kolosztrum és a kolosztrumfehérje valamint a tej és a tejfehérje aminosav-összetételét és az aminosav-összetétel alapján számolt biológiai értéket, hamu- valamint makro- és mikroelem-tartalmát a laktáció folyamán. Vizsgáltuk az összetevők változását az ellés után eltelt idő függvényében; szignifikancia vizsgálattal a fajok és a fajták kolosztrumában fennálló különbségekre és azonosságokra mutattunk rá.

A holstein-fríz és a holstein apaságúak teje arányaiban több savófehérjét és kevesebb kazeint tartalmazott mint a hungarofríz B, a magyar tarka és a jersey apaságúak teje. Ennek megfelelően az előbbi fajták tejfehérje biológiai értéke nagyobb, és tejük alkalmasabb folyadék tejként vagy folyékony tejtermékként történő elfogyasztásra, míg utóbbiaké előnyösebb ipari tejként történő feldolgozásra. A parlagi kecske tejének biológiai értékét nagyobbak, kazeintartalmát kisebbnek találtuk a másik három fajtaénál. A kecsketejben talált nagyobb savófehérje arány miatt a kecsketej fehérje biológiai értéke lényegesen nagyobb mint a tehéntejé. A juhtej fehérje biológiai értékét azonosnak találtuk a tehéntejével. A vizsgált juhajtákat tejük kazeintartalma ill. savófehérje-tartalma alapján a szarvasmarhákéhoz hasonlóan csoportosítani tudtuk. Mindhárom fajnál megállapítottuk, hogy az ikreket ellett anyaállatok elsőfejű kolosztruma szignifikánsan több szárazanyagot, összes fehérjét, savófehérjét és immunglobulin G-t tartalmaz mint az egyet elletteké. Ennek megfelelően az ikreket ellett anyák kolosztrumának biológiai értéke is nagyobb az egyet ellettekénél. A különbségek csak az elsőfejű kolosztrumban mutathatók ki.

Vizsgáltuk állatkertben és természetes körülmények között, kísérleti szarvastelepen élő gímszarvasok kolosztrumának és tejének, valamint az állatkertben tartott őz és dámszarvas tejének összetételét a mesterséges tejpótló előállítását, és a borjak mesterséges felnevelését tűzve ki célul.

3.2.7. A koca kolosztrumának és tejének összetétele, táplálkozásbiológiai értéke

Meghatároztuk 10 dán nagyfehér, 10 dán duroc és 10 norvég lapály sertés kolosztrumának és tejének összetételét. Az első fejű kolosztrum fehérjetartalma (16,65%) kb. 3-szor nagyobb volt mint a laktáció végén (5,83%). A kazein és a nem fehérje nitrogén kivételével az összes fehérje frakció csökkent a laktáció

folymán. Szignifikáns különbségeket találtunk a kolosztrum és a tej szabadaminosav-tartalmában. A kolosztrum kevesebb savas és hidroxil, és több bázikus aminosavat tartalmazott mint a tej. A kolosztrum és tej aminosav-tartalma csökkent a laktáció folyamán. A tejfehérje esszenciálisaminosav-tartalma (treonin, cisztin, valin) csökkent, míg a nem esszenciális glutaminsav és prolin nőtt, ezért a kolosztrumfehérje biológiai értéke 11%-kal magasabb a laktáció első öt napján (118–129) mint a tejfehérjéé a laktáció 10–60. napja között. Az első fejésű kolosztrum 24,03% szárazanyagot és 5,32% zsírt tartalmazott, mely értékek 27,0 és 13,1%-ra nőttek a 48. és a 72. óra között, de ezt követően 18,7 és 6,5%-ra csökkentek a laktáció végéig. A kocatej zsírja csak nagyon alacsony koncentrációban (a kimutathatóság határán) tartalmaz telített 4–12 szénatomszámú zsírsavakat. A kocatej szignifikánsan több telítetlen zsírsavat tartalmazott mint a tehéntej; különösen nagy volt a különbség a linolsav-tartalomban. A kocatej több hamut (0,843%), kalciumot (1965 mg/kg), foszfort (1510 mg/kg), cinket (6,49 mg/kg), vasat (2,44 mg/kg) és rezet (1,34 mg/kg) valamint kevesebb káliumot (748 mg/kg), nátriumot (387 mg/kg) és magnéziumot (111 mg/kg) tartalmazott mint a tehéntej, míg a mangántartalomban nem volt különbség a két faj között. A kálium-, a nátrium-, a vas- és a réztartalom csökkent, a kalcium- és a foszfortartalom nőtt a laktáció folyamán. A kolosztrum A-, D₃-, E-, K₃- és C-vitamin-tartalma 1,5–2-szer nagyobb volt, mint a tejé. A kocatej vitamintartalma 2–3-szor nagyobb volt, mint a tehéntejé. Nem volt szignifikáns különbség a fajták között a laktáció azonos stádiumában vett kolosztrum és tejminták között.

3.2.7.1. Az utódok számának hatása a koca ellés után közvetlenül fejt kolosztrumának összetételére

Meghatározva 25 magyar nagyfehér x holland lapály F₁ fajtájú koca elsőfejésű kolosztrumának szárazanyag-, összesfehérje-, savófehérje-, kazein-, nem fehérje nitrogén-, hamu-, makro- és mikroelem-tartalmát (kálium, nátrium, kalcium, foszfor, magnézium, cink, vas, réz, mangán) megállapítottuk, hogy a legtöbb vizsgált komponens a 10–12 malacszámnál a legnagyobb, és a vizsgált komponensek koncentrációja mind a csökkenő, mind a növekvő malaclétszám esetén csökken.

Az összesfehérje-tartalom az alacsony malaclétszámnál mért 12–14%-ról 10–12 malaclétszámig 18–20%-ra nőtt, majd a továbbiakban 15–18 malaclétszámig 14–16%-ra csökkent. Ugyanezek az értékek a savófehérje esetében 8–12%, 15–

16% és 12–14%, a kazeintartalom viszont az alomlétszámtól gyakorlatilag függetlenül 4–5% körül alakul. Az összesfehérje és a savófehérje esetében igen szoros pozitív kapcsolatot mutattunk ki az 1–12 malacot ellő kocáknál a malacok száma és a fehérjefrakciók között ($r = 0,86$), a 10–17 malacot ellő kocák adatait értékelve viszont r értéke mind a két fehérjefrakció esetében negatív volt, tehát a malacok számának növekedésével a kolosztrum összesfehérje- és savófehérje-tartalma ebben a csoportosításban csökkent. Hasonló összefüggést kaptunk a nem fehérje nitrogén frakció esetében is, míg a kazeintartalom nem változott számottevően az alomlétszám függvényében.

Növekvő alomlétszám esetén a fehérjetartalom, ill. a fehérjefrakciók maximumgörbe szerinti változására magyarázatul szolgálhat az a tény, hogy a placentáris laktogén nagyobb koncentrációja pozitív hatást fejthet ki a tej összetételére, hisz a több placenta elvileg magasabb placentáris laktogén szintet jelent, amelynek hatása a tej komponenseinek szintézisére közismert. A 12-es alomlétszámot követően viszont a nagyobb számú utód méhen belüli növekedése és fejlődése annyira igénybe veszi a koca szervezetét, annak tartalékait, hogy a növekvő placentáris laktogén koncentráció ellenére sem képes elég „energiát” fordítani a tejkomponensek szintézisére, ezért a kolosztrum összetételében, annak beltartalmában csökkenő változások figyelhetők meg. Összegezve tehát a komponensek maximumgörbe szerinti változását a malacok számának függvényében egyrészt a placentáris laktogén hatásának (növekvő szakasz), másrészt az anyai szervezet túlterhelésének (csökkenő szakasz) tulajdonítjuk.

3.2.8. Különböző fajtájú sertések zsírjának zsírsav-összetétele és koleszterintartalma

Meghatároztuk a mangalica, a magyar nagyfehér x magyar lapály és a mangalica x duroc sertésfajták zsírjának zsírsav-összetételét és a zsír koleszterintartalmát. Megállapítottuk, hogy a három fajta között sem a telített, sem a telítetlen, sem az esszenciális zsírsavak tekintetében, sem a koleszterintartalomban nem lehet szignifikáns különbséget kimutatni. Vizsgálataink szerint a három sertésfajta zsírjának koleszterintartalma 71–109 mg/100 g között változik. Felhívtuk a figyelmet a sertészsír magas olajsav- (43,57–44,81 relatív %) és esszenciális linolsav (10,63–11,47 relatív %) -tartalmára.

3.2.9. A kanca kolosztrumának és tejének összetétele

Vizsgáltuk a kanca kolosztrumának és tejének zsírtartalmát, a tejzsír zsírsav-összetételét, vitamintartalmát, fehérjetartalmát és fehérjefrakcióit, aminosav- és szabadaminosav-tartalmát, hamutartalmát, makro- és mikroelemeit a laktáció 45. napjáig. 29 kancától vettünk tejmintákat a laktáció elején naponta, a laktáció 5–45. napja között pedig hetente. A kolosztrum és az átmeneti tejmintákat kézzel fejtük ki oxitocin adagolása nélkül miközben a csikók szoptak. A későbbi tejmintákat a teljesen kifejt tejmirigy elegytejéből vettük.

A kolosztrum és a tej szárazanyag- és zsírtartalma közvetlen az ellés után 24,25–26,28% és 2,85–2,93% között változott, a laktáció 2. és 5. napja között a szárazanyag-tartalom 12,15–12,78%-ra, a zsírtartalom 2,05–2,17%-ra, a 8. és 45. nap között 10,37–10,61%-ra, ill. 1,04–1,32%-ra csökkent. A zsírsavak közül az oktán-, dekan-, dodekán-, mirisztin- és a palmitolajsav nőtt, a sztearin-, olaj-, linol- és a linolénsav csökkent az ellés után. A kancatej-zsírsav-összetétele egészen más volt mint a tehéntejé. A kancatej 9,6-szer több oktánsavat, 3,1-szer több dekánsavat, 2,1-szer több dodekánsavat, 4,4-szer több linolsavat és több, mint százszor több linolénsavat tartalmazott, mint a tehéntej zsírja. A tehéntej tejzsírja sztearinsavból 5-ször többet, mirisztinsavból és palmitinsavból 2-szer annyit tartalmazott, mint a kancatejé.

A zsírsav-összetételben fennálló különbségek alapján egy új módszert dolgoztunk ki a kancatejhez kevert tehéntej kimutatására. A kolosztrum A, D₃, K₃, és C-vitamin-tartalma (0,88, 0,0054, 0,043, 23,8 mg/kg) 1,4–2,6-szor nagyobb volt, mint a normális tejé (0,34, 0,0032, 0,029, 17,2 mg/kg). Nem találtunk szignifikáns különbséget a kolosztrum és a tej E-vitamin-tartalmában (1,342–1,128 mg/kg). A kancatej vitamintartalma nagyon hasonló volt a tehéntejéhez.

A kancatej fehérje-, savófehérje-, kazein- és NPN-tartalma közvetlenül az ellés után 16,41, 13,46, 2,95 és 0,052%, a 2. és az 5. nap között 4,13, 2,11, 2,02 és 0,031% volt. A valódi fehérje és a savófehérje aránya az összes fehérjéhez viszonyítva csökkent, míg a kazein és az NPN aránya nőtt a laktáció 45. napjáig. A kolosztrum és a tej aminosav-tartalma ezen időszak alatt csökkent. A tejfehérje aminosavai közül az esszenciális aminosavak többsége (treonin, valin, cisztin, tirozin, lizin) csökkent, míg a glutaminsav és a prolin mennyisége nőtt az ellés után. Ennek következtében a tejfehérje biológiai értéke közvetlenül az ellés után a legnagyobb (132,3) köszönhetően a nagyon magas treonin- és lizintartalomnak.

Értéke a laktáció 5. napjáig 119,7-re, a 45. napjáig 107,9-re csökkent. A kancatej fehérje esszenciálisaminosav-tartalma és biológiai értéke lényegesen magasabb volt a tehéntej fehérjénél.

A kolosztrum hamutartalma (0,592%) lényegesen nagyobb mint a normál tejé (0,405%). A kalciumtartalom közvetlenül az ellés után volt a legalacsonyabb (747,7 mg/kg), és maximumát az 5. napon érte el (953,7 mg/kg). A cink- és a réz-tartalom az 5. napi maximum után csökkent, a mangántartalom az 5. napig emelkedett majd konstans szinten maradt. A kolosztrum és a tej makro- és mikroelem-tartalma (mg/kg) az alábbi: kálium 928,6 és 517,2, nátrium 320,0 és 166,6, kalcium 747,7 és 822,9, foszfor 741,7 és 498,8, magnézium 139,7 és 65,87, cink 2,95 és 1,99, vas 0,996 és 1,209, réz 0,606 és 0,249 és mangán 0,0447 és 0,0544.

3.2.10. Csirkék genotípusának, ivarának és korának hatása a baromfitakarmány hasznosítható energiájára, valamint a takarmányfelvétel és az etetési módszer hatása a metabolizálható, valamint az endogén energiavesztésre kifejezett kakasokban

3.2.10.1. Csirkék genotípusának, ivarának és korának hatása a baromfitakarmány hasznosítható energiájára

A genotípus, a kor, továbbá az ivar hatását vizsgáltuk a látszólagos metabolizálható energiára (AME), és a nitrogénre korrigált AME-re (AMEn) négy-, ill. nyolchetes korú, két genotípusú (RIR és Cornish vonal) csirkében. Az energia- és a fehérjetartalmat kukorica, ill. halliszt arányának változtatásával beállítva megállapítottuk, hogy az életkor hatása – ha az energiát kukoricával biztosították – nem szignifikáns az AME és az AMEn értékekre a négy-, továbbá nyolchetes állatokban, a halliszt viszont szignifikáns különbségeket mutatott a különböző korú, valamint genotípusú csirkékben. A kukorica társított vizsgálatokban még nagyobb arányban sincs hatással a metabolizálható energiára e két korcsoportban, a halliszt metabolizálható energiatartalma viszont függ az életkortól és a növekedési periódustól. Ezért a LEHP (kis energia – nagy fehérje) takarmányra kapott AME és AMEn értékek 4–8 hét között szignifikánsan nőttek, szignifikáns interakciót mutatva a kor, ill. a takarmány között. A látszólagos metabolizálható energia és a nitrogénre korrigált metabolizálható energia a négyhetes állatok esetében a HELP (nagy energia – kis fehérje) takarmány etetésekor szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nyolchetes állatoké a LEHP takarmány esetében.

3.2.10.2. A takarmányfelvétel és az etetési módszer hatása a metabolizálható, valamint az endogén energiavesztésre kifejtett kakasokban

Különböző takarmányozási szinteken tanulmányoztuk a kukorica AME és TME értékének változását standard körülmények között tartott, kifejtett Rhode Island Red kakasokon. Az első kísérletben 72 órás éheztetést követően eltérő mennyiségű (10 és 100 g között, 10 grammonként növelt adag) kukoricával 6 ismétlésben kényszer-etettük az állatokat. A 48 órás kísérleti szakaszban mértük az ürüléket, majd meghatároztuk energia- és nitrogéntartalmát. A második kísérletben négy nap adaptációt követően a kakasokat 24 órán át éhezttettük, majd négy napos kísérleti szakaszban ad libitum etettük őket. Az ürüléket gyűjtöttük, fagyasztottuk, majd meghatároztuk összetételüket. Ezután újra 24 órás éheztetés következett. A kényszer-etetett állatokkal mért ME érték nagyobb volt, mint az *ad libitum* takarmányozott madaraknál, a kényszer-etetés csökkentette az endogén energiavesztést az *ad libitum* takarmányozáshoz képest, és a takarmányadag növelése fokozta az endogén energia ürítést. Kifejtett Rhode Island Red kakasok esetében mind a kényszer-etetés, mind az *ad libitum* etetés módszerének használata során megközelítően 35–40 g az etethető optimális takarmányadag.

3.2.10.3. A makk (*Quercus branti*), a *Pistacia atlantica* és a *Pistacia khinjuk* kémiai összetételének, metabolizálható energiatartalmának, ill. antinutritív anyagainak meghatározása, valamint a makk hatása a tojótyúk termelésére

3.2.10.3.1. A makk (*Quercus branti*), a *Pistacia atlantica* és a *Pistacia khinjuk* kémiai összetételének meghatározása

A makk, a *Pistacia atlantica* és a *Pistacia khinjuk* kémiai összetételét (száranyag-, fehérje-, zsír-, rost-, keményítő-, ásványianyag-, aminosav- és zsírsav-tartalom) vizsgálva megállapítottuk, hogy a makk nyersfehérje-tartalma rendkívül alacsony, keményítő- és nyersrost-tartalma viszont viszonylag magas. Aminosav-összetétele igen szegényes. A fehérje nagyon kevés kéntartalmú aminosavat (cisztin és metionin) tartalmaz. Zsirtartalmának tekintélyes részét az esszenciális linolsav teszi ki. A vad pisztácia magok nyersfehérje-tartalma rendkívül hasonlít a kukoricához, és egy kissé alacsonyabb a többi gabonafélénél. A pisztácia fehérjeje viszonylag nagy mennyiségű treonint, szerint, valint és lizint tartalmaz, amely igen fontos, ha baromfitakarmányként használjuk fel. A *Pistacia khinjuk* nyers-

zsír-tartalma 39,10%, a *Pistacia atlantica* pedig 26,80%, és mindkettő jelentős mennyiségű esszenciális linolsavat tartalmaz, mely rendkívül hasznos a baromfitakarmányozás során.

3.2.10.3.2. A makk (*Quercus branti*), a *Pistacia atlantica* és a *Pistacia khinjuk* mag, mint új baromfitáp komponens metabolizálható energiatartalmának, ill. antinutritív anyagainak meghatározása

55 db. 17 hetes kakassal végzett kísérlet során meghatároztuk a makk, a *Pistacia atlantica* és a *Pistacia khinjuk* mag látszólagos, ill. valódi metabolizálható energiatartalmát, valamint antinutritív anyagait (tannin, ureáz aktivitás). Mindegyik klímából származó takarmány esetében 5 kakast 5 ismétlésben állítottunk be, melynek során azokat egyéni ketrecekben tartottuk. A különböző takarmányok AME, AMEn, TME és TME_n értékét Sibbald módszerével határoztuk meg. A makk átlagos AMEn-tartalma 14,08, míg a *Pistacia atlantica* 13,51, a *Pistacia khinjuk* pedig 17,33 MJ/kg volt. A makk tannintartalma 4,7%, a *Pistacia atlantica* 1,43%, a *Pistacia khinjuk* pedig 1,93% volt, mely értékek tekintélyesek a baromfitakarmányként történő felhasználás során. Az ureáz aktivitás mértéke minden esetben elhanyagolható.

3.2.10.3.3. A különböző mennyiségű makk (*Quercus branti*) hatása a tojótyúkok termelésére a tojástermelés első szakaszában

A kísérleteket 12 héten keresztül, 160, 24 hetes fehér leghorn tojótyúkkal végeztük. A takarmány a ketrecekben tartott tojótyúkoknál a tojástermelés első fázisában (24–36. hét között) a *Quercus branti* fajtájú makkból 0, 10, 20 ill. 30%-ot tartalmazott. A tojás tömegét, a takarmányfelvételt, az elhullási arányt és a testtömeget a makk részaránya nem befolyásolta szignifikánsan, ezzel szemben a tojástermelési arányra, a tojások számára, tömegére, a takarmányértékesítésre jelentős hatással volt a kísérleti takarmányok fogyasztása. A 30% makk-tartalmú takarmány szignifikánsan csökkentette a tojástermelési arányt, a tojások számát, tömegét és a takarmányértékesítést a tojástermelés első szakaszában (24–36. héten). Vizsgálataink szerint a makkot 20%-os arányig minden káros következmény nélkül alkalmazni lehet tojótyúkok takarmányában.

3.2.11. Módszer és eljárás a baromfi vágóhidakon keletkező toll feldolgozására és antioxidánsként történő alkalmazására

Magyarországon évente 40–50 ezer tonna nedves toll keletkezik baromfi vágóhídi melléktermékként, melynek megnyugtató elhelyezése, ill. hasznosítása nincs megnyugtatóan megoldva. A nagy fehérjetartalmú, gyorsan romló szerves anyag környezetvédelmi gondokat okoz, ezért megsemmisítése vagy felhasználása alapvető gazdasági feladat. Megsemmisítése költséges, a megsemmisítés (elásás) területigénye nagy, és a költségekkel szemben nem áll semmi féle használati termék.

A toll felhasználásánál, pl. állatok takarmányozására, figyelembe kell venni azt, hogy a benne lévő fehérjére, a keratinra jellemző a vízben és az emésztőnedvekben való oldhatatlanság, és hogy ellenáll minden olyan anyaggal szemben, amely nem kémiaiilag támadja meg és roncsolja szét. Fentiekből következik, hogy a tollból készített liszt feltárás nélkül igen csekély takarmányozási értékű, emészthetősége nagyon alacsony, ezért a toll-lisztet gazdasági állataink takarmányozására, magas fehérjetartalma ellenére, nem lehet jó hatásfokkal hasznosítani.

Fentiek miatt eljárást dolgoztunk ki a toll feltárására úgy, hogy a feltárt és feldolgozott anyag alkalmas legyen mezőgazdasági hasznosításra. Vizsgáltuk az általunk alkalmazott technológiával kapott toll-liszt feltártságát, antioxidáns hatását, és a kérődzők bendő-fermentációjában betöltött szerepét. A feltárt toll-liszt antioxidáns hatását kihasználva javaslatot tettünk a készítmény antioxidánsként történő hasznosítására és kérődzők kéntartalmú aminosav-szükségletének kielégítésére.

A tollat 1 mólos nátrium-hidroxid oldattal a forrás kezdetétől számított egy óráan át forraltuk, majd hagytuk kihűlni. A lehűlt anyag, toll-liszt fehérje-hidrolizátum pH-ját 6-ra állítottuk be, 60 °C-on beszárítottuk, majd ledaráltuk.

3.2.11.1. A feltárt toll-liszt antioxidáns hatásának vizsgálata

A toll és a különböző technológiai műveleteken átesett toll-liszt mintegy 5–7% cisztint tartalmaz. Ebből a cisztintartalomtól a feltárási eljárások hatására 0,05–0,20% szabad cisztein, ugyanennyi szabad cisztin, és a levegővel való érintkezés és a magas hőmérséklet hatására mintegy 0,2–0,5% ciszteinsav keletkezik. Elméleti megfontolások alapján következtetni lehet arra, hogy a hidrolizált toll-liszt a benne lévő cisztin-cisztein-ciszteinsav rendszer miatt antioxidáns hatással rendelkezik.

Öt hónapon keresztül vizsgálva 900 g teljes értékű szójadara + 100 g vaj; 800 g teljes értékű szójadara + 100 g vaj + 100 g toll-liszt; és 500 g teljes értékű szójadara + 100 g vaj + 400 g toll-liszt keverékek peroxidszámának és savszámának alakulását megállapítottuk, hogy a toll-lisztet tartalmazó mintáknál a kontrollhoz képest a peroxidszám és a savszám változása minimális, ami egyértelműen bizonyítja a toll-liszt antioxidáns hatását, és azt, hogy ezt az antioxidáns hatást takarmánykeverékekben is képes kifejteni.

3.2.11.2. A toll-liszt hatása az A- és az E-vitamin-tartalom alakulására

A kontroll takarmányban 90 nap alatt az A-vitamin 15%-a, az E-vitaminnak pedig 20%-a, 150 nap alatt az A-vitamin 25%-a, az E-vitaminnak pedig 30%-a elbomlott. Toll-liszt hozzákeverés hatására a 90 nap alatti bomlás mindkét vitaminnál 10% alatt marad, és 150 nap alatt sem éri el, egyik vitaminnál sem, a 15%-ot. Az általunk előállított toll-liszt tehát antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik, ezért részben vagy egészben helyettesíthetője lehet a mesterséges antioxidánsoknak.

3.2.11.3. A hidrolizált toll-liszt alkalmasságának vizsgálata kérődzők takarmányozásában a kéntartalmú aminosavak helyettesítésére

Szarvasmarha etetési kísérletekkel megállapítottuk, hogy a feltárt toll-liszt megfelelő dózisu alkalmazása kedvezően hat a bendő-fermentációra, csökkenti a takarmányfehérjék bendőbeli lebontását, napi fél kg-os adagban növeli a propionsav termelést, és nem változtatja meg lényegesen a takarmányok szárazanyag-, cellulóz- és hemicellulóz-tartalmának lebomlását.

3.2.12. Módszer és eljárás a szója tripszininhibitor tartalmának és ureáz enzim aktivitásának csökkentésére hőkezeléssel kombinált kémiai módszerekkel

A szójatermékek (szójadara, full fat szója) világviszonylatban a legfontosabb fehérjében gazdag takarmány alapanyagoknak számítanak, és a hazai fehérjeszükséglet legnagyobb részét is a szója elégíti ki. A nyers szójabab azonban olyan antinutritív anyagokat is tartalmaz, mint a tripszin-, kimotripszin-gátlók és a lektinek. Az inhibitorok stabil kötést alakítanak ki a hasnyálmirigy enzimekkel, aminek következtében ezek inaktíválódnak, a bélhám sejteiben több kolecisztokinin termelődik, ami a hasnyálmirigyet fokozott enzimtermelésre készíti, a folyamat

végül a hasnyálmirigy megnagyobbodásához, majd gyulladásához vezet. A takarmányfehérjék emészthetősége, táplálóértéke csökken, emiatt a termelés romlik, a fajlagos takarmány-felhasználás nő, így a nyers szójadara állatok takarmányozására csak korlátozottan hasznosítható.

Kísérleteink során új eljárást dolgoztunk ki a szója tripszininhibitor-tartalmának és ureáz enzim aktivitásának csökkentésére hőkezeléssel kombinált kémiai módszerekkel, melynek során a szója tripszininhibitor-tartalma és ureáz enzim aktivitása az eredeti érték 10–20-adára csökken. Meghatároztuk az alkalmazott vegyszerek optimális koncentrációját, a kezelés optimális hőmérsékletét és idejét. Az eljárás az eredeti hőkezelési módszerekhez képest alacsonyabb energia felhasználást eredményez.

A szójababból származó tripszininhibitor termolabilis, érzékeny a magasabb pH-ra és a fehérjekicsapó reagensekre. A tripszininhibitor szerkezetével és tulajdonságaival kapcsolatban az inaktiválás szempontjából legfontosabb, hogy diszulfid hidakat tartalmaz, lúgos környezetben gyorsan hidrolizál, és érzékeny a magas pH-ra. Ezért a tripszininhibitor aktivitás csökkentését háromféle módon kíséreltük meg: a diszulfid hidak szétszakítását oxidációval, a hordozó fehérje hidrolízise lúgos körülmények között, illetve megkíséreltük az oxidációt a lúgos kezeléssel kombinálni. Az oxidáció, hidrogén-peroxiddal végrehajtva, mellékterméket nem eredményez, hisz a keletkezett víz a szárítás folyamán elpárolog. A lúgos kezelésnél használt ammónium-hidroxid a szárítás folyamán részben elillan, részben adszorbeálódva a kezelt szójabab felületén növeli annak nyersfehérje-tartalmát.

Az eljárás optimális paramétereinek összefoglalása: Optimális vegyszer-koncentráció a hidrogén-peroxid és az ammónium-hidroxid 1,5–5,0%-os vizes oldata, az optimális oldatmennyiség a szója szárazanyagának 20%-a. Az optimális hőmérséklet 100 °C, az optimális hőkezelési idő 60–120 perc. Az új eljárás hőkezeléssel kombinált kémiai módszerekkel végzi a szója tripszininhibitor-tartalmának és ureáz enzim aktivitásának csökkentését, így a szója tripszininhibitor-tartalma és ureáz enzim aktivitása az eredeti érték 10–20-adára csökken.

3.2.13. Védett lizin és metionin előállítása hidroxikarbonsavakkal és bentonittal

A nagytejtermelésű szarvasmarhák számára védett metionint és védett lizint állítottunk elő olyan módon, hogy a metionint és a lizint almasavval és citrom-

savval magas hőmérsékleten reagáltattuk, melynek hatására kapcsolat jött létre a karbonsavak és az aminosavak között. Megállapítottuk, hogy a reakció során az aminosavak nem bomlottak el, mert hidrolízissel kötéseikből felszabadíthatóak voltak, viszont a szabad aminosav frakcióban mennyiségük lényegesen csökkent. Hasonló eredményeket tudtunk elérni a duzzasztott bentonittal is, ahol ugyan-csak sikerült védettséget kialakítani a két aminosavra.

3.2.13.1. Reakciók a hidroxikarbonsavak, valamint a metionin és a lizin között

A citromsav és az almasav, valamint a metionin és a lizin keverékéhez annyi desztillált vizet adtunk, hogy egy sűrű szuszpenziót kapjunk, majd a hőkezelést 170 °C-on fél órán keresztül végeztük, melyet követően mértük a szabad lizin és a szabad metionin mennyiségét. A metioninnal végzett kísérlet során, mindkét hidroxikarbonsavnál a metionin 75%-a alakult át valamilyen vegyületté, nem mutatkozott a szabad aminosav frakcióban, 25%-a pedig mindkét karbonsav esetében szabad maradt. A lizin mintegy 60%-a alakult át, és 40%-a maradt a szabad aminosav frakcióban.

A kapott vegyületek hidrolízisét követően mértük a metionin és a lizin koncentrációját, melynek során a sósavas hidrolízis után a kérdéses aminosavakat a kontrollhoz hasonlítva szinte 100%-ban visszakaptuk, ami annyit jelent, hogy az aminosavak nem bomlottak el a karbonsavakkal végzett reakció során, csak átalakultak olyan terméké, ami 6 mólos sósavas hidrolízissel felszabadítható volt kötéseiből.

3.2.13.2. Védett metionin és védett lizin előállítása duzzasztott bentonittal

A bentonitot desztillált vízzel történő szuszpendálással aktiváltuk, hogy az aktív csoportoknak esélyük legyen a kérdéses aminosavak megkötésére. Az egy éjszaka át vízben duzzasztott bentonithoz adtuk hozzá a metionin, illetve a lizin tömény oldatát. A következő kísérletben az aminosavakat annyi desztillált vízben szuszpendáltuk, hogy egy hígán folyó elegyet kapjunk, majd ezt a hígán folyó bentonit-aminosav elegyet egy éjszaka át állni hagytuk, és másnap reggel 100 °C-on, 150 °C-on és 200 °C-on hőkezeltük. A hőkezelés során ügyelnünk kellett arra, hogy annak mérése valójában akkor kezdődjön meg, amikor a vizet a min-

tából teljesen elpárologtattuk, hisz a nedves minta hőmérséklete alig lehet több 100 °C-nál. Lényeges csökkenést a szabadaminosav-tartalomban, mind a lizin-, mind a metionintartalom esetében, csak a 200 °C-os hőkezelésnél kaptunk, ezért a továbbiakban ezen a hőmérsékleten végeztük kísérleteinket.

A desztillált vizes kísérlettel párhuzamosan 0,1 mólos sósavban, illetve 1 mólos sósavban is próbáltuk a bentonit-aminosav keveréket duzzasztani, azonban lényeges változást sósav hatására sem kaptunk, tehát úgy tűnik, hogy savas közegben sem jobb az aminosavak kötődése a bentonithoz, mint semleges pH mellett.

A következő kísérleteink során 160 g bentonithoz 40 g lizin-hidrokloridot és 300 g vizet, majd egy másik kísérletben 160 g bentonithoz 40 g metionint és 300 cm³ vizet adtunk, melynek során mindkét aminosav esetén iszapszerűen folyó keveréket kaptunk. Megvártuk, amíg a víz elpárologott, és ezt követően a maradékot 200 °C-on, egy órán keresztül hőkezeltük.

Ennek során a 16% körüli lizintartalomból 9,73%-ot tudtunk visszamérni, tehát úgy tűnik, hogy a bentonit ilyen kísérleti körülmények között 40% lizint megkötött, 60% azonban továbbra is szabad állapotban maradt a mintában. Metionin esetében a 20% metioninból 4,93 g metionint tudtunk visszamérni, ami azt jelenti, hogy a metionin közel 75%-a a bentonithoz kötődött, és csak 25%-ban maradt szabad állapotban.

A 200 °C-on végzett hőkezelést követően elemezve a minták lizin- és metionintartalmát megállapítottuk, hogy a lizin mennyisége a hőkezelés során gyakorlatilag nem változik, a metionin esetében pedig minimális mennyiségben metionin-szulfont tudtunk a mintából kimutatni.

Tehát amennyiben a bentonitot vízben legalább 8 órán keresztül duzzasztjuk, az megfelelő hőkezelést követően a 20% hozzáadott lizin és a 20% hozzáadott metionin esetében a lizin 40%-át, a metioninnak pedig mintegy 80%-át képes megkötni. Ebből a lizinemennyiségből 25%, a metioninból pedig 65% a bendőfolyadékkal végzett, élő bendőbaktériumokat tartalmazó kezelés után is megmarad bentonithoz kötve. Fisztulás tehennel végezve a kísérleteket, a védettség mintegy 50%-kal csökken, ami elsősorban nem a más fiziológiai körülményeknek, hanem inkább a finom szemcsés, védett, bentonithoz kötött aminosavak bag-ből történő kihullásának köszönhető.

3.3. Az élelmiszertudomány területén elért új tudományos eredmények

3.3.1. Élelmiszerek D-aminosav-tartalma

Az élelmiszerek D-aminosav-tartalmával kapcsolatos vizsgálataink megkezdése előtt az addig megjelent szakirodalmakat áttanulmányozva arra a következtetésre jutottunk, hogy az élelmiszer fehérjékben előforduló D-aminosavak a technológiai beavatkozás következtében jönnek létre, miközben előkészítik az alapanyagokat fogyasztásra. Az emberi szervezetbe jutó D-aminosavak legfontosabb forrásai az élelmiszerek, ugyanis az élelmiszer fehérjék a főzés vagy a különböző élelmiszeripari feldolgozási folyamatok során kisebb-nagyobb mértékű racemizáción esnek át. Az élelmiszer áruházak egyre nagyobb mennyiségben árulnak olyan élelmiszereket (reggelihez használt cereáliák, sült krumpli, folyékony és poralakú gyermek-tápszerek, húshelyettesítők és egyéb kiegészítő szerek), melyek egy része jelentős mennyiségű D-aminosavat tartalmazhat, és ezek a D-aminosavak káros emésztési és egészségügyi sajátságokkal bírnak.

Az élelmiszer-előállítás során a lúgos körülményeket kellene kerülni, ugyanis a lúgos kezelés katalizálja az optikailag aktív aminosavak racemizációját. A racemizáció aránya eltérő ugyan a különböző fehérjéknél, de a fehérjéken belül az egyes aminosavak relatív sorrendje igen hasonló. Elsősorban a közeg pH-ja, a hőkezelés, az alkalikus behatás ideje és az egyes aminosavak szerkezete befolyásolja leginkább a racemizációt. Az alkáliával vagy a hővel történő kezelés során kapott D-aminosavak rontják a minőséget és a kezelt élelmiszer biztonságos felhasználhatóságát. A D-aminosavak jelenléte a fehérjében csökkenti az emészthetőséget és a többi aminosav hozzáférhetőségét. Ez az esszenciális aminosavak L-enantiomerei mennyiségének csökkenését eredményezheti, mivel a peptidkötések a normális úton nem tudnak szétszakadni. Néhány D-aminosav izomer toxikus hatással is rendelkezhet, és módosíthatják a lizinoalanin biológiai hatását is. A másik részről viszont bizonyos D-aminosavak hasznosak is lehetnek (fájdalomcsillapítás), és a csökkent emészthetőségű D-aminosavakat tartalmazó fehérjéket fel lehet használni pl. fogyókúráknál.

3.3.1.1. A mikroorganizmusok hatása a tej D-aminosav-tartalmára

Vizsgálataink célja annak megállapítása volt, hogy egyrészt mi okozza a nyers, kezeletlen tej D-aminosav-tartalmát, illetve, hogy a D-aminosav-tartalomból le-

het-e következtetni a tőgygyulladást előidéző mikroorganizmusok jelenlétére a nyers tejben. Megállapítottuk, hogy bizonyos mikrobafajok, melyek masztitist (tőgygyulladást) okoznak (*Streptococcus disgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacter pyogenes* és *Pseudomonas aeruginosa*), különböző mértékben járulnak hozzá a tej D-aszparaginsav-, D-glutaminsav- és D-alanin-tartalmához. Az eredmények azt mutatták, hogy a D-aminosavak csak részben alkalmasak a tőgygyulladást okozó patogén mikrobafajok azonosítására. A peptidoglikánt alkotó D-aminosavak közül a D-glutaminsav-tartalom az, ami a legalkalmasabb a mikrobák azonosítására, ugyanis a D-aszparaginsav-tartalom alapján csak a masztitisz-negatív tejminták és a *Staphylococcus aureus* által fertőzött tejet lehet megkülönböztetni, illetve azonosítani. A D-alanin-tartalom alapján az általunk vizsgált mikroorganizmusok az *Escherichia coli*, a *Streptococcus aureus* és a *Pseudomonas aeruginosa* kivételével azonosíthatók.

A különböző baktériumok által okozott gyulladásos tőgyből származó tejminták szabadaminosav-tartalma nem különbözik szignifikánsan egymástól annak ellenére, hogy a szabad aminosavak aránya jellemző az adott mikrobafajra. A *Streptococcus uberis* termeli a legkevesebb glicint, az *Escherichia coli*-ra pedig nagyon magas fenilalanin-tartalom a jellemző. A *Pseudomonas aeruginosa* által okozott gyulladásos tőgyből származó tej tartalmazza a legtöbb szabad lizint. Megállapítottuk, hogy a tőgygyulladásra negatív tejminták D-aszparaginsav-tartalma szignifikánsan eltért a vizsgált baktériumfajokkal szennyezett tejétől, amelyek közül egyedül a *Streptococcus aureus* által okozott gyulladásos tőgyből származó tej különbözik szignifikánsan a többitől. A D-glutaminsav-tartalom alkalmas a mikrobák azonosítására, mivel ez az aminosav szignifikánsan különbséget mutat a különböző mikrobák által okozott gyulladásos tőgyből származó tejminták esetében. A D-alanin-tartalom alapján az *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus* és a *Pseudomonas aeruginosa* kivételével a többi baktérium azonosítható.

A gyulladásos tőgyből származó tejminták szabadaminosav-tartalmát a baktériumfajta szignifikánsan nem befolyásolja. Vannak azonban olyan szabad aminosavak, amelyek jellemzőek az adott mikrobafajra. Így például a *Streptococcus uberis* szignifikánsan nagyobb glicintartalmat eredményez a gyulladásos tőgyből származó tejben. Az *Escherichia coli* által okozott masztitisz során a tej fenilalanin-tartalma szignifikánsan különbözik az összes többi baktérium fajtától,

a *Pseudomonas aeruginosa* által okozott masztitisz esetében pedig a lizintartalom szignifikánsan nagyobb, mint az összes többi mikroorganizmusnál.

3.3.1.2. A szabad D-aminosavak szintjét befolyásoló tényezők vizsgálata a cheddar sajt gyártása során

Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy egy adott sajtgyártási folyamatnál mely lépések gyakorolnak hatást a termék D-aminosav-tartalmára, illetve a D-aminosavak összetételének alakulására. A cheddar sajt gyártása során minden olyan technológiai folyamat (nyers tej, formázás, sózás, préselés, érlelés) előtt és után vettünk mintát, melyek befolyásolhatják a D-aminosavak mennyiségét és összetételét. Az adott gyártási folyamatot kétféle törzstenyészet („AM2”, és „303” jelű *Lactococcus lactis subsp. cremoris*) alkalmazásával is megismételtük, hogy ezeknek a D-aminosav-tartalomra gyakorolt hatását is vizsgálni tudjuk.

A sajt préselése során a szárazanyagra vonatkoztatott D-aszparaginsav-tartalom mindkét alkalmazott törzskultúra, a D-glutaminsav-tartalom pedig a „303” jelű törzskultúra használatakor jelentősen nőtt. Ez valószínűleg nem a lízisnek, hanem valamely más folyamatnak tulajdonítható. Az érlelés első kilenc hetében csak a szabad D-alanin-tartalom növekedett jelentősen, a D-aszparaginsav-, és a D-glutaminsav-tartalom esetén nem tudtunk változást kimutatni. Az általunk vizsgált időszakban kilenc hét alatt az érlelés során nem nőtt meg jelentős mértékben azon lízissel összefüggő folyamatok intenzitása, melyek a D-glutaminsav (és a D-aszparaginsav) felszabadulásával járnak a bakteriális sejtfalból és a citoplazmából. Az érlelés során a szabadalanin-tartalmon belül a D-enantiomer aránya nem változott, azaz a D-alanin-tartalom mennyiségének növekedése gyakorlatilag követte az L-alanin mennyiségének növekedését. Lehetséges, hogy a szabad D-alanin-tartalom egy része a sajttésztaiban található szabad L-alaninból jön létre a bakteriális alanin racemáz hatására, amennyiben ez az enzim a baktériumsejten kívül is tud jelentékenyen működni.

A *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 303 egysejtkultúrával gyártott sajtok mind-egyik D-aminosavból jelentősen többet tartalmaztak, és a D-enantiomer aránya is nagyobb hányadot tett ki a teljes (L+D) szabad glutaminsav- és az alanin-tartalmon belül, mint a *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2 szintenyésztéssel gyártott sajtok esetében. Úgy tűnik, hogy a „303” jelű törzs adott gyártási körülmények között hajlamosabb a lízisre, mint az „AM2” jelű törzs, és így sejteiből több

D-aminosav szabadul fel, illetve alakul ki enzimes úton. A vizsgált D-aminosavak egymáshoz viszonyított arányában, a „D-aminosav mintázatban” azonban nem volt különbség a két törzs között.

3.3.1.3. A mikrohullámú hőkezelés hatása a hús vízzoldékony vitamin- és D-aminosav-tartalmára

Húspogácsák B₁-, B₂- és C-vitamin-tartamát, valamint D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-tartalom változását vizsgáltuk a sütési idő függvényében. A normál méretű húspogácsákhoz 50 mg/100 g koncentrációban hozzáadott B₁-vitamin csak minimális mértékben változott 10 perces mikrohullámú kezelés alatt, 20 perces sütési idő hatására viszont 70%-a elbomlott. Úgy tűnik, hogy a B₂-vitamin jobban ellenáll a mikrohullámú kezelésnek, mivel mennyisége 10 perc alatt 50 mg/100 g-ról 43 mg/100 g-ra csökkent, és 20 perces mikrohullámú kezelés után is 35 mg/100 g körüli értékre állt be. A húspogácsák C-vitamin-tartalma a kezdeti 50 mg/100 g koncentrációról a hőkezelés hatására 10 perc alatt 20–22 mg/100 g-ra, 20 perc alatt pedig 13–14 mg/100 g-ra csökkent. A kezeletlen nyers húspogácsa D/L-aszparaginsav aránya 0,048, a D-glutaminsavé pedig 0,027 volt. Tízperces hőkezelést követően ez az arány 0,069-re, 20 perces hőkezelés során 0,151-re nőtt az aszparaginsav esetében, míg a glutaminsavnál ezek az értékek 0,042 és 0,047 voltak.

Kísérleteinkből levonható az a következtetés, hogy a háztartásban alkalmazott mikrohullámú hőkezelés hatására a három általunk vizsgált vízzoldékony vitamin közül a B₁- és a B₂-vitamin alig változott, a C-vitamin-tartalom viszont 20%-kal csökkent még a 2 perces mikrohullámú kezelés hatására is. A 10 perces mikrohullámú kezelés a C-vitamin-tartalom több mint felét tönkre teszi. A D-aminosavak vonatkozásában a 10 perces mikrohullámú kezelés csak némileg növeli meg a D-aminosavak mennyiségét, bár a hosszabb idejű mikrohullámú kezelés jelentős mennyiségű D-aminosav-tartalom növekedéssel járhat.

3.3.1.4. A termikus műveletek hatása a kukorica és a szója D-aminosav-tartalmára

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a kukoricában a legnagyobb mennyiségben előforduló, és egyben a leggyorsabban racemizálódó, aminosavak milyen mértékben alakulnak át a megfelelő D-módosulattá a gyakorlatban is alkalmazott termikus

műveletek során. Az extrudálást Brabender gyártmányú, Do-Corder DC 2001 típusú készülékkel végeztük, és a kezelési hőmérséklet valamint a tartózkodási idő parciális racemizációra gyakorolt hatását elemeztük. A kukoricaszárítás két magyarországi szárítótelepen, Bábolna B1-15 típusú gravitációs anyagmozgatású toronyszárítóval történt.

A 144 °C alatti hőmérsékleten, 28–75 másodperc tartózkodási idejű extrúziós próbák nem jártak szignifikáns ($P < 0,05$) racemizációval. Az aszparaginsavnál szignifikáns racemizáció következett be a 170 °C-os kezelés (2,4%), és a 200 °C-os kezelés (6,1%) hatására. A szerinnél (0,75%) és a glutaminsavnál (0,69%) csak a 200 °C-os kezelésnél volt jelentősen magasabb a D-enantiomerek aránya, mint a kontrollban. A 200 °C-on kezelt minták L-aszparaginsav- és L-lizintartalma szignifikánsan kevesebb volt, mint a kontrollban és az alacsonyabb hőmérsékleten kezelt mintákban. Míg az L-aszparaginsav-veszteség elsődleges oka a racemizáció volt, az L-lizintartalom-csökkenésben az L-D átalakulás nem játszott jelentős szerepet. A szárítás hatására az ipari körülmények között alkalmazott legmagasabb hőmérsékleteken sem tapasztaltunk jelentős D-aminosavszint növekedést.

A szója extrudálásakor – a kukorica-alapanyagánál tapasztaltakkal szemben – már alacsonyabb hőmérsékleten is jelentős racemizációt tapasztaltunk. 140 °C-on a D-enantiomer aránya 0,87% volt a glutaminsav, 2,81% a szerin és 1,92 % a fenilalanin esetében. 220 °C-os hőkezeléskor a fenti aminosavaknál a D-aminosav-arány 1,43%-ra, 4,61%-ra, illetve 4,68%-ra nőtt. Az L-aminosavak mennyiségében számos esetben csökkenést tapasztaltunk. A kontrollhoz képest a 220 °C-on hőkezelt mintákban 10%-kal kevesebb L-glutaminsav, 17%-kal kevesebb L-szerin, 5%-kal kevesebb L-fenilalanin, 6,6%-kal kevesebb L-aszparaginsav és 21%-kal kevesebb L-lizin volt megtalálható. Az egyes aminosavak vesztesége eltérő mértékben tulajdonítható az L-D átalakulásnak. Míg az L-fenilalanin-szint csökkenést szinte teljes mértékben a racemizáció okozta, az L-lizin-veszteség fő oka, mivel a D-lizin mennyisége nem nőtt meg jelentős mértékben, nem a racemizációban keresendő. Hasonló hőbehatással járó kezeléseket a szójában több D-aminosav-képződéssel jártak, mint a kukoricában, és a parciális racemizáció is nagyobb mértékű volt.

A roppantott szójatermékek túlnyomóságos gőzben főzésekor nem tapasztaltunk jelentős D-enantiomer-tartalom növekedést, és az L-aminosavak szintje sem

csökkent számottevően, miközben a hőkezelés megfelelőségét a tripszininhibitor-aktivitás vizsgálata és az ureáz-teszt is igazolta.

3.3.2. A Székelyföldön előállított tej és tejtermékek összetétele, különös tekintettel a tej alapanyag összcsíraszámára

Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy hogyan alakul a tej szabadaminosav- és szabad D-aminosav-tartalma az összcsíraszám függvényében, és hogy a különböző összcsíraszámú tejek milyen hatással vannak a belőle készült tejtermékek összetételére. Ennek során vizsgáltuk a Sana frissen fogyasztott savanyú tejtermék, a Dália közepesen hosszú ideig érlelt sajt, valamint a Telemea és a tehéntúró rövid ideig érlelt tejtermékek összetételének alakulását a tejalapanyag összcsíraszámának függvényében. Annak eldöntésére, hogy a magas összcsíraszámú tej pasztörözésére alkalmazható-e a mikrohullámú eljárás, vizsgáltuk a különféle pasztörözéssel kapott tej aminosav-összetételét és biológiai értékét, szabadaminosav- és szabad D-aminosav-tartalmát, C- és B-vitamin-tartalmát, valamint hasznosítható lizin-, lizinoalanin- és hidroximetil-furfurol-tartalmát.

3.3.2.1. Az összcsíraszám hatása a tej összes szabad és szabad D-aminosav-tartalmára

Kísérleteink igazolták, hogy az alacsony összcsíraszámú tej is tartalmaz minimális mennyiségben D-aminosavat, elsősorban D-aszparaginsavat, D-glutaminsavat és D-alanint. A csíraszám növekedésével mind az L-, mind a D-aminosavak koncentrációja nőtt, azonban ez a növekedés a kb. 400 ezer csíraszámig csekélynek mondható, és nem történnek lényeges változások a 400 ezer – 1,5 millió tartományban sem, ahol az L- és a D-aminosavak mennyisége minimális változást mutat, bár mindkét aminosav-enantiomer koncentrációja folyamatosan nő az összcsíraszám függvényében. 1,5–2,0 millió közötti tartományban mindkét aminosav-enantiomer koncentrációja fokozatosan nő, majd ezt követően hirtelen mind a szabad aminosavak, mind a szabad D-aminosavak mennyisége nő, és az aminosavakon belül a D-aminosavak részaránya is határozott növekedést mutat. Ez a növekedés rohamosan folytatódik a 2–3 millió csíraszám közötti tartományban, melynek következtében a szabad aszparaginsav mennyisége meghaladja az 1,8, a glutaminsavé a 6,0, az alaniné pedig a 7,2 mg/100 g-ot.

A vizsgált tartományban a D-aszparaginsav részaránya a kontroll tejben mért 11%-ról 22%-ra, a glutaminsavé 5%-ról 25%-ra, az alaniné pedig 12%-ról 33%-ra nőtt. Összességében levonhatjuk tehát azt a következtetést, hogy a csíraszám növekedésével a 100 ezer – 3 millió tartományban mind az L-aminosavak, mind a D-aminosavak mennyisége nő, a növekedés azonban a D-aminosavaknál jelentősebb, amely az összes aminosavon belül a D-aminosavak részarányának növekedését okozza.

3.3.2.2. A tej összcsíraszámának hatása a tejtermékek összetételére

A 220–390 ezer összcsíraszám tartományban hat, az 1,23–2,95 millió összcsíraszám tartományban pedig négy darab Sana analízist végeztünk el. Megállapítottuk, hogy a 220–390 ezer összcsíraszámú tejből készült Sana L-aminosav-tartalma is és D-aminosav-tartalma is némiképp nőtt, arányaiban azonban egyik általunk vizsgált aminosavnál sem tapasztaltunk változást, így a D-enantiomerek aránya szinte változatlan maradt. Ezen csíraszám tartományban végzett vizsgálatainkból leszűrhetjük tehát azt a következtetést, hogy mindhárom általunk vizsgált aminosav (Asp, Glu, Ala) mindkét enantiomere némileg nőtt a csíraszám függvényében, a növekedés azonban mindkét enantiomernél hasonló módon ment végbe, ezért az arányok szinte semmit nem változtak a vizsgált periódusban. Az 1,23–2,95 millió összcsíraszám tartományban mindhárom aminosav esetében nőtt mind a D-, mind az L-enantiomer mennyisége, mely növekedés az 1,5 millió csíraszám után vált jelentőssé, és a közel három milliós összcsíraszámú tejből készült Sana mind az L-, mind a D-aminosavakból a legtöbbet tartalmazta. E termék L-aminosav-tartalma 2–3-szor több, mint az alacsonyabb csíraszámú tejből készült terméké, és ugyanez elmondható a D-aminosavak mennyiségére is, ezért ebben a tartományban sem tapasztaltunk lényeges változást a D- és az L-aminosavak arányát illetően. A D-glutaminsav mintegy 25%-ot, a D-aszparaginsav 32%-ot, a D-alanin pedig mintegy 40%-ot tett ki, az összes aminosavon belül. A két összcsíraszám tartományban végzett kísérleteink eredményeit összegezve tehát elmondható, hogy mintegy 500 ezer csíraszámig nem kell lényeges szabadaminosav-tartalom növekedéssel számolni, a milliós nagyságrendű csíraszám esetében azonban mind az L-, mind a D-aminosavak mennyisége lényegesen nagyobb lehet az alacsonyabb csíraszámú tejből készíttettekhez képest.

A 220–390 ezer összcsíraszám tartományban 6 db, az 1,25–2,91 milliós tartományban pedig 4 db Dália sajt analízisét tudtuk elvégezni. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált csíraszám tartományban az L-aminosavak mennyisége alig mutatott változást, és ugyanez elmondható a három D-aminosav mennyiségére is, ahol csak a 2 millió fölötti csíraszám tartományban kaptunk némileg nagyobb D-alanin-tartalmat a kisebb csíraszámú tejből készült sajtokhoz viszonyítva. Összességében elmondható tehát, hogy a Dália sajt esetében a 220–390 ezer összcsíraszám tartományban a változások egészen minimálisak. A D-aminosavak részarányát vizsgálva a csíraszám függvényében is minimális a változás, hisz a D-glutaminsav részaránya 21,85–24,62% között, a D-aszparaginsavnál 27,11–29,42% között, míg a D-alaninnál 39,43–41,85% között alakult.

A Telemea és a tehéntúró összes szabadaminosav- és szabad D-aminosav-tartalmát vizsgálva – az L-glutaminsav kivételével – minden aminosavnál és minden enantiomernél növekedést kaptunk, de mivel az összcsíraszám tartomány nem volt elég széles, határozott következtetést a csíraszám befolyásolásáról mondani nem tudunk.

A különböző összcsíraszámú tejalapanyagból készült tejtermékek összetétele és összcsíraszám közötti összefüggést vizsgálva megállapítottuk, hogy a friss, illetve a rövid ideig érlelt tejtermékeknél (Sana, Telemea) az összcsíraszám növekedésével mind a D-, mind az L-enantiomerek mennyisége nőtt. Annak ellenére, hogy ez a hatás a mennyiségre jelentős, az enantiomerek arányát az összcsíraszám nem befolyásolta. Azoknál a tejtermékeknél viszont, amelyeket hosszabb ideig érlelnek (Dália), és amelyeknél az alkalmazott színtenyészetek aminosavtermelő-képessége lényegesen meghaladja a tejalapanyagban eredetileg benne lévő mikroorganizmusok által produkált mennyiséget, nem lehet számítani a tejalapanyag hatására, tehát a tejtermékek szabadaminosav- és szabad D-aminosav-tartalma függetlennek látszik a tejalapanyag összetételétől.

3.3.2.3. A magas összcsíraszámú tej összetételének alakulása a különböző hőkezelési eljárások hatására

Összehasonlítva a kíméletesen és a mikrohullámmal pasztörözött tej összetételét egymással és a kiindulási nyerstej összetételével megállapítottuk, hogy mikrohullámú pasztörözés hatására a tejfehérje aminosav-összetétele és az ebből számolt biológiai értéke gyakorlatilag megegyezik az eredeti nyerstejével. A nyerstej összes

szabadaminosav-tartalma mindkét pasztörözési eljárással mintegy 40–45%-ra csökken, ami a pasztörözés során lejátszódó változásokkal magyarázható. Feltételezéseink szerint a szabad aminosavak vagy a Maillard-reakció során használdtak el, illetve a hőkezelés során koagulálódott savófehérjék kötötték meg őket. A két hőkezelési mód között azonban a szabad aminosavak tekintetében nem tudtunk különbséget tenni. Megállapítottuk, hogy a kétfajta pasztörözésnél alkalmazott hőmérséklet és hőntartás nem okozott D-aminosav növekedést, és e tekintetben sem tudtunk a két hőkezelési eljárás között különbséget tenni. A nyerstejhez viszonyítva a B₁-vitamin esetében mindkét hőkezelési eljárásnál mintegy 30–40%-os, a többi B-vitaminnál pedig mintegy 10%-os veszteséget kaptunk. Jelentős veszteséget tapasztaltunk a mikrohullámú pasztörözésnél a C-vitamin esetében, mely a kíméletesen pasztörözött tejben alig változott a nyerstejhez viszonyítva, a mikrohullámmal pasztörözött tejben pedig mintegy harmadára csökkent. Feltételezésünk szerint a pasztörözésnél nem csak a hőmérséklet, hanem a mikrohullám egyéb hatása is szerepet játszhatott a C-vitamin elbomlásában. A tej hidroxil-metil-furfurol-, hasznosítható lizin- és lizino-alanin-tartalmát vizsgálva csak minimális eltérést kaptunk mindkét pasztörözési eljárásnál a nyerstejhez viszonyítva, és a két eljárás között e komponensek tekintetében nem tudtunk különbséget kimutatni.

Összességében megállapítottuk, hogy a mikrohullámú pasztörözés az általunk vizsgált komponensek tekintetében – a C-vitamin kivételével – azonos értékűnek tekinthető a hagyományos, kíméletes pasztörözéssel.

3.3.3. A *Bifidobacterium longum* növekedésének és biokémiai aktivitásának elősegítése tehén-, juh- és kecsketejben, valamint savóporban

Kutatásaink során vizsgáltuk a *Bifidobacterium longum* – a legáltalánosabban használt – bifidobacterium fajta növekedését és biokémiai aktivitását tehén-, juh- és kecsketejben. A vizsgálatokkal párhuzamosan meghatároztuk a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav mennyiségét is, melyből a mikroorganizmusok által termelt fehérje mennyiségére lehet következtetni. A továbbiakban a *Bifidobacterium longum* növekedésének támogatására a juh- és a kecsketejhez, valamint a tejporból készített tehéntejhez savóport kevertünk, vizsgálva annak hatását. Az eredmények azt mutatták, hogy a *Bifidobacterium longum* növekedésének karakterisztikája némileg eltérő a tehén-, a juh- és a kecsketejben, ugyanis a fermentáció 8–12. órájáig

a savtermelés lényegesen gyorsabb, és a növekedés is intenzívebb a kecske- és a juhtejben a tehéntejhez viszonyítva.

Jól ismert tény, hogy a rövid fermentáció lényegesen előnyösebb, mivel csökkenti a szennyeződés kockázatát. Ugyancsak hatással volt a növekedésre és a biokémiai aktivitásra a juh- és a kecsketej esetében a savópor hozzákeverés, azonban hatásosságának eldöntéséhez további vizsgálatok szükségesek. Vizsgálataink további érdekes területe a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav vizsgálata a *Bifidobacterium longum* történő fermentáció során, mivel ezek az aminosavak határozott növekedést mutattak. Érdekes lenne megvizsgálni, hogy a D-aminosav-tartalom növekedése kapcsolatba hozható-e a fermentáció során keletkezett különféle termékek probiotikus aktivitásával.

3.3.4. A Székelyföldön előállított tej és tejtermékek előállítási körülményeinek hatása a zsírsav-összetételre, különös tekintettel a konjugált linolsavra

Vizsgálataink során elemeztük eltérő genotípusú szarvasmarhák tejének zsírsav-összetételét és annak változását az évszakok szerint, szintén vizsgáltuk a savanyított tejtermékek zsírsav-összetételére és konjugált linolsav- (CLA, magyarul KLS) tartalmára, a linolsav-kiegészítés hatását savanyított tejtermékek KLS-tartalmára, hagyományos és mikrohullámú hőkezelés hatását tej és tejtermékek zsírsav-összetételére és KLS-tartalmára, a sajtok tárolása során bekövetkező változásokat a KLS-tartalomra, valamint a Székelyföldön kapható legfontosabb vaj és margarin márkák zsírsav-összetételét és KLS-tartalmát.

3.3.4.1. A tej zsírsav-összetételének és konjugált linolsav-tartalmának változása az évszakok szerint

Meghatározva a fekete-tarka holstein-fríz, a magyartarka és a vörös-tarka holstein-fríz tejének zsírsav-összetételét, és a zsírsavösszetétel-változását márciustól februárig megállapítottuk, hogy a három vizsgált szarvasmarhafajta tejzsírjának zsírsav-összetétele szinte teljes mértékben megegyezik, és az évszakok szerinti tendencia is mindegyik fajtnál ugyanaz. Úgy tűnik, hogy a fajták közötti különbségre nagyobb egyedszámban elvégzett vizsgálatok esetében sem számíthatunk, ha a fajták azonos tartási és takarmányozási feltételek mellett termelnek. Nagyobb ingadozásokat csak a KLS esetében figyeltünk meg, ami talán a takarmány összetételének szezonális változásával függhet össze.

A tejzsír vajsav-tartalma június és szeptember között éri el minimumát 2,6–2,8%-kal, maximumát pedig december és április között mutatja 3,5–3,7%-kal. A vajsavhoz hasonló tendenciát mutat a kapronsav, a kaprilsav és a kaprinsav is; minimumukat július és szeptember között, maximumukat pedig a téli és kora tavaszi hónapokban éri el. A kapronsav minimális értékét – 2,1%-ot – augusztusban, maximális értékét – 2,5–2,6%-ot – pedig január és április között éri el. A kaprilsav minimális értékét 2,1–2,2%-kal augusztusban és szeptemberben, maximális értékét 2,6–2,7%-kal pedig december és április között mutatja. A rövidszénláncú zsírsavak között a kaprinsav található legkisebb koncentrációban az általunk vizsgált szarvasmarhák tejzsírjában. Minimális értéket július és szeptember között éri el 1,1–1,2%-kal, maximumát pedig január és április között mutatja 1,6%-kal.

A tejzsírban legnagyobb koncentrációban a palmitinsav és az olajsav fordul elő. A palmitinsav változásának tendenciája rendkívüli módon hasonlít a rövidszénláncú zsírsavakéhoz; minimumát fajták átlagában június és augusztus között éri el 28,1–28,3%-kal, maximumát pedig a téli és a kora tavaszi hónapokban mutatja 28,7–29,0%-kal.

Az előző tendenciákkal pontosan ellentétesen változnak a telítetlen kötést tartalmazó zsírsavak a tehéntejben az évszak függvényében. A tehéntej zsírjában második legnagyobb koncentrációban előforduló olajsav maximumát július és szeptember között mértük 26,5–26,7%-kal, minimális értékét pedig a téli hónapokban érte el 25,0%-kal. Az évszak szerinti változást illetően a linolsav és a linolénsav az olajsavval egybeeső változást mutat, azaz a két többszörösen telítetlen zsírsav maximumát július és szeptember között éri el. A tej linolsav-tartalma a nyári hónapokban 3,2–3,3%, a téli hónapokban pedig 1,7–1,8%. A linolénsav maximumát augusztusban éri el 1,6%-kal, mely érték a téli és kora tavaszi hónapokban 0,8–0,9%-ra esik vissza.

A KLS-tartalom maximális értékét augusztusban éri el, mely a fajták átlagában 1,35%. Június és szeptember között mindegyik fajta tejzsírjának KLS-tartalma meghaladja az 1,2%-ot, ez az érték az őszi hónapokban rohamosan csökken a téli hónapokban mért 0,75–0,80%-ra.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált telített zsírsavak többsége a nyári hónapokban minimumot, a téli és a kora tavaszi hónapokban, pedig maximális értéket mutat. Ezzel szemben a telítetlen zsírsavak koncentrá-

ciója, beleértve a KLS-t is, a nyári hónapokban maximális értéket mutat, minimumát pedig minden esetben a téli és kora tavaszi hónapokban éri el. A nyáron fejt tej – fajtától függetlenül – lényegesen több linolsavat, linolénsavat, olajsavat és KLS-t tartalmaz, mint a téli és kora tavaszi tej, ezért az egészség megőrzése szempontjából alkalmasabb emberi fogyasztásra. A magasabb KLS-szint a nyári tejben valószínűleg a nyári legelőfű magasabb telítetlenzsírsav-tartalmával, esetleg KLS-tartalmával, és a napfény ultraibolya sugarainak hatásával magyarázható.

3.3.4.2. A savanyú tejtermékek előállításánál használt kultúrák hatása a zsírsav-összetételre és a konjugált linolsavra

A pasztörözött tej és a nyerstej zsírsav-összetétele a mérés hibahatárán belül gyakorlatilag megegyezik, s a legtöbb általunk használt kultúra esetében is megállapítható, hogy a mikroorganizmusok szignifikáns hatást a zsírsav-összetételre nem gyakoroltak. Pár kisebb eltéréstől eltekintve mindegyik minta esetében az adatok gyakorlatilag egybeesnek, és ugyan elképzelhető, hogy nagyobb mintaszámmal elvégezve az analíziseket, némely zsírsav esetében ki tudnánk mutatni szignifikáns különbségeket, ezek a különbségek azonban valószínűleg oly csekélyek lennének, amely a savanyított tejtermékek táplálkozási értékét nem befolyásolnák.

A zsírsavakat egyenként értékelve, megállapítható, hogy a C6:0 és a C15:0 tartományban az összes alkalmazott kultúránál az eredmények gyakorlatilag egybeesnek. A palmitinsav esetében a *Lactobacillus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus lactis subsp. biovar* aroma- és szénsavtermelő kultúráknál találtunk minimálisan nagyobb értéket, míg az összes többi esetben az eredmények csaknem azonosak. A C16:1 és C17:0 esetében ez a minta tartalmazta a legkisebb értéket, míg az összes többi esetben nincs különbség a minták között. A sztearinsav esetében kapott *Lactobacillus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (28 °C); *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (46 °C); *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* és *Bifidobacterium lactis* (46 °C) kultúrákkal készült mintáknál találtuk a legkisebb koncentrációt, míg a többi esetben az adatok gyakorlatilag egybeesnek.

Az összes mintát értékelve a legnagyobb különbségek az elaidinsav esetében mutatkoztak, ahol a legkisebb értéket a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*-

szal és a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*-szal (46 °C) beoltott minta esetében találtuk 2,895%-kal, a legnagyobb pedig a *Lactobacillus lactis subsp. lactis*-szal, *Lactobacillus lactis subsp. cremoris*-szal és *Lactobacillus lactis subsp. biovar*-szal (28 °C) beoltott mintánál 7,58%-kal. Az olajsav esetében a legnagyobb értéket a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*-szal és *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*-szal kapott minta produkálta 28,6%-kal, míg az olajsav-tartalom a *Lactobacillus lactis subsp. lactis*-szal, *Lactobacillus lactis subsp. cremoris*-szal és *Lactobacillus lactis subsp. lactis biovar*-szal (28 °C) beoltott mintában volt a legalacsonyabb 23,58%-kal.

Az összes többi kultúránál az olajsav-tartalom 24,1–26,0% között változott. A linolsavnál a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*-szal és *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*-szal kapott anyag némileg kiugró értéket mutat, de az összes többi zsírsav esetében nincs lényeges különbség a zsírsavak koncentrációjában. Az elaidinsav részaránya a nyers és a pasztörözött tejmintában 5,31–5,51%, ami alig változik meg a beoltás következtében. Legmagasabb értékét 7,58%-kal a *Lactobacillus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, (27 °C, 7 óra) mintánál, míg legkisebb értékét a *Lactobacillus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus lactis subsp. cremoris*, (28 °C, 14) óra mintánál érte el 2,89%-kal.

A nyerstej konjugáltlinolsav-tartalmát 0,48%-nak mértük, mely érték sem pasztörözés hatására, sem az általunk használt kultúrák hatására nem változott lényeges mértékben. Vizsgálatainkból azt meg tudtuk állapítani, hogy a nyerstej konjugáltlinolsav-tartalma nem vész el kultúrákkal történő beoltást követően, hisz a savanyított termékek szinte ugyanannyi konjugált linolsavat tartalmaztak, mint a kiindulási nyerstej.

Összegezve tehát elmondható, hogy az általunk használt, a tejipari gyakorlatban mindennaposan alkalmazott kultúrák hatására a tej eredeti zsírsav-összetétele alig változik. Minimális különbségeket találtunk ugyan, az egyes zsírsavak esetében a kultúrák között, de e különbségek oly csekélyek, hogy nem feltételezhető, hogy nagyobb számban elvégzett vizsgálatokkal a különbségeket statisztikai analízissel is meg lehessen erősíteni.

3.3.4.3. Savanyú tejtermékek konjugáltlinolsav-tartalmának növelése linolsav hozzáadásával

Savanyú tejtermékek KLS-tartalmának növelésére magas linolsav-tartalmú nap-

raforgóolaj adagolásával próbálkoztunk a laktobacilusok fermentációja során. Három laktobacilus fajtára megállapítottuk az optimális linolsav-mennyiség adagolást, mely a maximális KLS-produkcióra képes, és amelynél nagyobb mennyiség szignifikáns csökkenést okozhat a KLS-tartalomban. A savanyú tejtermékek előállítása során a *Lactobacillus acidophilus*, a *Lactobacillus casei* és a *Lactobacillus plantarum* szintenyészeteket használtunk. A nyerstej zsírjának c9,t11-KLS-tartalma öt mérés átlagában 117,92 mg/100 g volt, mely érték a pasztörözött tejben átlagosan 116,43 mg/100 g tejszírra csökkent.

A *Lactobacillus acidophilus* szintenyészettel beoltott mintáknál a c9,t11-KLS-tartalom 50 µl napraforgóolaj adagolás hatására 140,17; 100–150 µl napraforgóolaj után pedig 178,64–179,86 mg/100 g zsír értékre nőtt. E maximális értéket követően a 200, 300 és a 400 µl adagolás hatására 110,75–102,67 mg/100 g zsírra, 600–1500 µl hatására pedig 90,30–87,58 mg/100 g zsírra csökkent.

A *Lactobacillus plantarum* esetében 50 µl napraforgóolaj hatására a KLS-tartalom 147,65 mg/100 g zsírra, 100 µl esetében pedig 188,64 mg/100 g zsírra nőtt. Ezt követően a csökkenés eltérő tendenciát mutat a *Lactobacillus acidophilus* szintenyészethez képest, hisz a 150–1500 µl napraforgóolaj adagolás hatására a KLS-tartalom 148,94-ről 117,67 mg/100 zsírra csökkent. A *Lactobacillus casei* esetében a napraforgóolaj adagolás az 50–1500 µl tartományban csekély hatással volt a KLS-tartalomra, 50 µl napraforgóolaj adagolás hatására a KLS-tartalom 139,46 mg/100 g zsírra nőtt, majd maximumát a 400 µl napraforgóolaj adagolása-kor érte el 142,22 mg/100 g zsírral, és még 1500 µl napraforgóolaj adagolásakor is a KLS mennyisége elérte a 139,69 mg/100 g zsír szintet.

A *Lactobacillus acidophilus* és a *Lactobacillus plantarum* szintenyészetek esetében a 100 µl/100 cm³ napraforgóolaj adagolásánál a KLS mennyisége mintegy 35–40%-kal megnőtt, míg a *Lactobacillus casei* esetében csak 20%-os növekedést tapasztaltunk. Ezen utóbbi baktériumnál az 50–1500 µl/100 cm³ tartományban szinte változatlan maradt a KLS mennyisége, míg a *Lactobacillus acidophilus* és a *Lactobacillus plantarum* esetében 100 µl/100 cm³ napraforgóolaj adagolásánál egy határozott maximum mutatható ki.

A három vizsgált szintenyészet sejtszáma az adagolt olaj mennyiségével csökkent, mert a három vizsgált baktériumtörzsre a napraforgóolaj linolsav-tartalma antibakteriális, növekedést gátló hatást gyakorolt. Ezért a napraforgóolaj fermentáció

előtti adagolásával a gyakorlatban alkalmazott szintenyészetek esetében óvatosan kell eljárni, hisz vannak olyanok, amelyek szinte közömbösek a hozzáadott linolsav mennyiségére (*Lactobacillus casei*), és vannak olyanok is, amelyek optimális mennyiségű linolsav-hozzáadás hatására szignifikáns mennyiségű KLS-termeléssel reagálnak (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*).

3.3.4.4. A konjugált linolsav mennyiségének változása a sajtok tárolása során

Meghatároztuk három félkemény- (Dalia, Penteleu, Rucăr) és egy feta típusú sajt konjugáltlinolsav-koncentrációjának változását tárolás során, melyhez három-hetenként vettünk mintát. A Dalia sajtnál a konjugáltlinolsav-tartalom 0,047 g KLS/100 g zsír-ról 0,115 g KLS/100 g zsírra nőtt a tárolás 18. hetére, tehát a tárolás a KLS-tartalomban 0,068 g KLS/100 g zsír koncentráció-változást eredményezett. A legnagyobb KLS-koncentrációt a 18. héten mértük, amit egy csökkenés követett, és a 21. héten a Dalia sajt mindössze 0,063 g KLS/100 g zsír értéket mutatott.

A Penteleu sajtnál a KLS mennyiségének a változása a tárolás során kisebb mértékű volt; a kezdeti 0,034 g KLS/100 g zsír koncentrációról csak 0,089 g KLS/100 g zsírra növekedett. A tárolás végén, a 21. héten kapott értéknél megfigyelhető ugyan egy visszaesés a konjugált linolsav mennyiségében, de általánosságba itt is elmondható, hogy a konjugált linolsav mennyisége növekedett a tárolási idő alatt. A Penteleu sajtban a tárolás végeztével a konjugált linolsav koncentrációja 0,070 g KLS/100 g zsír volt.

A Rucăr sajtnál is a 18. héten mértük a maximális konjugáltlinolsav-koncentrációt (0,128 g KLS/100 g zsír). A tárolási idő során a konjugáltlinolsav-koncentráció folyamatosan nőtt, majd a 18. hét után csökkenő tendenciát mutatott. A feta típusú Telemea sajtnál a kezdeti koncentráció közel azonos volt a vegyes alvasztású sajtoknál mért értékekkel (0,038 g KLS/100 g zsír), majd a 18. héten érte el a maximumát 0,18 g KLS/100 g zsírral.

Méréseink szerint az összes sajt esetében megállapítható a tárolás 18. hetéig egy folyamatos növekedés, melyet aztán csökkenés követ a tárolás végéig, tehát a 18 hétnél hosszabb tárolás, a vizsgált körülmények között, alacsonyabb KLS-tartalmú termékekhez vezet.

A három félkemény és az egy feta típusú sajt KLS-tartalmát vizsgálva a tárolási idő függvényében tehát megállapítottuk, hogy 18 hétig nő a sajtok KLS-tar-

talma, de a növekedés, a sajt előállítás technológia eltérő volta miatt, különböző módon nyilvánul meg.

3.3.4.5. A hőkezelés és a mikrohullámú kezelés hatása a tej, a vaj és a sajt zsírsav-összetételére

A nyerstej valamivel több zsírsavat tartalmaz, mint a mikrohullámmal kezelt tej, a különböző idejű mikrohullámú kezelések között azonban szignifikáns különbségeket nem tudtunk kimutatni. Nem találtunk jelentős különbségeket a zsírsavak nagyobb hányadát kitevő palmitinsav-, illetve sztearinsav-tartalomban sem. A nyerstejben a tejszír 16,26% olajsavat és 1,53% elaidinsavat tartalmazott; a cisz konfiguráció 91,36%; a transz konfiguráció pedig 8,64%-ot tett ki a C18:1 zsírsavakon belül. Kétperces főzés hatására a cisz konfiguráció 2%-kal, nyolc perces főzés hatására pedig 4%-kal csökkent, a transz konfiguráció pedig főzés hatására (2–8 perc) mintegy 15–20%-kal nőtt. Hasonló csökkenés figyelhető meg a mikrohullámú kezelés hatására is: 2 perces kezelés után a cisz konfiguráció 2%-kal, 8 perces kezelés után pedig majd 10%-kal csökkent, 2 perces kezelés hatására a transz konfiguráció 10–15%-kal, 8 perces kezelés esetében pedig 40–50%-kal nőtt. A 2, illetve 8 percig, 100 °C-on végzett hőkezelés, illetve a 2 és 8 percig 450 W energiával végzett mikrohullámú kezelés jelentős mértékben csökkenti a cisz konfigurációjú olajsav, és növeli a transz konfigurációjú elaidinsav részarányát.

A 44%-os zsírtartalmú Dalia-típusú sajtnál a kontroll és a mikrohullámmal nem kezelt mintában az olajsav részaránya 83,84%, az elaidinsav részaránya 16,16% volt az összes C18:1 zsírsavon belül. Kétperces mikrohullámú kezelés hatására a cisz konfiguráció 1,5%-kal, 8 perces mikrohullámú kezelés hatására pedig 2%-kal csökkent. Két perc alatt a transz konfiguráció részaránya 8%-kal, 8 perces mikrohullámú kezelést követően pedig 9–10%-kal nőtt. Az összes többi zsírsav esetében a mikrohullámú kezelés hatására jelentős változás nem tapasztalható.

A 80%-os zsírtartalmú vaj olajsav-tartalmát az összes zsírsav relatív százalékában 23,37%-nak, elaidinsav-tartalmát pedig 3,62%-nak mértük. A C18:1 zsírsavakon belül a kezeletlen vajban az olajsav 86,58; az elaidinsav pedig 13,42%-ot tett ki. Ezek az arányok némileg megváltoztak mind a főzőlapon 215 °C-on, mind a mikrohullámú sütőben 450 W energiával kezelt minták esetében. Két percről 8 percre emelve a 215 °C-os főzőlapon kezelés hőmérsékletét az olajsav részaránya 1%-kal csökken, és hasonló eredményeket kapunk akkor is, ha a mikrohullámú

kezelés idejét 2-ről 8 percre növeltük. Az arányokat tekintve mindkét kezelési időnél és mindkét hőkezelési módnál az olajsav csökkenése a hibahatárokon belül megfelel az elaidinsav növekedésének. A hőkezelés idejének növelésével tehát mind a főzőlapon, mind a mikrohullámú sütőnél végzett kísérlet esetében csökken a cisz konfigurációjú olajsav, és növekszik a transz konfigurációjú elaidinsav mennyisége.

Vizsgáltuk ezen túl a Székelyföldön kapható margarinok és vajak zsírsav-összetételét, melynek során megállapítottuk, hogy a vajban illetve a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható margarinokban a transz zsírsavak mennyisége rendkívül csekély mértékű.

Összefoglalva elmondható, hogy a különböző idejű hagyományos és mikrohullámú hőkezelés során a tej és tejtermékek valamint a margarin olajsav-tartalmának csökkenését és elaidinsav-tartalmának növekedését tapasztaltunk, ami azonban oly csekély mértékű volt, hogy a fogyasztó egészségét nem veszélyezteti.

3.3.5. Szelénnel dúsított tej és tejtermékek előállítása

Az elmúlt évszázad közepéig az addig toxikusnak tartott szelénről kiderült, hogy fontos élettani hatású mikroelem, melynek hiánya több enzim működését hátráltatja, hosszan tartó hiány esetén pedig kóros folyamatok is lejátszódhatnak a szervezetben. Magyarország a szelénhiányos területek közé tartozik Európában, ezért a tej és tejtermékek megnövelt szeléntartalmával kívántunk hozzájárulni a lakosság szelénellátása javításához.

3.3.5.1. A kísérleti állatok, szelén-kiegészítés, a tej szeléntartalma

Kísérleteinkbe három szimentáli jellegű tejelő tehenet vontunk be, melyek négy és öthónapos vemhesek voltak. A tehenek kukorica szilázsra és réti szénára alapozott takarmányozási rendszerben termeltek, átlagos tejtermelésük 4000–5000 liter között változott a laktáció folyamán. A szelén-kiegészítést szelén-eszteróllal végeztük (Selplex-2300), mely 2300 mg szelént tartalmazott szelén-metionin, illetve szelén-cisztein formában. Az állatok által fogyasztott takarmányadag szeléntartalma (kontrollcsoport) 0,43 mg szelén volt naponta. A kísérlet megkezdése előtt mindegyik tehéntől tejmintát vettünk (kontrollcsoport), majd az állatok a kísérlet első két hetében egy mg, a harmadik és a negyedik héten két mg, az ötödik és a hatodik héten négy mg, a hetedik és a nyolcadik héten pedig hat mg szelén-ki-

egészítést kaptak naponta a korábbi (kontrollcsoport) takarmányadag mellett. A nyolcadik hetet követően kéthetente még három alkalommal vettünk mintát, és mértük a tej szeléntartalmát.

Megállapítottuk, hogy növekvő szelén-kiegészítéssel a tej szeléntartalma a kontrollcsoportban mért 0,0148 mg/kg-ról 1 mg szelén-kiegészítés hatására 0,031; 2 mg hatására 0,053; 4 mg hatására 0,081; 6 mg hatására pedig 0,094 mg/kg-ra nőtt. A szelén-kiegészítés befejezését követően a szeléntartalom két hét alatt 0,062; 4 hét alatt 0,021; 6 hét alatt pedig 0,019 mg/kg-ra csökkent, amely majdnem egybeesett a kísérlet kezdetekor a kontrollcsoportnál mért 0,018 mg/kg értékkel.

Növekvő szelén-kiegészítés hatására a tej szeléntartalma szignifikánsan nőtt. A legnagyobb mértékű emelkedést a 4 mg/nap szelén-kiegészítéskor a 6. héten mértük, melyet követően a szelén-kiegészítés 6 mg/nap dózisa történő emelése ugyan szignifikánsan tovább növelte a tej szeléntartalmát, de a növekedés mértéke lényegesen kisebb a megelőző időszakhoz képest. A szelén-kiegészítés elhagyása után egy hónappal a tej szeléntartalma megegyezett a kontrollcsoport értékével. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy folyamatosan megnövelt szeléntartalmú tejet csak akkor lehet előállítani, ha az állatok takarmányában a szelén-kiegészítés folytonos.

3.3.5.2. A különféle tejtermékek előállítása

Mind a kontroll (18 µg/kg szeléntartalom), mind a 2 mg szelén-kiegészítést kapott állatok szelénese (53 µg/kg szeléntartalom) tejéből joghurtot, Telemea sajtot, tehéntúrót, Ordát és vegyes alvasztású sajtot készítettünk. A kontroll tejből készült joghurt szeléntartalmát 18,6 µg/kg-nak, a szelénese tejből készültét pedig 58,5 µg/kg-nak mértük. A kontroll tejből készült Telemea szeléntartalmát 66,0, a szelénese tejből készültét pedig 138,1 µg/kg-nak mértük. A kontroll esetében a savó 9,7, a szelénese tej esetében 20,1 µg/kg mennyiségű szelént tartalmazott. A szelénese tejből készült Telemea több mint kétszer annyi szelént tartalmaz, mint a kontroll. Az Orda esetében a kontroll tejből készült termék 80,8, míg a szelénese tejből készült 167,2 µg/kg szelént tartalmazott.

A vegyes alvasztású kontroll tejből készült sajt szeléntartalmát 88,6, a szelénese tejből készültét pedig 200,0 µg/kg-nak mértük. A kontroll tejből készült tej savója 9,2, míg a szelénese tejből készülté 21,4 µg/kg szelént tartalmazott. A kont-

roll tejből készült tehéntúró szeléntartalmát 57,4, míg a szelénese tejből készültét 154,8 µg/kg-nak mértük, ami nagyon hasonlított a Telemea sajt összetételéhez. A tehéntúró előállítás során kapott savó szeléntartalma a kontroll esetében 8,8, a szelénese tej esetében pedig 25,8 µg/kg volt.

Megállapítottuk, hogy a szelénese tejből készült Telemea, Orda és vegyes alvasztású sajt szeléntartalma szelénese tejből készítve minden esetben több mint duplája volt a kontroll tejből készített tejtermékek szeléntartalmának. A legtöbb szelént a vegyes alvasztású sajt tartalmazta 200,0 µg/kg-mal, amelyet az Orda követett 167,2 µg/kg-mal, ezt követte a tehéntúró 154,8 µg/kg-mal, majd végül következett a Telemea 138,1 µg/kg-mal. Mindegyik tejterméknél a savó szeléntartalma több mint duplája volt a szelénese tej esetében a kontrollhoz viszonyítva.

3.3.6. Tabletta, illetve kapszula előállítása szarvasmarha kolosztrumból az ember passzív immunitásának növelésére

A kolosztrumot (főcstejet) egy 1800 holstein-fríz tehenet tartó telepen az ellés után pár órával vettük, melyet követően egyrészét zsírtalanítottuk, a másik részét pedig eredeti állapotban, a zsírtalanított kolosztrummal együtt, mínusz 5 °C-os tálcáfűtést alkalmazva, 5-10 Pa körüli vákuumban, liofileztük. Az eredeti, nyers kolosztrum immunoglobulin-G-tartalmát (IgG) radiális immunodiffúzióval 116,4 g/liternek, a kolosztrum-porból, visszaállítva a kolosztrum eredeti fehérje tartalmát, 112,6 g/liternek mértük, ami azt jelenti, hogy az általunk alkalmazott feldolgozás során az immunoglobulinok mennyisége gyakorlatilag megmaradt, csak minimális veszteséggel kell számolni.

Mind a zsíros, mind a sovány kolosztrum-por szárazanyag-tartalma 86-89% között alakul, ami megfelel egy légszáraz tejpor szárazanyag-tartalmának. A sovány kolosztrum-por hamutartalma 6,7-6,8%, fehérjetartalma (Kjeldahl módszerrel mérve) 79-80%, és ezen fő összetevők mellett még minimális mennyiségben tejzsír és tejcukor is található benne. A zsíros kolosztrum-por 69% körüli fehérjés és 4,5% körüli hamut tartalmaz, a maradékot pedig a tejzsír és a tejcukor adja.

A sovány kolosztrum-por fehérjetartalmának 79,3%-a (átlagosan 80%-a) IgG, tehát a sovány kolosztrum por 63-64%-a IgG, azaz 1000 mg kolosztrum porban van 630 mg IgG. A tejfehérje aminosav-összetételét meghatározva kitűnik az esszenciális aminosavak magas aránya, ami nem meglepő, mert a kolosztrumban

dominál a savófehérje, és annak biológiai értéke, esszenciális aminosav-tartalma, lényegesen magasabb, mint a kazeiné.

A kolosztrum hamutartalma mintegy másfélszerese a tejének, és némileg más a makro- és mikroelem-tartalma is. A kolosztrum kalcium- és foszfortartalma, köszönhetően az alacsony kazein aránynak, a jóval magasabb hamutartalom ellenére, alig különbözik a tejétől, káliumtartalma kissé nagyobb, nátriumtartalma pedig kissé kisebb a tejénél. Említésre méltó a kolosztrum jóval nagyobb magnéziumtartalma, mely a bélszurok eltávolítása miatt létfontosságú a borjú számára. A kolosztrum mikroelemeiről következtetést levonni nehéz, mert azt elsősorban a takarmányozás, a takarmányok mikroelem-tartalma befolyásolja, és hogy az állatok milyen minőségű és mennyiségű kiegészítést kaptak a laktáció során.

Az így előállított kolosztrum-port többféle módon is próbáltuk hasznosítani, melyek a következők voltak: kolosztrum tabletta (pasztilla), az ember passzív immunitásának növelésére, vitaminokkal és ásványi anyagokkal kiegészített kolosztrum tabletta a passzív immunitás és az ellenálló képesség növelésére, pre- és probiotikumokkal dúsított kolosztrum tabletta a passzív immunitás növelésére és a kedvező bél mikroflóra kialakítására.

3.3.7. Az anyatej zsírtartalma és zsírsav-összetétele

Az anyatejjel kapcsolatos saját kutatásainkat a Csíkszeredában és környékén élő anyáktól gyűjtött tejmintákkal végeztük a laktáció azon pillanatától, ahogy az anyák tejet tudtak adni, és addig a pillanatig, amíg volt tejük. A mintavétellel párhuzamosan egy adatlap segítségével követtük az anyák mintavétel előtti táplálkozását, egy kérdőíven feljegyeztük az anyák életkorát, testtömegét, a szülés idejét, a szülések számát, az anyák egészségi állapotát a terhesség előtt és alatt, valamint a laktáció folyamán. Részletesen kikérdeztük az anyákat a gyógyszeres esetleg vitaminkezelésről, táplálkozási szokásaikról, sport tevékenységükről, élvezeti cikkek használatáról, a családi, valamint társadalmi és gazdasági helyzetükről.

Az általunk vizsgált anyák életkora 24–38 év, egészségesek, testtömegük 50–60 kg, vidéken, valamint városi környezetben, családban éltek, néhányan először, mások másodszor szültek egészséges, fejlett csecsemőt. A terhesség és a szülés szövődménymentes volt, és normál időre, természetes úton történt. A tejmintavétel minden esetben kézi pumpával, este történt. Az anyák táplálkozási szokásaiban

lényeges különbség nem volt. Mindegyikük táplálékában jelen voltak a tejtermékek, húsfélék, zöldségek és gyümölcsök.

A minták zsírtartalmát Gerber módszerrel, a zsír zsírsav-összetételét bór-trifluoridos átészterezést követően gázkromatográfiával, lángionizációs detektor alkalmazásával határoztuk meg. Az eredményt zsírsav-metilészter relatív tömegszázalékában kaptuk meg. A c9-t11-KLS izomer minőségi meghatározásához a Supelco cég által gyártott és forgalmazott FAME Mix standardot, majd FAME Mix és KLS standard elegyét használtuk. A gázkromatográfiás körülmények megegyeztek a zsírsav-összetétel meghatározásánál alkalmazottakkal.

Az anyatejek zsírtartalma az általunk vizsgált periódusban a vidéki környezetben élő anyák tejében átlagosan 4,3–6,0 g/100 ml, míg a városi anyák tejében 4,2–4,9 g/100 ml között változott. Mind a vidéki, mind a városi környezetben élő anyák tejének zsírtartalma nőtt a laktációs periódus alatt. A tejzsírban jelentős mennyiségben a palmitinsav volt jelen, majd ezt követte a mirisztin-, a laurin- és a sztearinsav. Az egyszeresen telítetlen zsírsavak közül az anyatej tejzsírjában megtalálható volt a C16:1 (0,3–1,9%), a C17:1 (0,1–0,23%), valamint a C20:1 0,1% körüli mennyiségben. Jelentős volt az olajsav koncentrációja is (27–31%).

A többszörösen telítetlen zsírsavak közül a csecsemők számára fontos szerepet játszanak a hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavak. Minden mintában kimutathatóak voltak az n-6 esszenciális zsírsavak: a linol- (C18:2n6), az α -linolén- (C18:3n6), valamint az arachidonsav (C20:4n6). Az n-3 zsírsavak közül kisebb mennyiségben megtalálható volt az esszenciálisnak számító linolén-sav (C18:3n3), azonban a dokozaheksaénsav (C22:6n3) csupán nyomnyi mennyiségben volt kimutatható, és egy anya esetében nem is tudtuk azt kimutatni. A transz-zsírsavak közül 0,7–1,0% körüli koncentrációban az elaidinsav (C18:1nt) fordult elő.

Nem találtunk lényeges különbséget a városi, valamint vidéki környezetben élő anyák tejének KLS-tartalmában annak ellenére, hogy volt némi eltérés az anyák életmódjában, táplálkozásukban. A városi környezetben élő anyák tejének KLS-tartalma a laktáció során 10,4–28,1 mg/100 ml tej, a vidéki környezetben élő anyák esetében pedig 10,9–39,0 mg/100 ml tej között változott. Különbséget találtunk a szoptatás előtti (5,1 mg/100 ml) és utáni mintavételből származó minták között (9,3 mg/100 ml tej) a tej KLS-tartalmában.

Az anyák táplálkozását és a tejminták KLS-tartalmát vizsgálva megállapítottuk, hogy az anyatej KLS-tartalmát lényegesen befolyásolja az anya táplálkozása, ugyanis legtöbb esetben, amikor az anyák nagyobb KLS-tartalomú táplálékot fogyasztottak (tej, sana, vaj, túró, marhakolbász, marhavirslí), magasabb volt a tejek KLS-tartalma.

3.3.8. Prebiotikumok előállítás a laktóz, valamint az almasav és citromsav reakciójával

A prebiotikumok olyan emészthetetlen élelmiszer komponensek, melyek eljutva a vastagbélbe, tápanyagul szolgálnak a bifidobaktériumok és a laktobacilusok számára. A tipikus prebiotikumok közé tartoznak az oligoszacharidok, melyekhez hasonló vegyületeket szerettünk volna előállítani a laktóz és az almasav, valamint a laktóz és a citromsav megfelelő koncentrációban, megfelelő ideig, és optimális hőmérsékleten végzett reakciójával. Meghatároztuk a reakció optimális paramétereit, mértük a kiindulási anyagok fogyását és a végtermék koncentrációjának növekedését, sósavas hidrolízist követően elemeztük a hidrolizált prebiotikum összescukor-tartalmát. In vitro kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az általunk előállított végtermék ellenáll a szénhidrát bontó enzimeknek, mely alapkövetelmény egy prebiotikum esetében, hogy eljutva a vastagbélbe tápanyagul szolgáljon az ott élő probiotikus baktériumok számára.

Kísérleteinket gyógyszerkönyvi minőségű laktózzal, citromsavval és almasavval végeztük. A laktóz 99,7%-os tisztaságú, étkezési minőségű, finomra porított, szarvasmarha tejből elkülönített, porlasztva szárítással előállított D(+)-laktóz 1-hidrát volt.

3.3.8.1. Az almasav és a citromsav, valamint a laktóz közötti reakciók

Az első kísérletben 80 g laktózhoz 20 g citromsavat, majd a második kísérletben 80 g laktózhoz 20 g almasavat kevertünk, és elvégeztük a hőkezelést 170 °C-on, 5, 10, 20, 30, 40, 50 és 60 percig. Ezt követően a citromsavas és almasavas keverékeket 130, 140, 150, 160 és 170 °C-on kezeltük 30 percig. 5 percig hőkezelve citromsavval a laktózt annak mennyisége 73,6%-ra csökkent, 60 percig hőkezelve a laktóz mennyisége 7,1%-ra csökkent. Tehát úgy tűnik, hogy a laktóz kb. 93%-a a citromsavval átalakult valamiféle oligomer vagy polimer vegyületté.

Az 5 percig almasavval hőkezelt minta laktóztartalmát 70,6%-nak, a 60 percig kezeltét pedig 16,4%-nak mértük, tehát 60 perc alatt a laktóznak 83–84%-a alakult át valamiféle terméké. Leszűrhetjük tehát azt a következtetést, hogy mind az almasav, mind a citromsav alkalmas laktózzal oligomerek vagy polimerek kialakítására.

130 °C-on 30 percig hőkezelve a citromsavas mintát, a laktóznak csak mintegy 1–2%-a alakult át, ugyanebből a mintából a 170 °C-os hőkezelés után viszont csak 16,4% laktózt tudtunk visszanyerni, tehát a laktóz több mint 80%-a átalakult oligomerré vagy polimerré. Almasavval megismételve a kísérletet, 30 perc alatt a laktóznak mintegy 30%-a alakult át 130 °C-on, mely érték 70%-ra nőtt 170 °C-on, tehát magasabb hőmérsékleten a citromsav és az almasav is megfelelő partnernek bizonyult laktóz oligomerek vagy polimerek kialakítására.

A „prebiotikum” cukortartalmának meghatározása sósavas hidrolízis után. A 170 °C-on, 60 percig 20% citromsav jelenlétében hőkezelt mintánál a laktóztartalom 7,1% volt, mely a sósavas hidrolízist követően összescukor-tartalomban mérve 46,3%-ra nőtt. A 20% almasavval 170 °C-on, 60 percig végzett hőkezelést követően a laktóztartalom 16,4%-ról 51,2%-ra emelkedett, összes cukorban kifejezve, a sósavas hidrolízist követően. A 170 °C-on 30 percig végzett hőkezelést követően 20% citromsav jelenlétében a laktóztartalom 16,4%-ról 54,9%-ra, almasav esetében pedig 25,5%-ról 53,8%-ra nőtt összes cukorban kifejezve.

Fentiekből következik, hogy a laktóz nagyobb része átalakult egy olyan oligomerré, vagy polimerré, mely a Fehling-reakciót csak minimális mértékben adja, viszont amikor sósavval az oligomereket, illetve a polimereket mono- esetleg diszachariddá alakítottuk át, a keletkezett cukorszerű anyagok (valószínű nagyobb részben glükóz és galaktóz, kisebb részben talán laktóz) adták a Fehling-reakciót, és összes cukorként voltak meghatározhatók.

A „prebiotikum” *amiláz* enzimmel történő kezelése. Az *amilázzal* történő hidrolízist követően az összescukor-tartalom gyakorlatilag nem változott, tehát az *amiláz* a keletkezett oligo- és a poliszacharid származékokat nem volt képes hasítani. Így a feltételezhetően oligomer vagy polimer termék mindennel rendelkezik, ami prebiotikumná tudná tenni, azaz a bél első szakaszában nem bomlik le, nagy valószínűséggel eljut a vastagbélbe, ahol táplálékul szolgálhat az ott élő probiotikumoknak.

3.3.9. Élrelmezési csírák szerepe az emberi táplálkozásban

A csírázás során lényeges változások állnak be a mag eredeti összetételében, ugyanis megváltozik a fehérjefrakciók mennyisége, és arányuk a kisebb fehérjefrakciók, oligopeptidek valamint szabad aminosavak irányába tolódik el. Változik a csíráztatás során az aminosavak mennyisége (egy részük nő, másrészt csökken, vagy nem változik), és nagy mennyiségben keletkeznek nem fehérjeépítő aminosavak is. E változások következtében nő a csíráfehérje biológiai értéke, és lényegesen nagyobb lesz az emészthetősége. A csíráztatás során megváltozik a trigliceridek összetétele is, a hidrolízis következtében szabad zsírsavak keletkeznek, ami a zsír egyfajta előemésztésének tekinthető. Általánosságban elmondható, hogy nő a telítetlen zsírsavak részaránya a telítettekhez viszonyítva, és a telítetlen zsírsavakon belül is eltolódik az arány az esszenciális linolsav felé. Csökken a csírákban az antinutritív anyagok mennyisége, és a makro- és mikroelemek hasznosulása is javul a csíráztatás következtében. Fentieken túl a csírák sok olyan anyagot tartalmaznak (szulforafán, szulforafén, izotiocianátok, glükoszínolátok, enzimek, antioxidánsok, vitaminok), amelyeknek bizonyított hatásuk van a rák megelőzésében, ill. a rákelenes terápiában.

A búza, a lencse, a lucerna, a retek és a napraforgómag zsírsav-tartalmát vizsgálva a csíráztatási idő függvényében megállapítottuk, hogy a csíráztatás folyamán minimális mértékben változik mind a telített, mind a telítetlen zsírsavak mennyisége. A vizsgált csírák a telítetlen zsírsavak közül jelentős mennyiségben tartalmaztak palmitinsavat, amelynek mennyisége alig változott, a lucernacsírá esetében pedig nőtt a csíráztatás során. A telítetlen zsírsavak közül a magok és csírák olajsavból és linolsavból tartalmaztak legtöbbet. Az olajsav-tartalom gyakorlatilag változatlan maradt a csíráztatási idő függvényében, és ugyanez elmondható a lencsecsírá kivételével a linolsavra is az összes vizsgált élrelmezési csírá esetében. A lencsecsíránál az olajsav mennyisége jelentős mértékben csökkent, a linolsav mennyisége pedig jelentős mértékben nőtt. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a legtöbb általunk vizsgált zsírsav a csírák nagyobb részénél gyakorlatilag alig változott a csírázási idő függvényében, és tendenciát sem a telített, sem a telítetlen zsírsavak esetében nem tudtunk megállapítani.

3.3.10. A búza szeléntartalmának szerepe az emberi táplálkozásban

A búza szeléntartalmának jelentőségét vizsgálva az emberi táplálkozásban foglal-

koztunk a szelénnel, mint enzimek alkotórészével, háziállataink szelénhiányával, a szelén szerepével az élrelmezésben, ennek kapcsán a szelénhiány következményeivel és a szelén toxicitásával. A búza szeléntartalmát és annak hasznosulását vizsgálva elemeztük a gabonafélék hozzájárulását az ember szelénszükségletéhez, a különféle talajokon termesztett búza szeléntartalmát, a technológia (őrlés) hatását a liszt szeléntartalmára, a búzában előforduló szelénformákat, a különböző élrelmiszerek szeléntartalmának hasznosulását, valamint a szelén hatását a búza enzimeinek aktivitására. Munkánk második részében a talaj szeléntartalmának hasznosulását elemeztük a különböző növényeknél, elsősorban a búzánál, vizsgáltuk az élrelmiszerek szeléntartalmának növelési lehetőségeit a talaj szeléntartalmának növelésével, végezetül vizsgáltuk a szelén búzába történő beépülését.

Megállapítottuk, hogy a különböző szelénformák az emberben és az állatokban is másként hasznosulnak, ezért nem elég csak az összes szeléntartalmat, hanem a szelénformákat is analizálni kell. Végezetül megállapítottuk, hogy a talaj szeléntartalmának növelésével a búza szeléntartalmát jelentős mértékben lehet emelni, amely mint legfontosabb gabonanövény, döntő mértékben járulhat hozzá az ember szelénszükségletének kielégítéséhez.

Meghatározva a búzafű és a búzámag szelén- és szárazanyag-tartalmát megállapítottuk, hogy a búzafű és a búzámag szeléntartalma között a korrelációs koefficiens értéke 0,36, ami egy közepes összefüggésre utal. A búzafű 100% szárazanyagra számolt szeléntartalma és a búza összesszelén-tartalma közötti összefüggés szintén közepesen szoros, a korrelációs koefficiens értéke 0,40. Mérve a búzámag szelén- valamint szeleno-metionin-tartalmát számoltuk a szerveszelén-tartalmat. Megállapítottuk, hogy rendkívül szoros az összefüggés a búza szeléntartalma, szeleno-metionin-tartalma és szeleno-metioninból számolt szerveszelén-tartalma között (a korrelációs koefficiensek értéke 0,92 és 0,99 közötti). A búzafű szeleno-metionin-tartalma és a búza szeleno-metionin-tartalma közti összefüggést igen gyengének ($r=0,23$) találtuk.

4. PUBLIKÁCIÓK

Conjugated linoleic acid production in fermented foods

4

J. Csapó^{1,2}, É. Varga-Visi¹¹Kaposvár University, Kaposvár, Hungary; ²Sapientia Hungarian University of Transylvania, Miercurea Ciuc, Romania

4.1 Introduction

In the last two decades numerous studies have been published on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. The most important motivation for related research investigations is the possible positive health effects of these “unusual” fatty acids; therefore, the authors prepared a brief outline on the health amelioration potential of CLA, presented at the end of this chapter. Nevertheless, the main part of the chapter is a summary of published data relating to the presence of CLA in fermented milk and meat products, including functional foods, and, moreover, the study of factors that can influence the CLA content of these food items. The CLA content of raw materials is an important issue because it can vary over a broad range, depending on several factors. The products of ruminants usually contain higher amounts of CLA than those of monogastric animals, and the effect of feeding is also an important influencing factor. Several successful attempts have been made through which the CLA content of raw milk and meat was increased with appropriate feeding regimens. A possible means of production of fermented foods with enhanced CLA levels is the incorporation of these initial materials into the product. Another promising approach is the accomplishment of CLA increment during fermentation by the selection of CLA-forming strains and application of appropriate external conditions. These issues are discussed in detail, following a short introduction to the chemistry and synthesis of CLA in Section 4.2.

4.2 Basic knowledge of conjugated linoleic acid (CLA)

Polyunsaturated fatty acids of natural origin have double bonds, mostly in isolated positions. The collective term “conjugated linoleic acid” refers to a group of positional and geometric isomers of linoleic acid having double bonds in a conjugated position ranging from 2,4 to 15,17. Each positional isomer has four geometric isomers, those being *cis*, *trans*; *trans*, *cis*; *cis*, *cis*; or *trans*, *trans* – that is, the term CLA may refer to a total of 56 possible isomers (Buccioni, Decandia, Minieri, Molle, & Cabiddu, 2012). From these, numerous CLA isomers have been shown to be present in food. In milk fat, one of the most important sources of CLA, the positions of double bonds range from 6,8 to 13,15; therefore the term “total CLA content” includes a total of 32 isomers (Bessa, Santos-Silva, Ribeiro, & Portugal, 2000; Kramer et al., 2004;

Shingfield et al., 2008). The predominant isomer originally present in food was shown to be *cis*-9,*trans*-11 CLA that occurs together with *trans*-10,*cis*-12 and *trans*-7,*cis*-9 CLA, which are also present in minor but significant amounts. In contrast, commercial CLA preparations used for functional foods can contain similar concentrations of both enantiomers (Or-Rashid, AlZahal, & McBride, 2011; Park, 2009; Wahle, Heys, & Rotondo, 2004).

The term “conjugated linolenic acid” (CLnA) encompasses a collection of positional and geometric isomers of linolenic acid (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3) in which two or three double bonds have a conjugated arrangement (conjugated diene CLnA and fully conjugated CLnA, respectively) instead of methylene interruption. Conjugated diene CLnA is mostly present in the fats of ruminants (Collomb, Schmid, Sieber, Wechsler, & Ryhänen, 2006; Plourde, Destailats, Chouinard, & Angers, 2007), whereas fully conjugated CLnA is present in plant seeds (Hopkins & Chisholm, 1968).

One of the most important pathways of CLA formation in nature is the biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids (Figure 4.1). This bacterial enzymatic process is achieved mostly in the rumen, but it cannot be excluded that bacteria in the gastrointestinal tract of nonruminants are also able to convert unsaturated fatty acids to CLA to some extent, as higher linoleic acid intake caused an increment of CLA level in tissues of rats (Buccioni et al., 2012; Chin, Liu, Albright, & Pariza, 1992; Shorland, Weenink, & Johns, 1955). Formation of a very limited amount of CLA has also been shown by gastric bacterial biohydrogenation in the pig (Dugan, Aalhus, & Kramer, 2004).

The first discovered CLA precursor is linoleic acid (*cis*-9,*cis*-12 18:2). The double bond of linoleic acid present further for the carboxyl group can be translocated by *cis*-12,*trans*-11 isomerase (Kepler & Tove, 1967) and the resulting rumenic acid (*cis*-9,*trans*-11 CLA) is then hydrogenated by the reductase of *Butyrivibrio fibrisolvens* to vaccenic acid (*trans*-11 18:1) (Hughes, Hunter, & Tove, 1982). These steps occur relatively fast, whereas the hydrogenation of vaccenic acid to stearic acid is

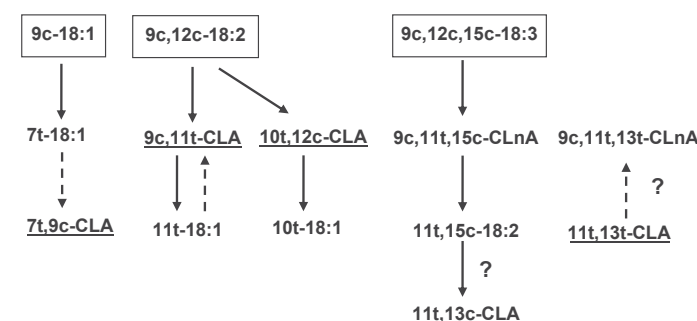


Figure 4.1 Biosynthetic pathways of those CLA isomers present in the most abundant quantities in human foods. Ruminal formation is marked with solid arrow, while formation in other organs by Δ^9 -desaturase reaction is shown with dotted arrows (according to Collomb et al. (2006), Buccioni et al. (2012) and Lerch et al. (2012)). Question marks indicate that the exact mechanism is unclear. The underlined compounds are the conjugated linoleic acid isomers. The compounds without underline are the intermediaries of conjugated linoleic acid synthesis.

much slower, as it involves different groups of organisms (Griinari, Chouinard, & Bauman, 1997; Harfoot & Hazelwood, 1997). As the decomposition of vaccenic acid is the rate-limiting step, this intermediate can accumulate in the rumen and following absorption it can be a precursor for the endogenous synthesis of *cis-9,trans-11* CLA in the mammary gland by Δ^9 -desaturase (Corl, Barbano, Bauman, & Ip, 2003; Griinari et al., 2000; Kay, Mackle, Auldist, Thomson, & Bauman, 2004; Piperova et al., 2002). The majority of *cis-9,trans-11* CLA present in bovine milk was reported to be synthesised in this pathway in the mammary gland and not in the rumen (Griinari et al., 2000; Lerch, Shingfield, Ferlay, Vanhatalo, & Chilliard, 2012). Moreover, CLA is also synthesised – also from vaccenic acid – in muscle adipose tissues both in ruminants (Bauman, Baumgard, Corl, & Griinari, 2007; Raes et al., 2004) and in monogastric animals (Gläser, Wenk, & Scheeder, 2002).

The other pathway of the isomerisation of linoleic acid is provided by the action of *cis-9,trans-10* isomerase in the rumen (Griinari & Bauman, 2006). The resulting *trans-10,cis-12* CLA can be reduced to *trans-10* 18:1 by *Butyrivibrio fibrisolvens* JW11 (McKain, Shingfield, & Wallace, 2010).

Some part of oleic acid (*cis-9* 18:1) originates from fodder and can be converted further via pathways other than hydrogenation to stearic acid in the rumen. Oleic acid has been proposed as a precursor of the formation of *trans-7,cis-9* CLA. The first step is the action of microbial isomerases resulting in positional isomers of 18:1, ranging from 6 to 16 (Mosley, Powell, Riley, & Jenkins, 2002). These *trans*-octadecenoic acids escape the rumen together with linoleic acid-origin vaccenic acid. In the mammalian tissues the dehydrogenation of *trans-7* 18:1 isomer via Δ^9 -desaturase results in the formation of *trans-7,cis-9* CLA (Corl et al., 2002). This pathway was proposed as the main process for the formation of *trans-7,cis-9* CLA (Lerch et al., 2012). Irrespective of the diet composition, the formation of *trans-7,cis-9* was not observed in the rumen (Shingfield et al., 2010).

The CLA formation pathway from α -linolenic acid precursors (*cis-9,cis-12,cis-15* 18:3) has not been completely elucidated. Kepler and Tove (1967) suggested first that *cis-12,trans-11* isomerase might be active also on α -linolenic acid in the rumen. This first step results in a conjugated diene CLnA (*cis-9,trans-11,cis-15* CLnA) via microbial isomerases in the rumen. The following reduction steps do not yield *cis-9,trans-11* CLA, but *trans-11,cis-15* 18:2 is formed. This fatty acid has been assumed to be a precursor for *trans-11,cis-13* CLA (Kraft, Collomb, Möckel, Sieber, & Jahreis, 2003), but the exact mechanisms of the double bond translocation is yet unclear. The concentration of conjugated linolenic acids *cis-9,trans-11,trans-13* CLnA and *cis-9,trans-11,trans-15* CLnA possessed strong correlation with *trans-11,trans-13* CLA and *trans-11,trans-15* 18:2 CLA, respectively, in milk fat. These results may indicate that CLnA in milk fat are synthesised endogenously via the action by Δ^9 -desaturase in the mammary gland (Lerch et al., 2012).

CLA can also be synthesised in the human colon. Some bacterial strains normally present in the human large intestine (*Lactobacillus*, *Propionibacterium* and *Bifidobacterium* species and some *Clostridium*-like bacteria) have been found to metabolise linoleic acid and form CLA that is converted further to *trans-11* 18:1 in vitro. Vaccenic acid may be also a precursor of rumenic acid (*cis-9,trans-11* CLA) in human tissues (Devillard, McIntosh, Duncan, & Wallace, 2007).

4.3 CLA content of unprocessed food ingredients

A possible means of production of fermented foods rich in CLA is the selection of raw materials with high CLA content and the preservation of their elevated CLA levels during fermentation. The main natural sources of CLA in human nutrition are, undisputedly, the products of ruminants, including their milk, meat and adipose tissue. The enzymatic processes responsible for the formation of CLA proceed much more intensively in the tissues and organs of ruminants than those of monogastric animals. Vegetable oils usually contain only negligible amounts of CLA. In this section the CLA levels of raw materials and the factors affecting their formation are summarised.

4.3.1 Raw milk

The discovery of anti-carcinogenic properties of CLA (Pariza & Hargraves, 1985) and other biological activities led to the implementation of surveys in several countries to assess the CLA supply from food and daily intake of these fatty acids. Cows' milk fat proved to be one of the richest sources of CLA. The total CLA value of raw milk samples has been shown to extend over a wide range, from 2 to 37 mg/g CLA in fat (Jiang, Björck, Fondén, & Emanuelson, 1996; Lin, Boylston, Chang, Luedecke, & Schultz, 1995; Parodi, 1999; Stanton, Murphy, McGrath, & Devery, 2003). The main isomer, rumenic acid (*cis-9,trans-11* CLA), was reported to represent more than 80% of total CLA content (Chin, Liu, Storkson, Ha, & Pariza, 1992; Fritsche & Steinhart, 1998; Parodi, 1994). Precht and Molkentin (2000) determined the amount of CLA in 2110 milk samples originating from 14 European Union countries. The average value for *cis-9,trans-11* CLA was 7.6 mg/g in fatty acid methyl esters (FAME) and the extreme values were 1.3 and 18.9 mg/g, respectively. The *trans* 18:1, *trans* 18:2 and total *trans* fatty acid content was 36.7 mg/g (12.9–71.7 mg/g), 11.2 mg/g (3.0–20.4 mg/g) and 49.2 mg/g (17.1–87.0 mg/g), respectively. Surpassing values, i.e. 53.7 and 51.5 mg/g of fatty acids, were obtained for rumenic acid, respectively, by Shingfield et al. (2006) and Bell, Griinari, and Kennelly (2006). The large differences in CLA and vaccenic acid content of cows' milk fat can be attributed to several factors, of which the feeding regimen was noted to have a major influence (Wahle et al., 2004). These topics are discussed in detail in Section 4.4.

4.3.2 Meats and seafoods

Meats of ruminant origin have markedly higher CLA concentrations than those from monogastric animals (Chin, Liu, Storkson, et al., 1992). In addition, there can be significant variation in the CLA content of meat samples within the same ruminant species owing to factors such as feeding.

The highest amount of CLA was found in lamb and in beef (19.0 and 13.0 mg/g fat, respectively), and the published results on these two meats are almost overlapping. The CLA content of pork, rabbit, chicken and meat of horses is around 1 mg/g fat, while that of turkey is slightly higher. The difference in CLA content

between the meats of ruminants and nonruminants can reach one order of magnitude in some cases. Nevertheless, the lowest values for ruminants are very close to those of monogastric animals (Table 4.1). The main influencing factors are breed, feeding regimen, seasonal variations, production practices, part of the carcass and muscle type; moreover, large animal-to-animal variations have also been observed (Ma, Wierzbicki, Field, & Clandinin, 1999; Raes et al., 2003; Shantha, Crum, & Decker, 1994). The tissues of ruminants are provided with higher amounts of CLA

Table 4.1 Total CLA content of meats and eggs

Products	CLA content (mg/g)	CLA content as:	References
Beef	13.0	Fat	Fogerty et al. (1988)
	3.7	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	3.1–8.5	Fat	Shantha et al. (1994)
	6.5	FAME	Fritsche and Steinhart (1998)
	3.6–6.2	Fat	Dufey (1999)
	1.2–3.0	Fat	Ma et al. (1999)
	2.7–5.6	FAME	Rule, Broughton, Shellito, and Maiorano (2002)
Veal	4.0–10.0	Fat	Raes et al. (2003)
	2.7	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
Lamb	14.9	Fat	Fogerty et al. (1988)
	12	FAME	Fritsche and Steinhart (1998)
	5.6	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	11.0	Fat	Dufey (1999)
	0.64–3.13	FAME	Mir, Rushfeldt, Mir, Paterson, and Weselake (2000)
	8.8–10.8	FAME	Wachira et al. (2002)
	4.32	Fat	Badiani et al. (2004)
	19.0	FAME	Knight, Knowles, Death, Cummings, and Muir (2004)
	1.2; 1.5	FAME	Fritsche and Steinhart (1998)
	1.4	Fat	Fogerty et al. (1988)
Pork	0.6	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	1.1	FAME	Fritsche and Steinhart (1998)
Rabbit	1.5	FAME	Fritsche and Steinhart (1998)
	1.8	Fat	Fogerty et al. (1988)
Chicken	0.9	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	0.7	FAME	Rule et al. (2002)
	2.5	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
Turkey	2.0	FAME	Fritsche and Steinhart (1998)
	0.6	Fat	Dufey (1999)
Horse	0.6	Fat	Fogerty et al. (1988)
Eggs	0–2.4	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	0.6	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	0.2 (yolk)	FAME	Fritsche and Steinhart (1998)

CLA, conjugated linoleic acid; FAME, fatty acid methyl esters.

for incorporation into glycerolipids than those of monogastric animals, if feeding conditions are appropriate. CLA and its precursors can also originate from microbiological synthesis in the rumen, and probably also other parts of the gastrointestinal tract, as well as from de novo synthesis in the mammary gland or other tissues, as was described in the Introduction. The main cause of variation within the products of one breed has been assigned to the differences in feeding regimens (Dufey, 1999; Parodi, 1994).

The CLA level of common marine foods proved to be lower than that of meats and raw milk. The total CLA content was measured to be approximately only 0.5 mg/g; moreover, the most abundant isomer in continental food products (*cis*-9,*trans*-11 CLA) was not detected in food of marine source (Chin, Liu, Strokson, et al., 1992). The CLA content of fishes varied from 0.1 (pike perch) to 0.9 mg/g (carp) (Fritsche & Steinhart, 1998).

4.3.3 Plant oils

Fatty acids with conjugated double bonds do occur in different seed oils, but CLA is often not found in oils from a number of plant species or its level is negligible in relation to dairy products. Some studies led to the conclusion that CLA contents of edible oils (olive, soybean, sunflower, refined or unrefined walnut, safflower, grapeseed, avocado, cashew and peanut oil, and coconut fat) and margarines are below 0.1 mg/g (Fogerty, Ford, & Svoronos, 1988; Fritsche & Steinhart, 1998), while other workers have found larger quantities of CLA in similar products. CLA was quantified in exotic oils originating from Brazil (Spitzer, Marx, Maia, & Pfeilsticker, 1991a, 1991b) and was also detected in low amounts in commercial edible oils (corn, peanut, soybean and palm oil) in Canada (Ackmann, Eaton, Sipos, & Crewe, 1981). Corn oil, olive oil and coconut fat were reported to contain approximately 0.2 mg/g CLA. In samples obtained from stores the *cis*-9,*trans*-11 CLA isomer accounted for 45% of the total amount of CLA, while corn oil processed in the laboratory did not have this isomer in detectable amounts. The total CLA content of the home-made corn oil was almost the same (0.2 mg/g), as in the case of the commercial product (Chin, Liu, Strokson, et al., 1992).

The observed differences in the CLA content of vegetable oils may suggest that isomer distribution and the amount of total CLA of plant oils can be notably influenced by processing conditions in which heat and/or chemical treatment are applied (Fritsche & Steinhart, 1998).

4.4 Factors influencing the CLA content of raw materials, and the effect of animal diet on CLA content of milk and meat

Several factors have already been observed that may influence the CLA content of animal products, i.e. animal genetics, production practices and seasonal variation.

The animal diet is probably the most important among these factors because it provides substrates for CLA formation (Wahle et al., 2004). Besides the intake of unsaturated fatty acid precursors, other characteristics of feeding may also be important, e.g. energy values and fibre content, the number of feedings per day and the form of the oil source (free or present in intact seeds or in crushed seeds, etc.). Owing to the formation mechanisms of CLA, the main target group is the group of ruminants, as feeding them with CLA precursors can lead to the formation of significant amounts of CLA in the rumen. By contrast, the products of monogastric animals could be efficiently enriched in CLA, if the feed itself contains CLA or vaccenic acid, as Δ^9 -desaturase reaction also occurs in nonruminants. As these feed additives are more expensive than oil seeds or vegetable oils, production of CLA-enriched meat with direct addition of CLA to the feed is questionable from an economic point of view.

Since the mid-1990s a large number of studies have repeatedly shown the advantage of pasture feeding over concentrate-based diet from the viewpoint of CLA content in ruminant products and also for other significant fatty acid parameters in the fat of these products, i.e. the n3/n6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) ratio and PUFA/saturated fatty acid ratio (see reviews by Collomb et al. (2006), Schmid, Collomb, Sieber, and Bee (2006), van Wijlen & Colombani (2010)). Seasonal variations have been observed in the CLA content of milk between winter and summer. These differences could be attributed to the change in diet: indoor winter feeding versus pasture feeding. A switch from concentrate-based diet to pasture increased the CLA content of milk (Dhiman, Helmink, McMahon, Fife, & Pariza, 1999; Kelly, Kolver, Bauman, van Amburgh, & Muller, 1998; Lock & Garnsworthy, 2003; Precht & Molkentin, 2000; Salamon, Varga-Visi, et al., 2009; Stanton et al., 1997). A possible explanation for these observations is that provision of increasing proportions of fresh green forage resulted in higher intake of PUFA, especially α -linolenic acid, which could be a possible precursor of *trans*-11 18:1 in the rumen, following subsequent desaturation to *cis*-9,*trans*-11 CLA in the mammary gland (Bauman, Corl, & Peterson, 2003). However, the enhanced PUFA intake alone cannot explain why the milk fat of cows fed fresh green forage had more CLA than milk fat from silage-fed cows (Elgersma, Tamminga, & Ellen, 2006). The lower “CLA-generating” effect of silages related to fresh grass may be attributed to changes in nutrients during the ensiling process, that is, the sugar and soluble fibre contents of the material decreases and thereby generates a different ruminal environment related to grasses (French et al., 2000; Schmid et al., 2006).

Pasture feeding has also been reported to exert an advantageous effect on the CLA content of the meat of ruminants. The amount of CLA in intramuscular fat of pasture-raised steers (French et al., 2000; Poulson, Dhiman, Ure, Cornforth, & Olson, 2004; Realini, Duckett, Brito, Dalla Rizza, & DeMattos, 2004), bulls and lambs (Aurousseau, Bauchart, Calichon, Micol, & Priolo, 2004; Nuernberg et al., 2004; Santos-Silva, Bessa, & Santos-Silva, 2002) was significantly higher than in those fed with concentrate diet. Grass silage enhanced the level of CLA in the *longissimus dorsi* muscle of steers, but to a lesser extent than fresh grass (French et al., 2000).

In summary, pasture feeding seems to be an effective tool to produce raw materials of outstanding biological value. However, with respect to CLA, its efficiency seems to

be a little higher for milk than for meat, as the CLA content of milk fat was observed to be higher than that achieved in the fat of ruminant meat (Woods & Fearon, 2009).

Following the discovery of the favourable properties of CLA, several attempts have been made to increase its level in animal products with the addition of different plant oils and marine oils. Studies conducted on the CLA enrichment of the milk and meat ruminants have been reviewed by Collomb et al. (2006) and Schmid et al. (2006), respectively. Several types of plant oils (sunflower, peanut, soybean, canola and linseed oil) were used successfully to achieve significant increase in the CLA content of milk. Sunflower oil was found to be more effective than peanut or linseed oil (Kelly, Berry, et al., 1998; Collomb, Sieber, & Bütikofer, 2004; Collomb, Sollberger, et al., 2004) and the use of soybean oil as a supplement also has been shown to be more advantageous than feeding linseed oil (Dhiman et al., 2000). The addition of fish oil was more effective than addition of plant oils (Chilliard, Ferlay, Mansbridge, & Doreau, 2000).

In the case of CLA-rich meat production, feed complemented with sunflower seed increased the CLA content of subcutaneous fat of bulls, while linseed and rapeseed seemed not to be efficient (Casutt et al., 2000). Linseed addition exerted only a minor influence on the CLA levels in the *longissimus dorsi* muscle in bulls (Stasiniewicz, Strzetelski, Kowalczyk, Osieglowski, & Pustkowiak, 2000; Strzetelski et al., 2001). Sunflower seed also increased the CLA content of the *longissimus thoracis* muscle of lambs (Santos-Silva, Bessa, & Mendes, 2003), and, contrary to most of the experiments carried out with bulls, Wachira et al. (2002) and Demirel, Wood, and Enser (2004) managed to increase the CLA content of the *longissimus dorsi* muscle of lambs with linseed feeding. Inclusion of other oilseeds in the diet also proved to be an effective tool to increase the CLA content of meat. Safflower seed in lambs (Bolte, Hess, Means, Moss, & Rule, 2002; Kott et al., 2003), extruded full-fat soybeans in steers (Madron et al., 2002) and whole crushed soybeans with crushed raw flax in bull calves (Aharoni, Orlov, & Brosh, 2004) proved to be efficient. Among vegetable oils, applied in the free form, sunflower oil can be used to increase CLA in the *longissimus* muscle of beef cattle (Mir et al., 2003; Mir et al., 2002) and heifers (Noci, O’Kiely, Monahan, Stanton, & Moloney, 2005), and intramuscular CLA content in lambs (Ivan et al., 2001). Conversely, rapeseed oil did not exert any positive effect on the *longissimus dorsi* muscle of beef cattle or lambs (Stasiniewicz et al., 2000; Strzetelski et al., 2001; Szumacher-Strabel, Potkanski, Cieslak, Kowalczyk, & Czauderna, 2001). Results regarding soybean oil were inconsistent, as the effective dose of this type of oil was observed to differ (Beaulieu, Drackley, & Merchen, 2002; Griswold et al., 2003; Santos-Silva, Mendes, Portugal, & Bessa, 2004). Using oil in the free form means that at higher doses the adverse effect of milk fat depression has to be considered. The CLA content of meat parts was affected differently by soybean oil addition (Griswold et al., 2003). This finding draws attention to the possibility that the same situation could have been observed in the case of the other oil sources if other parts of the body had been analysed. That is, CLA enrichment with feeding could lead to different results for different parts of the carcass.

Obviously, one cannot expect any effect on CLA content when ruminally protected lipid supplements were added in order to improve the energy balance of milking cows (Scollan, Enser, Gulati, Richardson, & Wood, 2003).

The CLA-enhancing effect of a given forage supplementation (e.g. sunflower seed or soybean) has been shown to be different for milk fat and for the lipids of meat. With the application of these feed additives, the increase in CLA content of the fat in meat was relatively lower than that of milk fat (Collomb, Sieber, & Bütikofer, 2004; Dhiman et al., 2000; Lawless, Murphy, Harrington, Devery, & Stanton, 1998). Similar advantages were reported for milk fat over meat fat when pasture feeding versus concentrate-based diet was applied (see earlier). These findings may refer to differences between formation of milk and meat lipids with respect to the intensity of Δ^9 -desaturase reaction or incorporation of CLA into glycerides.

The three main precursors for CLA formation in milk were denominated as oleic acid, linoleic acid and linolenic acid (Collomb et al., 2006). There were strong positive correlations between the intake of these fatty acids and the amount of several CLA isomers in milk fat (Collomb, Sieber, & Bütikofer, 2004). In part these relationships have been illuminated (Figure 4.1), but the biochemical explanations for many of them have not been completely revealed yet. The explanation of the mechanism of fish oil is also unclear. The direct formation via precursors is unlikely because these oils contain less linoleic and linolenic acids than plant oils, and long-chain PUFAs are not direct precursors of rumenic or vaccenic acid. However, supplementation of the diet with fish oil increased the amount of *trans*-11 18:1 leaving the rumen (Shingfield et al., 2003). One possible explanation may be the inhibitory effect of docosahexanoic acid (DHA, *cis*-4,*cis*-7,*cis*-10,*cis*-13,*cis*-16,*cis*-19 22:6), because DHA hampers the reduction of vaccenic acid to stearic acid in vitro (AbuGhazaleh & Jenkins, 2004). However, additional experiments are needed to provide an explanation.

The level of inclusion of oils is limited by milk fat depression, that is, the fat content of milk decreases if the free oil content of the feed exceeds a certain limit (Banks, Clapperton, Kelly, Wilson, & Crawford, 1980; Jenkins, 1993). The decrease of protein content of milk has also been reported (Grummer, 1988), as free oil being present in too high quantities in the rumen can hamper both fermentation and protein synthesis by microbiota. Therefore the limit of levels that can be applied for different oil sources should be considered. If oil sources are intact or seeds are only partially disintegrated, the rate of oil liberation is slower in the rumen and therefore milk fat depression can be avoided (DePeters, Taylor, Franke, & Aguirre, 1985; Dhiman et al., 2000; Mohamed, Satter, Grummer, & Ehle, 1988). Nevertheless, a rise in CLA level in products cannot be obtained without overflowing the rumen with fatty acid substrates, because high levels of these could prevent the completion of the biohydrogenation, and by-products rumenic and vaccenic acid may escape the rumen in significant amounts.

Besides the application of shortenings, other diet ingredients that influence the biohydrogenation process can also be applied. The last step of biohydrogenation, i.e. the reduction of oleic acid to stearic acid, can be hampered with increasing starch and decreasing fibre content in the diet (Gerson, Jihn, & King, 1985; Jiang et al., 1996; Kelly & Bauman, 1996; Palmquist & Schanbacher, 1991; Varga-Visi & Csapó, 2003). Moreover, some authors were led to the assumption that there may be synergism between the high-forage concentration and dietary supplementation with PUFA (Aharoni et al., 2004).

The frequency of feeding might also influence the CLA content of the product. However, Banks et al. (1980) found that the effect of feeding frequency on the vaccenic acid content of milk was minor.

One can come to the conclusion that feeding is a possible way to produce CLA-rich animal products, for example, raw materials for fermented milk and meat products with enhanced biological value. However, several factors have to be considered in order to avoid possible negative changes that may lower fat and protein content. Moreover, the CLA increment has been reported as a transient phenomenon, likely owing to the adaptation of microbiota. The CLA level of milk decreased after a few weeks following the administration of the experimental diet (Bauman, Barbano, Dwyer, & Griinari, 2000; Shingfield et al., 2006). Therefore, it is hard to imagine how to maintain the production of milk rich in CLA during the whole lactation period. In the case of meats of ruminants, the transient feature of the blocking of biohydrogenation can be resolved if these diets are applied in the finishing period. However, a more substantial increase in the CLA content of beef cattle has been reported when sunflower oil was added to both growing and finishing diets (Mir et al., 2002), that is, the transient feature of CLA increment may follow different patterns in the case of milk and meat fat, probably owing to the different mechanisms and speed of lipid incorporation. Nevertheless, in order to establish the appropriate feeding regimen, additional studies are needed to clarify the effect of elapsed time on the CLA content of fat in animal products.

4.5 CLA content of fermented food products

One may expect that the evaluation of factors having an effect on CLA level of processed food products is more difficult than doing the same for non-processed foods. Besides the factors influencing the CLA level of raw materials, food processing steps may also have significant effects on the level of these constituents. Fermentation and application of heating can change the CLA content of food originating from unprocessed raw materials.

4.5.1 Fermented milk products

The CLA content of milk products ranged from 4.6 to 7.1 in Sweden (Jiang, Björck, & Fondén, 1997), from 3.6 to 7.0 in the United States (Chin, Liu, Stroksan, et al., 1992; Ha, Grimm, & Pariza, 1989; Lin et al., 1995; Shantha, Decker, & Ustunol, 1992; Shantha, Ram, O'Leary, Hicks, & Decker, 1995) and from 4.0 to 11.7 in Germany (Fritsche & Steinhart, 1998). The magnitude of the differences in CLA content seems to be smaller for different milk products (Table 4.2) than for unprocessed milk.

Based on the data in Table 4.2 it can be seen that none of the groups of milk products contain notably more CLA than another, but values within a group can cover a wide range. In the case of cheeses, length of aging has been suggested as a possible factor of variance, as CLA level of Parmesan was measured to be higher than that of the other cheeses with shorter ripening periods (Ha et al., 1989). Moreover, hard cheeses with long aging time had higher CLA levels than hard cheeses with short maturation

Table 4.2 Total CLA content of fermented milk products and processed cheese

Products	CLA content (mg/g)	CLA content as:	References
Yogurt	6.9 ± 3.0	FAME	Fritzsche and Steinhart (1998)
	4.8	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	3.8	Fat	Lin et al. (1995)
	4.3 ± 1.3	Fat	Prandini, Sigolo, Tansini, Brogna, and Piva (2007)
Cheese	8.4 ± 3.8	FAME	Fritzsche and Steinhart (1998)
	5.0–7.1	Fat	Jiang et al. (1997)
	2.9–7.1	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
	5.1–5.4	Fat	Werner et al. (1992)
	4.0–4.9	Fat	Nunes and Torres (2010)
	3.9–8.1	Fat	Prandini et al. (2007)
	0.6–1.9	Product	Ha et al. (1989)
	5.0	Fat	Chin, Liu, Strokson, et al. (1992)
Processed cheese	3.2–8.9	Fat	Shantha et al. (1992)
	1.9–8.8	Product	Ha et al. (1989)

CLA, conjugated linoleic acid; FAME, fatty acid methyl esters.

time (Zlatanov, Laskaridis, Feist, & Sagredos, 2002). Another possible explanation for the observed differences is the use of different starter cultures. On a theoretical basis it could be assumed that Roquefort, blue cheese and Emmental cheese are possible candidates for an enhanced CLA level, owing to the strong lipolysis during ripening resulting in a high free fatty acid content, of which linoleic acid could be a good substrate for the formation of CLA by lactic acid bacteria and propionibacteria during ripening (Sieber, Collomb, Aeschlimann, Jelen, & Eyer, 2004). Nevertheless, studies in which the whole process of cheese making was monitored did not verify this assumption because there were only slight variations in the CLA content related to fat content during ripening (Jiang et al., 1997; Lin et al., 1995; Werner, Lueddecke, & Schultz, 1992) or when different starter cultures were used (Werner et al., 1992). Emmental cheese produced with strains of *Propionibacterium* sp. with different lipolytic activities gave almost the same results (Gnädig, 2002). In a comparative study conducted in Italy and France, the authors observed that the CLA content of cheeses produced from milk of the same ruminant species but with different technologies did not differ significantly (Prandini, Sigolo, & Piva, 2011). In a literature survey on the published

CLA results of cheeses between 1998 and 2011, no differences were found between the groups of hard, semi-hard, soft, mouldy and processed products (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2014). Analysing the total amount of CLA and that of the individual isomers during ripening of Spanish cheeses protected with designation of origin, the authors found that differences that can be attributed to ripening were negligible (Luna, Juárez, & de la Fuente, 2007). Pasteurisation and ripening did not change the sum of CLA significantly in Pecorino Toscano (protected denomination of origin) cheese made from sheep milk (Buccioni et al., 2010); however, contrary to the observation of the previous group, significant differences have been observed in the distribution of the isomers.

The CLA content of dairy products is largely dependent on the CLA content of the milk from which they originate. Processing appears to have either no or only little effect on the amount of CLA in the final product (Wahle et al., 2004). However, heat processing of cheeses seems to be an exception, causing an increase in the CLA content. The level of increase was more pronounced when whey protein concentrate was added before heating, and, parallel with the increment, the ratio of *cis*-9,*trans*-11 CLA has been reported to remain the same (Ha et al., 1989; Shantha et al., 1992). The presence or absence of oxygen may also exert an effect on CLA during this process, as cheddar cheese following processing at 90 °C had 10% higher levels of CLA than before heating, while the same treatment in nitrogen atmosphere caused no change in the CLA level of the product (Shantha et al., 1992). This finding may support the hypothesis that heat accelerates the autooxidation of linoleic acid and therefore the formation of conjugated positional isomers.

Another possible means of formation of CLA is via enzymatic processes of fermentation. Elevated CLA levels were reported several times in fermented milk products related to raw milk (Aneja & Murthy, 1990; Jiang et al., 1997; Shantha, Ram, O'Leary, Hicks, & Decker, 1995), whereas others found no differences (Boylston & Beitz, 2002; Lin et al., 1995; Shantha et al., 1995) in fat basis. However, it seems that commercially used dairy starter bacteria have only a minor contribution to the CLA level of the fermented product (Salamon, Lóki, Csapó-Kiss, & Csapó, 2009; Sieber et al., 2004), while the use of suitable strains may lead to favourable results.

4.5.2 Dairy-based functional foods

The inclusion of certain microbial cultures in the fermentation during food processing may result in health benefits of the product and therefore can lead to functional attributes. The key functions of the body can be beneficially affected by the delivery of probiotics or alteration of biotransformation reactions during fermentation, including the elimination of unwanted compounds, formation of health-beneficial molecules or enhancement of their bioavailability (van Hylckama Vlieg, Veiga, Zhang, Derrien, & Zhao, 2011; Stanton, Ross, Fitzgerald, & Van Sinderen, 2005).

The improvement of the CLA supply of humans can be achieved via CLA-producing strains. Formation of CLA can be accomplished during the preparation of the food product via dairy cultures, but this process could also be amplified in the human gastrointestinal tract with the administration of probiotics. Recently, a number of

bacteria have been proved to form CLA, including strains of lactobacilli, bifidobacteria, propionibacteria, pediococci, enterococci, streptococci and lactococci (Hennessy, Ross, Stanton, Devery, & Murphy, 2007; Oh et al., 2003; Owaga et al., 2005). The CLA-producing capacity of these strains using different growth media, skim milk and whole milk was reviewed by Sieber et al. (2004). The CLA formation follows similar mechanisms as in the case of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* via the action of linoleic acid isomerase (Lin, Lin, & Wang, 2002), while the CLA metabolism may differ among strains.

CLA formation intensity of strains, as in the case of the other metabolites, is influenced by external conditions as well as by genetic traits. Optimization of fermentation to achieve the highest yield and to maintain this level, as far as possible, until the product is consumed is an indispensable task when CLA-enriched fermented functional foods are to be produced. In the late 1990s Lin, Lin, and Lee (1999) discovered that addition of linoleic acid significantly increased the CLA content of skim milk incubated with six lactic cultures, while incubation with cultures without the inclusion of linoleic acid did not result any changes in the CLA level of the fermented product. In a later experiment, addition of linoleic acid did not increase the amount of CLA when yogurt was fermented by the commercial starter culture alone (Xu, Boylston, & Glatz, 2005) but did enhance the CLA level of yogurt when the starter culture was applied together with probiotic strains.

Kim and Liu (2002) concluded that the CLA production of *Lactococcus lactis* I-01 in milk depends on several factors, i.e. substrate (sunflower oil) concentration, pH, incubation time and culture conditions. When sunflower oil was added initially, growing cells produced more CLA than cells in the stationary phase; however, stationary cells were capable of producing more CLA when sunflower oil was added shortly before the end of the incubation period.

The dose dependence of the addition of sunflower oil on the CLA content of fermented milk was evaluated by Salamon, Lóki, Varga-Visi, Mándoki, and Csapó (2009). Two stains of lactobacilli produced the maximum amount of CLA when 100–150 µl sunflower oil was added to 100 cm³ milk. The authors observed a severe decline in CLA when addition exceeded the “200 µl/100 cm³” value. In the samples fermented by *Lactobacillus plantarum* the CLA level dropped to the level of raw milk when 400 µl or more oil was added, while for *Lactobacillus acidophilus* significantly lower CLA levels were measured than those of the initial material when 600 µl or more sunflower oil was added to 100 cm³ milk. A promising candidate for CLA formation, when rigorous optimization of CLA addition may not be required, is *Lactobacillus casei*. Using this species for fermentation, the level of CLA also increased significantly when sunflower oil was added; nevertheless, dose-dependent decline was not observed in the case of this strain.

Lin (2003) reported that mixed cultures of *L. acidophilus* CCRC 14079 and yogurt bacteria (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) significantly enhanced the CLA content of nonfat set yogurt when linoleic acid alone or linoleic acid and fructo-oligosaccharides were added. Obviously, the inclusion of fructo-oligosaccharides alone did not prove to be an effective tool for the enhancement of CLA level in yogurts, but the application of these prebiotics

together with the probiotic bacteria *L. acidophilus* (La-5) and *Bifidobacterium animalis* resulted in significantly higher levels of CLA. The level of CLA was higher when probiotic yogurt was prepared with the addition of fructo-oligosaccharides related to yogurt without prebiotics (Akalin et al., 2007). The influence of other commercially available polysaccharides such as maltodextrin, oligofructose and polydextrose was also studied on the CLA content of milks fermented by *S. thermophilus* and a strain of either *Lactobacillus* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Oliveira et al., 2009).

The latest trend is the addition of by-products from fruits to enhance the dietary fibre intake and to improve the viability of bacteria in yogurt. These fruit pulps are cheap and have complex ingredients, and may be valuable from both an economic and nutritional point of view. However, the application of these fruit materials in fermentation is a challenge because of their acidity and the antimicrobial compounds they may contain. do Espírito Santo et al. (2010) used açai pulp as a prebiotic to improve the fatty acid profile of yogurt. Later, the same research group investigated the use of total dietetic fibre prepared from apple, banana and passion fruit pressing by-products in the processing of probiotic yogurt and, among others, the fatty acid composition and counts of viable microorganisms were evaluated (do Espírito Santo et al., 2012). Different probiotic strains were used together with the traditional yogurt starter culture composed of *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The effect of probiotic strains on the CLA content was different, with moderate increase or about the same value as was observed for the control. Moreover, in the case of fermentation with *L. acidophilus* L10, the CLA content was significantly lower in yogurt than in the initial milk, that is, some part of CLA present in the raw milk was converted into other fatty acids. In fibre yogurts inclusion of passion fruit during fermentation enhanced the CLA level in all of the examined probiotic strains. The influence of the other types of total dietetic fibres was not uniform, but it also depended on the probiotic strain that was applied. Banana fibre had a negative effect on the CLA content of yogurt produced with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B104, B94 and HN019, but a positive effect was observed for *L. acidophilus* L10.

In cases where significant CLA formation can be achieved, it is very important to maintain its level until the product is consumed. The concentration of *cis*-9,*trans*-11 CLA remained at the same level until the 28th day of storage in probiotic yogurt at 4 °C but declined after 35 days, which was attributed to oxidative destruction of the conjugated double bond system (Akalin, Tokuşoğlu, Gönc, & Aycan, 2007). Some researchers also reported at least 1 week stability (Shantha et al., 1995; Boylston & Beitz, 2002) while others observed a slight decline during this period (Florence et al., 2012). The “storage stability” of isomers was reported to be different: while *cis*-9,*trans*-11 remained at its initial level, *trans*-10,*cis*-12 CLA declined rapidly and could not be detected in any yogurt after 35 days of storage (Akalin et al., 2007).

The cited findings verify that the advantage of higher CLA levels can also be included in the health-enhancing properties of probiotic yogurts in certain cases. The CLA content of the product can be increased by particular strains of probiotic bacteria if they are provided with adequate substrates such as linoleic acid, fructo-oligosaccharides or other prebiotics, or even fruit by-products. But one should be aware of the varying CLA-producing capability of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Bifidobacterium* species

and strains during fermentation of milk (Ekinci, Okur, Ertekin, & Guzel-Seydim, 2008; do Espírito Santo et al., 2010; do Espírito Santo et al., 2012; Oliveira et al., 2009). It depends to a great extent on the added prebiotics (do Espírito Santo et al., 2012); therefore, the appropriate selection of strains and substrates is an indispensable task. Moreover, the CLA level of each dairy product notably depends on that of the raw milk. The main factor that determined the CLA content of probiotic fermented milk products was the type of milk (organic and conventional) and not the fermentation conditions, i.e. the applied strains or duration of time (Florence et al., 2012), and the CLA content of raw milk was mainly influenced by the feeding of dairy ruminants.

4.5.3 Fermented meat products

Sparse data are available on the CLA content of meat products, and the reported values ranged from 0.8 to 6.6 mg CLA/g fat. Fermented meat products ranked in the upper middle part of this range, i.e. different types of sausages contained 3.3–4.4 mg CLA/g fat (Chin, Liu, Strokson, et al., 1992; Fritsche & Steinhart, 1998). The CLA content of commercial meat products was reported to be similar to that of the raw material, that is, fermentation and other processing steps did not exert an important effect on its level (Fritsche & Steinhart, 1998).

4.5.4 Functional meat products

Meat is a highly nutritious food with great potential for delivering very valuable nutrients such as fatty acids, minerals, antioxidants and bioactive peptides into the human diet. Consumers have a high degree of preference for its organoleptic properties, although its intake is associated with health risks (e.g. the elevated risk of cardiovascular diseases). Among other factors, the presence of nitrites and nitrates and its saturated fatty acid profiles have been attributed to health problems. The amount of these so-called “negative nutrients” can be decreased to some extent. Several attempts have been made to resolve this matter, among them modification of the fatty acid profile. Besides the enhancement of the ratio of unsaturated fatty acids and changing the omega 6/omega 3 ratio, fatty acids with health amelioration potential, i.e. CLA, were also at the centre of interest. The supplementation of meat with bioactive, health-preserving essential or non-essential ingredients can be accomplished by feed or postmortem modification (Decker & Park, 2010; Khan et al., 2011). Several studies have been conducted towards the production of CLA-enriched meat in which the forage of ruminants was complemented with vegetable oil, oilseed oil or fish oil, as described earlier in Section 4.4. Researchers also managed to increase the CLA content of pork by dietary supplementation of pigs with synthetic CLA (Bee, 2001; Eggert, Belury, Kempa-Steczko, Mills, & Schinckel, 2001; Joo, Lee, Ha, & Park, 2002; Lauridsen, Mu, & Henckel, 2005). Although synthetic CLA is more expensive than oil seeds or vegetable oils that can be applied in ruminants to achieve CLA increases in meat, in the present context the importance of this finding is enhanced by the fact that in the field of fermented meat products – in particular in Europe and North

America – pork as a raw material is much more important for sausages than the meat of ruminants (Leroy, Verluyten, & De Vuyst, 2006). These products with improved nutritional profiles can be categorized as functional foods, as their health-preserving and nutritive values exceed those of conventional products (Decker & Park, 2010).

On the one hand, fermented meat products can be enriched with CLA by the application of raw materials derived from animals reared with appropriate feeding techniques. On the other hand, synthetic CLA can be added to meats during processing. CLA has been added directly to pork patties (Joo, Lee, Hah, Ha, & Park, 2000) and beef patties (Chae, Keeton, & Smith, 2004; Hur et al., 2004) and injected into beef strip loin (Baublits et al., 2007). Similar addition could be practised during the production of fermented meat products. Another prospective avenue for the modification of CLA content might be the inclusion of CLA-forming strains in meat starters. As pork is the most important initial material for sausages and its CLA content is low, finding the appropriate strains for the enhancement of CLA via fermentation is a promising prospect.

Fermented sausages can be processed by co-fermentation of probiotics and commercial starter culture. Probiotic bacteria are usually applied in dry (fermented) sausages, which are prepared without the application of heat; therefore their presence in the product in appropriate numbers can enable them to exert desirable properties such as adherence, colonization, the production of antimicrobial substances, antagonism against pathogenic bacteria and immune modulation (Brassart & Schiffrin, 2000; Molly, Demeyer, Civera, & Verplaetse, 1996). However, the application of probiotic starter cultures in the production of functional meat products is still rare (Toldrá & Reig, 2011; Zhang, Xiao, Samaraweera, Lee, & Ahn, 2010). The application of probiotics in meat products that, besides the above effects, contribute to the improvement of the CLA supply of humans is a challenge for the future.

4.6 Health effects of CLA

CLA present in the fats of ruminants has been reported to have health amelioration potential. Its discovery is dated in 1979 when Pariza, Ashoor, Chu, and Lund (1979) discovered anti-mutagenic substances instead of mutagens in pan-fried beef burgers that inhibited the initiation of mouse epidermal tumours (Pariza & Hargraves, 1985) and were identified as CLA (Ha, Grimm, & Pariza, 1987). Nowadays, in general, numerous health benefits are attributed to CLA, encompassing the range of common diseases in Westernised populations such as cancer, diabetes and cardiovascular diseases. Positive effects on body composition, the immune system and bone health have also been observed (Jahreis, Kraft, Tischendorf, Schöne, & von Loeffelholz, 2000; Khanal, 2004; Kraft & Jahreis, 2004; Larsen, Toubro, & Astrup, 2003; Martin & Valeille, 2002; O'Shea, Bassaganya-Riera, & Mohede, 2004; Pariza, 2004; Terpstra, 2004; Wahle et al., 2004; Wang & Jones, 2004; Watkins, Li, Lippman, Reinwald, & Seifert, 2004). However, most experiments were carried out using animal trials and are not inevitably conclusive for humans; moreover, results obtained in many areas

of health-effect investigations are contradictory. Physiological actions of CLA have been shown to be isomer specific, and the two isomers that have most frequently been examined are rumenic acid (*cis*,9-*trans*,11 CLA) and *trans*-10,*cis*-12 CLA. Isomer distribution of natural food sources significantly differs from synthetic CLA supplementations. In food, rumenic acid dominates, accounting for approximately 90% of CLA intake in the diet (Mooney, McCarthy, & Belton, 2012), while *trans*-10,*cis*-12 CLA is present only in minor quantities. In synthetic supplements the amount of *trans*-10,*cis*-12 CLA may be significant (Or-Rashid et al., 2011; Park, 2009; Wahle et al., 2004). These facts should be considered when assessing the significance of CLAs impact on health.

The most frequently studied area within the health effects of CLA is probably carcinogenesis. Rumenic acid has been shown to have inhibitory properties in several kinds of cancer occurring in skin, breast, colon, liver, lung and kidney (Banni, Heys, & Wahle, 2003; Belury, 2002; Bhattacharya, Banu, Rahman, Causey, & Fernandes, 2006; Ip, Masso-Welch, & Ip, 2003; Kelley, Hubbard, & Erickson, 2007; Lee, Lee, Cho, & Kim, 2005; Parodi, 1994; Park, 2009). In most experiments animal cancer models were applied, and only a small number of human studies involving CLA have been reported. In some epidemiological studies inverse relationships were observed between milk consumption and incidence of breast cancer (Aro et al., 2000; Knekt, Jarvinen, Seppanen, Pukkala, & Aromaa, 1996), while others failed to detect any association between these factors (Chajes et al., 2002; Chajes et al., 2003; Larsson, Bergkvist, & Wolk, 2009; McCann et al., 2004; Moorman & Terry, 2004; Rissanen, Knekt, Jarvinen, Salminen, & Hakulinen, 2003; Voorrips et al., 2002). In one study, milk consumption was assessed as having an adverse effect, increasing the risk of breast cancer (Talamini et al., 1984). It is assumed that CLA can influence the initiation, promotion and progression of cancer. The effect of CLA on these three steps of carcinogenesis may also depend on the type of isomer and the type and site of the cell or organ (Lee et al., 2005). CLA incorporates phospholipids into the membrane; thus, cell metabolism and signal transduction may be modified in several ways: influence on eicosanoid synthesis, regulation of gene expression, modulation of antioxidative mechanisms, cell proliferation and apoptosis (Kraft & Jahreis, 2004).

Observations in animal trials pointed out that differences exist between mammalian species regarding their response to CLA. It can be assumed that not all the impacts that were proved for animals also pertain to humans (Wahle et al., 2004). In order to clarify the effect of dietary CLA intake on the process of human carcinogenesis, more clinical studies are needed.

The anti-diabetic effect of CLA may depend on both species and types of isomer. Rumenic acid seemed to be inactive (Martin & Valeille, 2002), but the role of *trans*-10,*cis*-12 isomer is controversial: some studies verified decreasing glucose levels and increased insulin sensitivity with increased intake of *trans*-10,*cis*-12 CLA (see the review by Khanal, 2004), while others reported opposite effects – that is, the promotion of insulin resistance (Khanal, 2004; Moloney, Yeow, Mullen, Nolan, & Roche, 2004; Wang & Jones, 2004).

Several human studies were conducted in order to assess the effect of dietary CLA on blood parameters for cardiovascular diseases. In most experiments there were no

changes found regarding low-density lipoprotein, triacylglycerol and cholesterol content in blood by CLA, while some studies led to negative conclusions as enhanced CLA intake decreased high-density lipoprotein, associated with negative health impact (see the review by Park, 2009). In rodents CLA was shown to exert a positive effect on blood parameters by lowering serum cholesterol and triacylglycerol concentrations (Lock, Horne, Bauman, & Salter, 2005). The anti-atherogenic effect of CLA is also a controversial issue. The severity of cholesterol-induced atherosclerotic lesions was reduced with increasing doses of fed CLA in rabbits (Kritchevsky, Tepper, Wright, & Czarnecki, 2002; Kritchevsky, Tepper, Wright, Tso, & Czarnecki, 2000), while CLA also induced regression of pre-established atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice (Toomey, Harhen, Roche, Fitzgerald, & Belton, 2006; Toomey, Roche, Fitzgerald, & Belton, 2003). However, other workers either did not observe any amelioration of fatty streak lesions (Lee, Kritchevsky, & Pariza, 1994) or found CLA having a downright potential pro-atherogenic effect (Munday, Thompson, & James, 1999). Current studies focus on the cellular targets and mechanisms through which CLA exerts its effects regarding atherogenesis. In the context of atherosclerosis, the influence of CLA on smooth muscle and endothelial cells was comprehensively examined by Eder and Ringseis (2010), while the results of in vitro studies regarding functionality of monocytes and macrophages were reviewed by Mooney et al. (2012).

Animal trials with ad libitum dietary regimens strongly supported the observation that inclusion of CLA in the diet lowers the body weight and the fat mass while increasing the lean body mass (see the review by Roche, Noone, Nugent, and Gibney (2001), Collomb et al. (2006)). Human studies, however, did not prove such strong evidence of the weight loss and body fat reduction-inducing effects of CLA (Bhattacharya et al., 2006; Park & Pariza, 2007; Terpstra, 2004; Wang & Jones, 2004). Trying to resolve this contradiction, Park (2009) observed that CLA in animal trials that were carried out using diet resulting in a negative energy balance proved to be ineffective on body weight or body fat, similar to human studies in which calorie restriction was applied, suggesting that CLA may be effective in cases of positive energy balance in the reduction of the ratio of fat within weight gain. The body composition effect of CLA has been attributed to *trans*-10,*cis*-12 CLA, while *cis*-9,*trans*-11 CLA isomer seems to be neutral (Martin & Valeille, 2002; Terpstra, 2004). The possible mechanism by which CLA reduces adiposity was recently reviewed by Kennedy et al. (2010).

The enumeration of possible effects of CLA on human health has not been completed yet. CLA intake may have an influence on bone mass. The mechanism of this action, however, is unambiguous (see the review by Park (2009)). Another possibility is the utilization of the impact of CLA on inflammation and immune function for asthma therapy (MacRedmond & Dorscheid, 2011).

4.7 Future trends

Producing food enriched in CLA can be accomplished with appropriate feeding regimens; however, to achieve this purpose, several factors have to be considered in order to avoid negative changes to other parameters of the product – for instance, reducing

the fat and protein content of milk. Moreover, the time-dependent accumulation of CLA in the fats of ruminants by feeding is not completely clarified. Thus, future research is needed to study the pattern of this phenomenon for each animal product.

Fermentation with commercial starter cultures has been shown to result in only a minor contribution to the CLA level of food items, though some strains of lactobacilli, bifidobacteria, propionibacteria, pediococci, enterococci, streptococci and lactococci can produce CLA if external conditions are appropriate. Some probiotic strains are also capable of forming CLA, while the presence of prebiotics can also influence CLA formation. The main challenges are the development of complete product recipes through which significant increase of CLA may occur by fermentation while maintaining the level of CLA until the product is consumed. This area may be a promising future approach, especially for fermented meat products, as the CLA content of pork – being an important raw material – is very low. Therefore, finding appropriate strains to enhance the CLA level during ripening would be a worthwhile task.

CLA participates in or influences several cellular mechanisms in the microworld of the body, resulting in varying effects with encouraging results. However, it has to be considered that these fatty acids cannot be regarded as a general panacea; their applicability in health preservation or amelioration depends on several factors, among which the most important are probably the type of the isomer, the differences between species and initial state of health. Changes in health status are the result of multiple mechanisms. The elucidation of the exact means of action of CLA beyond the observed phenomena might help us to resolve the contradictory results of experiments that were observed in cases of several health effects, and present an opportunity to determine the suitable diet for therapy and prevention of different diseases.

References

- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2014). Conjugated linoleic acid and vaccenic acid contents in cheeses: an overview from the literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 117–126.
- AbuGhazaleh, A. A., & Jenkins, T. C. (2004). Short communication: docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 87, 1047–1050.
- Ackmann, R. G., Eaton, C. A., Sipos, J. C., & Crewe, N. F. (1981). Origin of cis-9,trans-11 and trans-9,trans-11-octadecadienoic acids in the depot fat of primates fed a diet rich lard and corn oil and implications for the human diet. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, 14, 103–107.
- Aharony, Y., Orlov, A., & Brosh, A. (2004). Effects of high-forage content and oilseed supplementation of fattening diets on conjugated linoleic acid (CLA) and trans fatty acids profiles of beef lipid fractions. *Animal Feed Science and Technology*, 117, 43–60.
- Akalın, A. S., Tokuşoğlu, Ö., Gönc, S., & Aycan, Ş. (2007). Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*, 17, 1089–1095.
- Aneja, R. P., & Murthy, T. N. (1990). Conjugated linoleic acid contents of Indian curds and ghee. *Indian Journal of Dairy Science*, 43, 231–238.
- Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M. L., Kataja, V., & Uusitupa, M. (2000). Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutrition and Cancer*, 38, 151–157.
- Aurousseau, B., Bauchart, D., Calichon, E., Micol, D., & Priolo, A. (2004). Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the M. longissimus thoracis of lambs. *Meat Science*, 66, 531–541.
- Badiani, A., Montellato, L., Bochicchio, D., Anfossi, P., Zanardi, E., & Maranesi, M. (2004). Selected nutrient contents, fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, and retention values in separable lean from lamb rib loins as affected by external fat and cooking method. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 5187–5194.
- Banks, W., Clapperton, J. L., Kelly, M. E., Wilson, A. G., & Crawford, R. J. M. (1980). The yield, fatty acid composition and physical properties of milk fat obtained by feeding soya oil to dairy cows. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 31, 368–374.
- Banni, S., Heys, S. D., & Wahle, K. W. J. (2003). Conjugated linoleic acids as anticancer nutrients: studies in vivo and cellular mechanism. In J. L. Sébédio, W. W. Christie, & R. Adlof (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* Vol. 2 (pp. 267–282). Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- Baublits, R. T., Pohlman, F. W., Brown, A. H., Johnson, Z. B., Proctor, A., Sawyer, J., et al. (2007). Injection of conjugated linoleic acid into beef strip loins. *Meat Science*, 75, 84–93.
- Bauman, D. E., Barbano, D. M., Dwyer, D. A., & Griinari, J. M. (2000). Technical note: production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *Journal of Dairy Science*, 83, 2422–2425.
- Bauman, D. E., Baumgard, L. H., Corl, B. A., & Griinari, J. M. (2007). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Journal of Animal Science*, 77, 1–15.
- Bauman, D. E., Corl, B. A., & Peterson, G. P. (2003). The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. In J. L. Sébédio, W. W. Christie, & R. Adlof (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* Vol. 2 (pp. 146–173). Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- Beaulieu, A. D., Drackley, J. K., & Merchen, N. R. (2002). Concentrations of conjugated linoleic acid (cis-9,trans-11-octadecadienoic acid) are not increased in tissue lipids of cattle fed a high-concentrate diet supplemented with soybean oil. *Journal of Animal Science*, 80, 847–861.
- Bee, G. (2001). Dietary conjugated linoleic acids affect tissue lipid composition but not de novo lipogenesis in finishing pigs. *Animal Research*, 50, 383–399.
- Bell, J. A., Griinari, J. M., & Kennelly, J. J. (2006). Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 89, 733–748.
- Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22, 505–531.
- Bessa, R. J. B., Santos-Silva, J., Ribeiro, J. M. R., & Portugal, A. V. (2000). Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livestock Production Science*, 63, 201–211.
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 789–810.
- Bohte, M. R., Hess, B. W., Means, W. J., Moss, G. E., & Rule, D. C. (2002). Feeding lambs high-oleate or high-linoleate safflower seeds differentially influences carcass fatty acid composition. *Journal of Animal Science*, 80, 609–616.
- Boylston, T. D., & Beitz, D. C. (2002). Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *Journal of Food Science*, 67, 1973–1978.

- Brassart, D., & Schiffrin, E. J. (2000). Pre- and probiotics. In M. K. Schmidl, & T. P. Labuza (Eds.), *Essential of functional foods* (pp. 205–216). Gaithersburg MD: Aspen Publication.
- Buccioni, A., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., Minieri, S., Conte, G., & Mele, M. (2010). Conjugated linoleic acid and C18:1 isomers content in milk fat of sheep and their transfer to Pecorino Toscano cheese. *International Dairy Journal*, 20, 190–194.
- Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G., & Cabiddu, A. (2012). Lipid metabolism in the rumen: new insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, 174, 1–25.
- Casutt, M. M., Scheeder, M. R., Ossowski, D. A., Sutter, F., Sliwinski, B. J., Danilo, A. A., et al. (2000). Comparative evaluation of rumen-protected fat, coconut oil and various oil-seeds supplemented to fattening bulls. 2. Effects on composition and oxidative stability of adipose tissues. *Arch Tierernähr*, 53, 25–44.
- Chae, S. H., Keeton, J. T., & Smith, S. B. (2004). Conjugated linoleic acid reduces lipid oxidation in aerobically stored, cooked ground beef patties. *Journal of Food Science*, 69, 306–309.
- Chajes, V., Lavillonniere, F., Ferrari, P., Jourdan, M. L., Pinault, M., Maillard, V., et al. (2002). Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue is not associated with the relative risk of breast cancer in a population of French patients. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 11, 672–673.
- Chajes, V., Lavillonniere, F., Maillard, V., Giraudeau, B., Jourdan, M. L., Sebedio, J. L., et al. (2003). Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis. *Nutrition and Cancer*, 45, 17–23.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. M., & Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annual Zootechnolology*, 49, 181–205.
- Chin, S. F., Liu, W., Albright, K., & Pariza, M. W. (1992). Tissue levels of cis-9,trans-11 conjugated dienoic isomer of linoleic acid (CLA) in rats fed linoleic acid (LA). *Faseb Journal*, 6, A1396.
- Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L., & Pariza, M. W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognised class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 185–197.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D., & Ryhänen, E. L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. *International Dairy Journal*, 16, 1347–1361.
- Collomb, M., Sieber, R., & Bütikofer, U. (2004). CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids*, 39, 355–364.
- Collomb, M., Sollberger, H., Bütikofer, U., Sieber, R., Stoll, W., & Schaeren, W. (2004b). Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *International Dairy Journal*, 14, 549–559.
- Corl, B. A., Barbano, D. M., Bauman, D. E., & Ip, C. (2003). Cis-9, trans-11 CLA derived endogenously from trans-11 18:1 reduces cancer risk in rats. *Journal of Nutrition*, 133, 2893–2900.
- Corl, B. A., Baumgard, L. H., Griinari, J. M., Delmonte, P., Morehouse, K. M., Yurawecz, M. P., et al. (2002). Trans-7,cis-9 CLA is synthesized endogenously by $\Delta 9$ -desaturase in dairy cows. *Lipids*, 37, 681–688.
- Decker, E. A., & Park, Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat Science*, 86, 49–55.

- Demirel, G., Wood, J. D., & Enser, M. (2004). Conjugated linoleic acid content of the lamb muscle and liver fed different supplements. *Small Ruminant Research*, 53, 23–28.
- DePeters, E. J., Taylor, S. J., Franke, A. A., & Aguirre, A. (1985). Effects of feeding whole cottonseed on composition of milk. *Journal of Dairy Science*, 68, 897–902.
- Devillard, E., McIntosh, F. M., Duncan, S. H., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *Journal of Bacteriology*, 169, 2566–2570.
- Dhiman, T. R., Helmink, E. D., McMahon, D. J., Fife, R. L., & Pariza, M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *Journal of Dairy Science*, 82, 412–419.
- Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., & Tolosa, M. X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, 83, 1016–1027.
- do Espírito Santo, A. P., Cartolano, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S.M., Gioielli, L. A., Perego, P., et al. (2012). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal Food Microbiology*, 154, 135–144.
- do Espírito Santo, A. P., Silva, R. C., Soares, F. A. S.M., Anjos, D., Gioielli, L. A., & Oliveira, M. N. (2010). Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. *International Dairy Journal*, 20, 415–422.
- Dufey, P. A. (1999). Fleisch ist eine CLA-Nahrungsquelle. *Agrarforschung*, 6, 177–180.
- Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., & Kramer, J. K. G. (2004). Conjugated linoleic acid pork research. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1212–1216.
- Eder, K., & Ringseis, R. (2010). Metabolism and actions of conjugated linoleic acids on atherosclerosis-related events in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 17–36.
- Eggert, J. M., Belury, M. A., Kempa-Steczko, A., Mills, S. E., & Schinckel, A. P. (2001). Effects of conjugated linoleic acid on the belly firmness and fatty acid composition of genetically lean pigs. *Journal of Animal Science*, 79, 2866–2872.
- Ekinci, F. Y., Okur, O. D., Ertekin, B., & Guzel-Seydim, Z. (2008). Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 216–224.
- Elgersma, A., Tamminga, S., & Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 207–225.
- Florence, A. C. R., Béal, C., Silva, R. C., Bogsan, C. S. B., Pilleggi, A. L. O.S., Gioielli, L. A., et al. (2012). Fatty acid profile, trans-octadecenoic, α -linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. *Food Chemistry*, 135, 2207–2214.
- Fogerty, A. C., Ford, G. L., & Svoronos, D. (1988). Octadeca-9,11-dienoic acid in foodstuffs and in the lipids of human blood and breast milk. *Nutrition Reports International*, 38, 937–944.
- French, P., Stanton, C., Lawless, F., O’Riordan, E. G., Monahan, F. J., Caffrey, P. J., et al. (2000). Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *Journal of Animal Science*, 78, 2849–2855.
- Fritsche, J., & Steinhart, H. (1998). Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 206, 77–82.

Conjugated linoleic acid production in fermented foods

97

- Gerson, T., Jihn, A., & King, A. S. D. (1985). The effect of dietary starch and fibre on the in vitro rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *Journal of Agricultural Science*, 105, 27–30.
- Gläser, K. R., Wenk, C., & Scheeder, M. R. (2002). Effects of feeding pigs increasing levels of C18:1 trans fatty acids on fatty acid composition of backfat and intramuscular fat as well as backfat firmness. *Archives of Animal Nutrition*, 56, 117–130.
- Gnädig, S. (2002). **Conjugated linoleic acid (CLA): Effect of processing on CLA in cheese and the impact of CLA on the arachidonic acid metabolism** (thesis). University of Hamburg, 170pp.
- Griinari, J. M., & Bauman, D. E. (2006). Milk fat depression: concepts, mechanism and management application. In K. Sejrsen, T. Hvelplund, & M. O. Nielsen (Eds.), *Ruminant physiology digestion, metabolism and impact nutrition on gene expression, immunology and stress* (pp. 389–417). Amsterdam, Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Griinari, J. M., Chouinard, P. Y., & Bauman, D. E. (1997). Trans fatty acid hypothesis of milk fat depression revised. In *Proceedings of the Cornell nutrition conference for feed manufacturers* (pp. 208–216). Ithaca, NY: Cornell University.
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., & Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *Journal of Nutrition*, 130, 2285–2291.
- Griswold, K. E., Apgar, G. A., Robinson, R. A., Jacobson, B. N., Johnson, D., & Woody, H. D. (2003). Effectiveness of short-term feeding strategies for altering conjugated linoleic acid content of beef. *Journal of Animal Science*, 81, 1862–1871.
- Grummer, R. R. (1988). Influence of prilled fat and calcium salt of palm oil fatty acids on ruminal fermentation and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*, 71, 117–123.
- Ha, Y. L., Grimm, N. K., & Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8, 1881–1887.
- Ha, Y. L., Grimm, N. K., & Pariza, M. W. (1989). Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 37, 75–81.
- Harfoot, C. G., & Hazelwood, G. P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In P. M. Hobson (Ed.), *The rumen microbial ecosystem* (2nd ed.) (pp. 382–426). New York, USA: Elsevier.
- Hennessy, A. A., Ross, R. P., Stanton, C., Devery, R., & Murphy, J. J. (2007). Development of dairy based functional foods enriched in conjugated linoleic acid with special reference to rumenic acid. In M. Saarela (Ed.), *Functional dairy products* (pp. 443–494). New York, NY, USA: CRC Press.
- Hopkins, C. Y., & Chisholm, M. J. (1968). A survey of the conjugated fatty acids of seed oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 45, 176–182.
- Hughes, P. E., Hunter, W. J., & Tove, S. B. (1982). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9, trans-11-octadecadienoate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 3643–3649.
- Hur, S. J., Ye, B. W., Lee, J. L., Ha, Y. L., Park, G. B., & Joo, S. T. (2004). Effects of conjugated linoleic acid on color and lipid oxidation of beef patties during cold storage. *Meat Science*, 66, 771–775.
- van Hylckama Vlieg, J. E. T., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M., & Zhao, L. (2011). Impact of microbial transformation of food on health – from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 211–219.
- Ip, M. M., Masso-Welch, P. A., & Ip, C. (2003). Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of the stroma and the epithelium. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, 8, 103–118.

98

Advances in Fermented Foods and Beverages

- Ivan, M., Mir, P. S., Koenig, K. M., Rode, L. M., Neill, L., Entz, T., et al. (2001). Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Research*, 41, 215–227.
- Jahreis, G., Kraft, J., Tischendorf, F., Schöne, F., & von Loeffelholz, C. (2000). Conjugated linoleic acids: physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 695–703.
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76, 3851–3863.
- Jiang, J., Björck, L., & Fondén, R. (1997). 'Conjugated linoleic acid in swedish dairy products with special reference to the manufacture of hard cheeses. *International Dairy Journal*, 7, 863–867.
- Jiang, J., Björck, L., Fondén, R., & Emanuelson, M. (1996). Occurrence of conjugated cis-9,trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *Journal of Dairy Science*, 79, 438–445.
- Joo, S. T., Lee, J. I., Hah, K. H., Ha, Y. L., & Park, G. B. (2000). Effect of conjugated linoleic acid additives on quality characteristics of pork patties. *Korean Journal of Food Science Technology*, 32, 62–68.
- Joo, S. T., Lee, J. I., Ha, Y. L., & Park, G. B. (2002). Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition, lipid oxidation, color, and water-holding capacity of pork loin. *Journal of Animal Science*, 80, 108–112.
- Kay, J. K., Mackle, T. R., Auldist, M. J., Thomson, N. A., & Bauman, D. E. (2004). Endogenous synthesis of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *Journal of Dairy Science*, 87, 369–378.
- Kelley, N. S., Hubbard, N. E., & Erickson, K. L. (2007). Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *Journal of Nutrition*, 137, 2599–2607.
- Kelly, M. L., & Bauman, D. E. (1996). Conjugated linoleic acid: a potent anticarcinogen found in milk fat. *Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, 68–74. Rochester NY. (proceedings).
- Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Chouinard, P. Y., van Amburgh, M. E., et al. (1998). Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 128, 881–885.
- Kelly, M. L., Kolver, E. S., Bauman, D. E., van Amburgh, M. E., & Muller, L. D. (1998). Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 1630–1636.
- Kennedy, A., Martinez, K., Schmidt, S., Mandrup, S., LaPoint, K., & McIntosh, M. (2010). Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 171–179.
- Kepler, C. R., & Tove, S. B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. 3. Purification and properties of a linoleate $\Delta 12$ -cis, $\Delta 11$ -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 5686–5692.
- Khanal, R. C. (2004). Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 17, 1315–1328.
- Khan, M. I., Arshad, M. S., Anjum, F. M., Sameen, A., Aneeq-ur-Rehman, & Gill, W. T. (2011). Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International*, 44, 3125–3133.
- Kim, Y. J., & Liu, R. H. (2002). Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 67, 1731–1737.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Pukkala, E., & Aromaa, A. (1996). Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 73, 687–691.

- Knight, T. W., Knowles, S. O., Death, A. F., Cummings, T. L., & Muir, P. D. (2004). Conservation of conjugated linoleic, trans-vaccenic and long chain omega-3 fatty acid content in raw and cooked lamb from two cross-breeds. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 47, 129–135.
- Kott, R. W., Hatfield, P. G., Bergman, J. W., Flynn, C. R., Van Wagoner, H., & Boles, J. A. (2003). Feedlot performance, carcass composition, and muscle and fat, CLA concentrations of lambs fed diets supplemented with safflower seeds. *Small Ruminant Research*, 49, 11–17.
- Kraft, J., Collomb, M., Möckel, P., Sieber, R., & Jahreis, G. (2003). Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids*, 38, 657–664.
- Kraft, J., & Jahreis, G. (2004). Physiologische Wirkungen von konjugierten Linolsäuren. In M. Kreuzer, C. Wenk, & T. Lanzini (Eds.), *Lipide in Fleisch, Milch und Ei-Herausforderung für die Tierernährung* (pp. 81–93). ETH Zürich.
- Kraft, J., Collomb, M., Möckel, P., Sieber, R., & Jahreis, G. (2003). Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids*, 38, 657–664.
- Kraft, J., & Jahreis, G. (2004). Physiologische Wirkungen von konjugierten Linolsäuren. In M. Kreuzer, C. Wenk, & T. Lanzini (Eds.), *Lipide in Fleisch, Milch und Ei-Herausforderung für die Tierernährung* (pp. 81–93). ETH Zürich.
- Kramer, J. K. G., Cruz-Hernandez, C., Deng, Z., Zhou, J., Jahreis, G., & Dugan, M. E. R. (2004). Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 11375–11445.
- Kritchevsky, D., Tepper, S. A., Wright, S., & Czarnecki, S. K. (2002). Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutrition Research*, 22, 1275–1279.
- Kritchevsky, D., Tepper, S. A., Wright, S., Tso, P., & Czarnecki, S. K. (2000). Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *Journal of American College of Nutrition*, 19, 472S–477S.
- Larsen, T. M., Toubro, S., & Astrup, A. (2003). Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *Journal of Lipid Research*, 44, 2234–2241.
- Larsson, S. C., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2009). Conjugated linoleic acid intake and breast cancer risk in a prospective cohort of Swedish women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 556–560.
- Lauridsen, C., Mu, H., & Henckel, P. (2005). Influence of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and age at slaughtering on performance, slaughter- and meat quality, lipoproteins, and tissue deposition of CLA in barrows. *Meat Science*, 69, 393–399.
- Lawless, F., Murphy, J. J., Harrington, D., Devery, R., & Stanton, C. (1998). Elevation of conjugated cis-9,trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *Journal of Dairy Science*, 81, 3259–3267.
- Lee, K. N., Kritchevsky, D., & Pariza, M. W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 108, 19–25.
- Lee, K. W., Lee, H. J., Cho, H. Y., & Kim, Y. J. (2005). Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 135–144.
- Lerch, S., Shingfield, K. J., Ferlay, A., Vanhatalo, A., & Chilliard, Y. (2012). Rapeseed or linseed in grass-based diets: effects on conjugated linoleic and conjugated linolenic acid isomers in milk fat from Holstein cows over 2 consecutive lactations. *Journal of Dairy Science*, 95, 7269–7287.
- Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). 'Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270–285.

- Lin, T. Y. (2003). Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 11–14.
- Lin, H., Boylston, T. D., Chang, M. J., Luedecke, L. O., & Schultz, T. D. (1995). Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 78, 2358–2365.
- Lin, T. Y., Lin, C. W., & Lee, C. H. (1999). Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chemistry*, 67, 1–5.
- Lin, T. Y., Lin, C. W., & Wang, Y. J. (2002). Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Journal of Food Science*, 67, 1502–1505.
- Lock, A. L., & Garnsworthy, P. C. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*, 79, 47–59.
- Lock, A. L., Horne, C. A. M., Bauman, D. E., & Salter, A. M. (2005). Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *Journal of Nutrition*, 135, 1934–1939.
- Luna, P., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2007). Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin. *Food Chemistry*, 103, 1465–1472.
- MacRedmond, R., & Dorscheid, D. R. (2011). Conjugated linoleic acid (CLA): is it time to supplement asthma therapy? *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 24, 540–548.
- Madron, M. S., Peterson, D. G., Dwyer, D. A., Corl, B. A., Baumgard, L. H., Beermann, D. H., et al. (2002). Effect of extruded full-fat soybeans on conjugated linoleic acid content of intramuscular, intermuscular, and subcutaneous fat in beef steers. *Journal of Animal Science*, 80, 1135–1143.
- Martin, J. C., & Valeille, K. (2002). Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function? *Reproduction Nutrition Development*, 42, 525–536.
- Ma, D. W. L., Wierzbicki, A. A., Field, C. J., & Clandinin, M. T. (1999). Conjugated linoleic acid in Canadian dairy and beef products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 1956–1960.
- McCann, S. E., Ip, C., Ip, M. M., McGuire, M. K., Muti, P., Edge, S. B., et al. (2004). Dietary intake of conjugated linoleic acids and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer, Western New York exposures and breast cancer study (WEB Study). *Cancer Epidemiology Biomarkers*, 13, 1480–1484.
- McKain, N., Shingfield, K. J., & Wallace, R. J. (2010). Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiology*, 156, 579–588.
- Mir, P. S., McAllister, T. A., Zaman, S., Jones, S. D. M., He, M. L., Aalhus, J. L., et al. (2003). Effect of dietary sunflower oil and vitamin E on beef cattle performance, carcass characteristics and meat quality. *Canadian Journal of Animal Science*, 83, 53–66.
- Mir, P. S., Mir, Z., Kubert, P. S., Gaskins, C. T., Martin, E. L., Dodson, M. V., et al. (2002). Growth, carcass characteristics, muscle conjugated linoleic acid (CLA) content, and response to intravenous glucose challenge in high percentage Wagyu, Wagyu times Limousin, and Limousin steers fed sunflower oil-containing diet. *Journal of Animal Science*, 80, 2996–3004.
- Mir, Z., Rushfeldt, M. L., Mir, P. S., Paterson, L. J., & Weselake, R. J. (2000). Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Ruminant Research*, 36, 25–31.

Conjugated linoleic acid production in fermented foods

101

- Mohamed, O. E., Satter, L. D., Grummer, R. R., & Ehle, F. R. (1988). Influence of dietary cottonseed and soya bean on milk production and composition. *Journal of Dairy Science*, 71, 2677–2688.
- Molly, K., Demeyer, D., Civera, T., & Verplaetse, A. (1996). Lipolysis in a Belgian sausage: relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Science*, 43, 235–244.
- Moloney, F., Yeow, T., Mullen, A., Nolan, J. J., & Roche, H. M. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 887–895.
- Mooney, D., McCarthy, C., & Belton, O. (2012). Effects of conjugated linoleic acid isomers on monocyte, macrophage and foam cell phenotype in atherosclerosis. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 98, 56–62.
- Moorman, P. G., & Terry, P. D. (2004). Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 5–14.
- Mosley, E. E., Powell, G. L., Riley, M. B., & Jenkins, T. C. (2002). Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers in vitro. *Journal of Lipid Research*, 43, 290–296.
- Munday, J. S., Thompson, K. G., & James, K. A. C. (1999). Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *British Journal of Nutrition*, 81, 251–255.
- Noci, F., O’Kiely, P., Monahan, F. J., Stanton, C., & Moloney, A. P. (2005). Conjugated linoleic acid concentration in M. longissimus dorsi from heifers offered sunflower oil-based concentrates and conserved forages. *Meat Science*, 69, 509–518.
- Nuernberg, K., Dannenberger, D., Nuernberg, G., Scollan, N. D., Zupp, W., & Ender, K. (2004). Dietary effect on n-3 fatty acids, CLA and C18:1 trans isomers in beef and lamb meat. *Journal of Animal Science*, 82, 333–334.
- Nunes, J. C., & Torres, A. G. (2010). Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 782–789.
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., & Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 355–364.
- Oh, D. K., Hong, G. H., Lee, Y., Min, S., Sin, H. S., & Cho, S. K. (2003). Production of conjugated linoleic acid by isolated Bifidobacterium strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 907–912.
- Oliveira, R. P. S., Florence, A. C. R., Silva, R. C., Perego, P., Converti, A., Gioielli, L. A., et al. (2009). Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acid profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 467–472.
- Or-Rashid, M. M., AlZahal, O., & McBride, B. W. (2011). Comparative studies on the metabolism of linoleic acid by rumen bacteria, protozoa, and their mixture in vitro. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 387–395.
- O’Shea, M., Bassaganya-Riera, J., & Mohede, I. C. M. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1199S–1206S.
- Palmquist, D. L., & Schanbacher, F. L. (1991). Dietary fat composition influences fatty acid composition of milk fat globule membrane in lactating cows. *Lipids*, 26, 718–722.
- Pariza, M. W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1132S–1136S.
- Pariza, M. W., Ashoor, S. H., Chu, F. S., & Lund, D. B. (1979). Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letters*, 7, 63–69.

102

Advances in Fermented Foods and Beverages

- Pariza, M. W., & Hargraves, W. A. (1985). A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumours by 7,12 dimethylbenz(a)anthracene. *Carcinogenesis*, 6, 591–593.
- Park, Y. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): good or bad trans fat? *Journal of Food Composition and Analysis*, 22S, S4–S12.
- Park, Y., & Pariza, M. W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, 40, 311–40323.
- Parodi, P. W. (1994). Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Journal of Dairy Technology*, 49, 93–97.
- Parodi, P. W. (1999). Conjugated linoleic acid: the early years. In M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, & G. J. Nelson (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* Vol. 1 (pp. 1–11). Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- Piperova, L. S., Sampugna, J., Teter, B. B., Kalscheur, K. F., Yurawecz, M. P., Ku, Y., et al. (2002). Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 132, 1235–1241.
- Plourde, M., Destailats, F., Chouinard, P. Y., & Angers, P. (2007). Conjugated α -linolenic acid isomers in bovine milk and muscle. *Journal of Dairy Science*, 90, 5269–5275.
- Poulson, C. S., Dhiman, T. R., Ure, A. L., Cornforth, D., & Olson, K. C. (2004). Conjugated linoleic acid content of beef from cattle fed diets containing high grain, CLA, or raised on forages. *Livestock Production Science*, 91, 117–128.
- Prandini, A., Sigolo, S., & Piva, G. (2011). A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 55–61.
- Prandini, A., Sigolo, S., Tansini, G., Brogna, N., & Piva, G. (2007). Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 472–479.
- Precht, D., & Molkentin, J. (2000). Frequency distributions of conjugated linoleic acid and trans fatty acid contents in European bovine milk fats. *Milchwissenschaft*, 12, 687–691.
- Raes, K., Balcaen, A., Dirinck, P., De Winne, A., Claeys, E., Demeyer, D., et al. (2003). Meat quality, fatty acid composition and flavour analysis in Belgian retail beef. *Meat Science*, 65, 1237–1246.
- Raes, K., Fievez, V., Chow, T. T., Ansorena, D., Demeyer, D., & De, S. S. (2004). Effect of diet and dietary fatty acids on the transformation and incorporation of C18 fatty acids in double-muscled Belgian Blue young bulls. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 6035–6041.
- Realini, C. E., Duckett, S. K., Brito, G. W., Dalla Rizza, M., & DeMattos, D. (2004). Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Science*, 66, 567–577.
- Rissanen, H., Knekt, P., Jarvinen, R., Salminen, I., & Hakulinen, T. (2003). Serum fatty acids and breast cancer incidence. *Nutrition and Cancer*, 45, 168–175.
- Roche, H. M., Noone, E., Nugent, A., & Gibney, M. J. (2001). Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutr Res Reviews*, 14, 173–187.
- Rule, D. C., Broughton, K. S., Shellito, S. M., & Maiorano, G. (2002). Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk, and chicken. *Journal of Animal Science*, 80, 1202–1211.
- Salamon, R. V., Lóki, K., Csapó-Kiss, Zs., & Csapó, J. (2009). Changes in the fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of sour dairy products caused by pure cultures. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 2, 276–286.

Conjugated linoleic acid production in fermented foods

103

- Salamon, R. V., Lóki, K., Varga-Visi, É., Mándoki, Zs., & Csapó, J. (2009). Increase of conjugated linoleic acid content of dairy products by adding sunflower oil. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 2, 287–293.
- Salamon, R. V., Varga-Visi, É., Csapó-Kiss, Zs., Győri, A., Győri, Z., & Csapó, J. (2009). The influence of the season on the fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of the milk. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 2, 89–100.
- Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B., & Mendes, I. A. (2003). The effect of supplementation with expanded sunflower seed on carcass and meat quality of lambs raised on pasture. *Meat Science*, 65, 1301–1308.
- Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B., & Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77, 187–194.
- Santos-Silva, J., Mendes, I. A., Portugal, P. V., & Bessa, R. J. B. (2004). Effect of particle size and soybean oil supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs. *Livestock Production Science*, 90, 79–88.
- Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R., & Bee, G. (2006). Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Science*, 73, 29–41.
- Scollan, N. D., Enser, M., Gulati, S. K., Richardson, I., & Wood, J. D. (2003). Effects of including a ruminally protected lipid supplement in the diet on the fatty acid composition of beef muscle. *British Journal of Nutrition*, 90, 709–716.
- Shantha, N. C., Crum, A. D., & Decker, E. A. (1994). Evaluation of conjugated linoleic-acid concentrations in cooked beef. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 1757–1760.
- Shantha, N. C., Decker, E. A., & Ustunol, Z. (1992). Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *Journal of American Oil Chemical Society*, 69, 425–428.
- Shantha, N. C., Ram, L. N., O'Leary, J., Hicks, C. L., & Decker, E. A. (1995). Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *Journal of Food Science*, 60, 695–697.
- Shingfield, K. J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Arola, A., Nurmela, K. V. V., & Huhtanen, P. (2003). Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science*, 77, 165–179.
- Shingfield, K. J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., & Griinari, J. M. (2008). Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, 99, 971–983.
- Shingfield, K. J., Lee, M. R. F., Humphries, D. J., Scollan, N. D., Toivonen, V., Reynolds, C. K., et al. (2010). Effect of incremental amounts of fish oil in the diet on ruminal lipid metabolism in growing steers. *British Journal of Nutrition*, 104, 56–66.
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Hervas, G., Griinari, J. M., Grandison, A. S., & Beaver, D. E. (2006). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 714–732.
- Shorland, F. B., Weenink, R. O., & Johns, A. T. (1955). Effect of the rumen on the dietary fat. *Nature*, 175, 1129–1130.
- Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., & Eyer, H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. *International Dairy Journal*, 14, 1–15.
- Spitzer, V., Marx, F., Maia, J. G. S., & Pfeilsticker, K. (1991a). Identification of conjugated fatty acids in the seed oil of *Acioa edulis* (Prance) syn. *Coupeia edulis* (Chrysobalanaceae). *Journal of American Oil Chemical Society*, 68, 183–189.

104

Advances in Fermented Foods and Beverages

- Spitzer, V., Marx, F., Maia, J. G. S., & Pfeilsticker, K. (1991b). Occurrence of conjugated fatty acids in the seed oils of *Coupeia longipendula* (Chrysobalanaceae). *Journal of American Oil Chemical Society*, 68, 440–442.
- Stanton, C., Lawless, F., Kjellmer, G., Harrington, D., Devery, R., Connolly, J. F., et al. (1997). Dietary influences on bovine milk cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid content. *Journal of Food Science*, 62, 1083–1086.
- Stanton, C., Murphy, J., McGrath, E., & Devery, R. (2003). Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. In J. L. Sébédio, W. W. Christie, & R. Adlof (Eds.), *Advances in conjugated linoleic acid research* Vol. 2 (pp. 123–145). Champaign, IL, USA: AOAC Press.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198–203.
- Stasiniewicz, T., Strzetelski, J., Kowalczyk, J., Osiegowski, S., & Pustkowiak, H. (2000). Performance and meat quality of fattening bulls fed complete feed with rapeseed oil cake or linseed. *Journal of Animal Feed Sciences*, 9, 283–296.
- Strzetelski, J., Kowalczyk, J., Osiegowski, S., Stasiniewicz, T., Lipiarska, E., & Pustkowiak, H. (2001). Fattening bulls on maize silage and concentrate supplemented with vegetable oils. *Journal of Animal Feed Sciences*, 10, 259–271.
- Szumacher-Strabel, M., Potkanski, A., Cieslak, A., Kowalczyk, J., & Czauderna, M. (2001). The effects of different amounts and types of fat on the level of conjugated linoleic acid in the meat and milk of sheep. *Journal of Animal Feed Sciences*, 10, 103–108.
- Talamini, R., La Vecchia, C., Decarli, A., Franceschi, S., Grattoni, E., Grigoletto, E., et al. (1984). Social factors, diet and breast cancer in a northern Italian population. *British Journal of Cancer*, 49, 723–729.
- Terpstra, A. H. (2004). Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 352–361.
- Toldrá, F., & Reig, M. (2011). Innovations for healthier processed meats. *Trends in Food Science and Technology*, 22(9), 517–522.
- Toomey, S., Harhen, B., Roche, H. M., Fitzgerald, D., & Belton, O. (2006). Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis*, 187, 40–49.
- Toomey, S., Roche, H., Fitzgerald, D., & Belton, O. (2003). Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE^{−/−} mouse by conjugated linoleic acid. *Biochemical Society Transactions*, 31, 1075–1079.
- Varga-Visi, É., & Csapó, J. (2003). Increase of conjugated linoleic acid content of dairy food by feeding. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 68, 293–296.
- Voorrips, L. E., Brants, H. A., Kardinaal, A. F., Hiddink, G. J., van den Brandt, P. A., & Gold-bohm, R. A. (2002). Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 873–882.
- Wachira, A. M., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Enser, M., Wood, J. D., & Fisher, A. V. (2002). Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 88, 697–709.
- Wahle, K. W. J., Heys, S. D., & Rotondo, D. (2004). Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, 43, 553–587.
- Wang, Y. W., & Jones, P. J. H. (2004). Dietary conjugated linoleic acid and body composition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1153S–1158S.

Conjugated linoleic acid production in fermented foods

105

- Watkins, B. A., Li, Y., Lippman, H. E., Reinwald, S., & Seifert, M. F. (2004). A test of Ockham's razor: implications of conjugated linoleic acid in bone biology. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1175S–1185S.
- Werner, S. A., Luedecke, L. O., & Schultz, T. D. (1992). Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three cheddar-type cheeses: effects of cheese cultures, proceeding and aging. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 1817–1821.
- van Wijlen, R. P. J., & Colombani, P. C. (2010). Grass-based ruminant production methods and human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of conjugated linoleic acids. *International Dairy Journal*, 20, 433–448.
- Woods, V. B., & Fearon, A. M. (2009). Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: a review. *Livestock Science*, 126, 1–20.
- Xu, S., Boylston, T. D., & Glatz, B. A. (2005). Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 9064–9072.
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86, 15–31.
- Zlatanov, S., Laskaridis, K., Feist, C., & Sagredos, A. (2002). CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*, 78, 471–477.

Archaeometry 44, 3 (2002) 383–394. Printed in Great Britain

THE SURVIVAL OF ORGANIC MATTER IN BONE: A REVIEW

M. J. COLLINS, C. M. NIELSEN-MARSH, J. HILLER, C. I. SMITH and
J. P. ROBERTS

*Fossil Fuels and Environmental Geochemistry (Postgraduate Institute), NRG, Drummond Building,
University of Newcastle, Newcastle upon Tyne NE1 7RU, UK*

R. V. PRIGODICH

Chemistry Department, Trinity College, Hartford, CT 06106, USA

T. J. WESS

Department of Biological Sciences University of Stirling, Stirling FK9 4LA, Scotland, UK

J. CSAPÓ

Pannon Agricultural University, Faculty of Animal Sciences, Kaposvár, Hungary

A. R. MILLARD

Department of Archaeology, University of Durham, South Road, Durham DH1 3LE, UK

and G. TURNER-WALKER

Faculty of Medicine, Norwegian University of Science and Technology, N-7491, Trondheim, Norway

If bone is considered as a composite of collagen (protein) and bioapatite (mineral), then three pathways of diagenesis are identified: (1) chemical deterioration of the organic phase; (2) chemical deterioration of the mineral phase; and (3) (micro)biological attack of the composite. The first of these three pathways is relatively unusual and will only occur in environments that are geochemically stable for bone mineral. However, because rates of biomolecular deterioration in the burial environment are slow, such bones would yield useful biomolecular information. In most environments, bones are not in thermodynamic equilibrium with the soil solution, and undergo chemical deterioration (path 2). Dissolution of the mineral exposes collagen to biodeterioration, and in most cases the initial phase of dissolution will be followed by microbial attack (path 3). Biological attack (3) also proceeds by initial demineralization; therefore paths 2 and 3 are functionally equivalent. However, in a bone that follows path 3 the damage is more localized than in path 2, and regions equivalent to path 1 may therefore exist outside these zones of destruction.

Other biomolecules, such as blood proteins, cellular lipids and DNA, exist within the physiological spaces within bone. For these biomolecules, death history may be particularly important for their survival.

KEYWORDS: BONE DIAGENESIS, COLLAGEN, OSTEOCALCIN, DNA, RACEMIZATION, POROSITY, CHOLESTEROL

INTRODUCTION

The recovery of biochemical and radiometric data from bone has a long history (Hedges and Wallace 1978; Millard 1998; Collins *et al.* 1999), which continues to grow as new technical developments enable the recovery of a wider suite of biomolecules, including lipids (Stott *et al.* 1999) and most notably DNA (Donoghue *et al.* 1998; Poinar 1999). The key to successful retrieval of biomolecular information is an understanding of the mechanisms of biomolecular deterioration, and how these may impact upon survival. This review therefore focuses upon bone diagenesis and the impact that this has upon the survival of associated organic matter.

THE ORGANIZATION OF BONE

The first step to understanding the deterioration of bone organic matter is to understand its organization. Bone is a composite material, a form of mineralized collagen. It shares similarities with mineralized tendon, and the latter is often studied to investigate the process of mineralization (see, e.g., Landis *et al.* 1996). The two most abundant proteins within bone are Type I collagen and osteocalcin (also known as bone Gla protein). Collagen's abundance (22% by weight, 36% by volume of compact bone), its ease of isolation (Hedges and Law 1989) and its rate of turnover have made it an ideal material for isotopic analysis, both for ^{14}C dating (Hedges and Law 1989) and stable isotope analysis (Fogel *et al.* 1997). The particular advantage of bone collagen is that it is a highly repetitive insoluble protein. Although collagen is in potentially continuous exchange with the environment, careful sample preparation and screening (Van Klinken 1999) should be able to isolate uncontaminated protein.

The survival of protein in bone is surprising, given the latter's open nature and the ubiquity of soil micro-organisms (Child 1995). Collins *et al.* (1995) suggested that the collagen in bone is protected by the physical exclusion of microbial extracellular enzymes (see also Mayer 1994; Nielsen-Marsh *et al.* 2000). Despite the fact that the precise relationship between bone collagen and mineral is still debated (Glimcher 1990; Lee and Glimcher 1991; Traub *et al.* 1992; Landis 1996; Probst and Lees 1996; Fratzl *et al.* 1996; Weiner and Wagner 1998; Weiner *et al.* 1999), the association does appear to be sufficiently intimate to preclude penetration by extracellular enzymes (see Lees 1989).

Osteocalcin is the second most abundant bone protein, comprising 1–2% of the total (Hauschka 1980, 1986; Price 1983). Osteocalcin has a high affinity for bone mineral (Wians *et al.* 1983; Fujisawa and Kuboki 1991), and also binds to collagen (Prigodich and Vesely 1997). Mineral stabilization of the protein, which in solution lacks a stable conformation (Atkinson *et al.* 1995), is thought to be responsible for its persistence in bones under experimental conditions (Collins *et al.* 2000). The function of osteocalcin remains ambiguous. Mice that do not express the osteocalcin gene develop an apparently normal skeleton (Boskey *et al.* 1998); equally, its value to archaeology is unclear. It has been proposed as an alternative to collagen for dating (Ajie *et al.* 1990, 1991, 1992; Huq *et al.* 1990), although with questionable success (Taylor and Hare 1995). The small size and diagenetic stability of this molecule (imparted by its packaging in bone; Collins *et al.* 2000) is apparently ideal for exploiting the technology of proteomics to extend sequencing of biomolecules into deep time (Ostrom *et al.* 2000).

A number of other proteins have been reported from archaeological bone, including haemoglobin (Ascenzi *et al.* 1985; Smith and Wilson 1990; Tuross 1991), albumin (Lowenstein *et al.* 1981; Cattaneo *et al.* 1992a,b, 1999; Montgelard 1992) and alkaline phosphatase (Weser *et al.* 1996). Like DNA and lipids, these proteins will be associated with fluids and cellular components

in the tissue, and their presence and persistence in bone is more difficult to predict than collagen and osteocalcin.

MECHANISMS OF DETERIORATION

If we consider bone as an intimate composite of protein and mineral, then three alternative pathways of deterioration are possible: chemical deterioration of either (1) the organic fraction (primarily collagen) or (2) the bone mineral, or (3) biodegradation. The presence of organic molecules will passivate the mineral surface (Putnis and Putnis 1995), slowing the rate of mineral solution reaction (Kleter *et al.* 1994). Conversely, dissolution of the mineral phase will expose collagen to biodegradation (Krane 1975), thereby increasing the rate of its decomposition (Klont *et al.* 1991). These three pathways represent end-members, which are useful in terms of understanding the complex issues related to bone diagenesis. In different burial environments, one or other of these three processes may dominate.

Mechanism 1

Protein deterioration is not simply a *post mortem* phenomenon. Glycation reactions cause the collagen to become more brittle (Bailey *et al.* 1998). Bone fragility in later life is potentially compounded by an increase in porosity (Martin 1991; Thomas *et al.* 2000) and a decline in collagen mineralization (Bailey *et al.* 1999), but these relationships are not clear-cut (Wang *et al.* 1998, 2000; Zioupos *et al.* 1999). Damage to the collagen will lead to a change in organization (Miles *et al.* 2000) and ultimately to gelatinization and loss of collagen (Collins *et al.* 1995). The processes leave behind a mineral ghost containing very small (< 30 nm diameter), interconnected pores (Nielsen-Marsh and Hedges 1999). In well-preserved fossil (dinosaur) bones from the Judith River formation (Trueman and Nielsen-Marsh, unpublished data), this 'collagen ghost' porosity is typically absent, presumably due to infilling by secondary minerals, although some bones do retain their physiological porosity (canaliculi, Haversian canals and osteocyte lacunae). Pathway 1, namely the slow loss of collagen by chemical hydrolysis coupled with infilling of subsequent porosity, is presumably one of the key mechanisms leading to fossilization of bones.

The rate at which collagen is lost will depend upon time, temperature and environmental pH. At high temperatures, the rate of collagen loss will be accelerated and processes such as prolonged boiling (Roberts *et al.* 2002) will produce bones similar to those that have been chemically deproteinized; for example, with hydrazine hydrate (Nielsen-Marsh and Hedges 1999).

Extremes of pH can also cause collagen swelling and accelerate hydrolysis. Passage through the stomach of an animal is one such process known to lead to acid hydrolysis and this leaves tell-tale signs on the bone (Denys *et al.* 1995; Fernández-Jalvo *et al.* 2002). In the burial environment, Collins *et al.* (1995) assumed in their basic model of collagen degradation that extremes of pH would be mitigated by the mineral, which would act as a pH buffer. Collagen is particularly sensitive to alkali (Rudakova and Zaikov 1987), and although the thermodynamic data on many calcium phosphate phases at high pH are poorly understood, it is possible that acceleration of collagen hydrolysis is possible with extensive mineral alteration. The funerary practice of adding lime (CaO) or slaked lime (CaOH) to corpses would have the effect of elevating pH and potentially accelerating collagen loss. Conversely, decomposition of putrescible organic matter produces both organic acids and carbonate (Manning 2000), which could lead to reduced dissolution rates of apatite while still causing collagen to both hydrolyse and swell.

Mechanism 2

If bone in the burial environment lay far from thermodynamic equilibrium (White and Hannus 1983), then the kinetics of dissolution/re-precipitation will govern its fate. Bone mineral is in profound disequilibrium with rain water: therefore, in bones lying above or around the water table, the hydrology of the site will have a key role to play in survival (Hedges and Millard 1995; Pike *et al.* 2001; Hedges 2002). Mineral transformations will in turn expose the collagen to accelerated chemical and biological degradation. The conditions in which microbial and chemical deterioration will be retarded are the same as those used to preserve proteins (e.g., pickling, drying, freezing and tanning; Collins *et al.* 1998).

Mechanism 3

Microbial deterioration is probably the most common mechanism of bone deterioration (reviewed by Child 1995), and can occur rapidly after death (Yoshino *et al.* 1991; Bell *et al.* 1996). While chemical deterioration is accelerated at extremes of pH or by elevated temperature, microbial activity is optimized at near neutral pH—conditions which would otherwise protect bone.

In vivo bone remodelling and tooth caries share the same first fateful step—dissolution of the mineral phase by the production of low pH. Removal of the mineral permits access to the collagen by extracellular microbial enzymes, and thus microbial attack (and cellular remodelling) is in many respects functionally similar to the chemical dissolution mechanism described above. However, unlike the generalized chemical processes found in the burial environment, microbially mediated dissolution is focused in discrete zones of destruction, known collectively as microscopic focal destruction (Hackett 1981). Bell *et al.* (1991), Greenlee (1996) and others have used backscatter scanning electron microscopy (BSEM) to investigate microbial deterioration at higher magnifications. BSEM and microfocus small-angle X-ray scattering (Wess *et al.* 2001) reveal zones depleted in organic matter lying adjacent to hypermineralized regions containing large, disorganized crystallites.

Prior to death, the chemical disequilibrium of bone with supersaturated physiological fluids is maintained by the presence of circulating inhibitors (e.g., matrix Gla protein; Luo *et al.* 1997). At the other extreme lies archaeological bone, which slowly undergoes equilibration with the burial environment, the extent of disequilibrium and the rate of equilibration governing the state of the recovered bone. Bell *et al.* (1996) argued that the period between death and burial is probably the most critical phase in the diagenetic history of bone. Human bones may be subject to different funerary practices and forms of interment; butchery practices may include draining blood and stripping flesh from the bones; cooking will modify and accelerate deterioration. Indeed, in our experience the diagenetic transformations observed during boiling appear indistinguishable from those observed during certain types of diagenesis (Roberts *et al.* 2002). Species, age at death, cultural practices and mode of death will all play a part in moulding death history and shaping the pattern of diagenesis.

From the foregoing, the mechanisms of bone deterioration can be described by three fundamental pathways, each producing a macroscopic and microscopic alteration to the integrity of the bone. Each case will also influence the deterioration of those biomolecules that have an intimate relationship with bone. However, biomolecular deterioration still remains a largely unexplored aspect of bone diagenesis. In the following section, we attempt to highlight emerging themes and suggest possible areas for future study.

BIOMOLECULAR DETERIORATION

Collagen

Collagen loss, in the broadest sense, is the simplest transition to study, both because it is abundant in bone and because the phase transition from insoluble collagen to soluble (more biodegradable) gelatin will impact upon the physical properties of bone (Ziopoulos *et al.* 1999; Wang *et al.* 2000) and the survival of bone proteins. The presence of gelatin in bone is rare and is restricted to dry sites that prevent leaching (Kimber and Hare 1992; Iacumin *et al.* 1996). We therefore assume that the collagen/gelatin phase transition is the controlling step in ‘collagen’ survival (Collins *et al.* 1995). The transition is retarded by the presence of mineral (Kronick and Cooke 1996) and close packing of the fibrils (Miles and Ghelashvili 1999). It is accelerated by elevated temperature, extremes of pH, organic acids and damage to the collagen structure (Miles *et al.* 2000).

Broadly speaking, ‘collagen’ content in bone declines with time since deposition, and the loss of nitrogen (‘collagen’ representing >95% of the nitrogen in bones) has been used as a crude dating tool (Oakley 1980; Haddy and Hansen 1982). In fact, collagen degradation in bone begins during life (Bailey *et al.* 1998; Wang *et al.* 2000), with increasing numbers of cross-links leading to increased brittleness and fragility of the collagen molecule.

With the advent of routine extraction of collagen for radiocarbon dating, it is now possible, in laboratories that report collagen yields, to relate this to the archaeological age of the bone. The absence of a clear pattern emphasizes that other factors have important roles to play in collagen degradation (Collins *et al.* 1998).

All other things being equal, the thermal history of a sample (the integrated time–temperature history) is the key factor influencing survival. We have argued that despite variation in collagen yields between bones of the same thermal age, the integrity of surviving collagen will be the same (Collins *et al.* 1995; Nielsen-Marsh *et al.* 2000). The enzyme exclusion hypothesis argues that reduction of collagen content by microbial deterioration is due to localized mineral dissolution. Outside these localized zones of alteration, the collagen is undergoing chemical deterioration, governed primarily by time and temperature. The possibility of islands of unaltered bone within microbially deteriorated bone is an area that would benefit from further investigation (Bell *et al.* 2001).

Osteocalcin

The importance of mineral stabilization is most clearly illustrated in the case of osteocalcin. The high affinity of osteocalcin for the mineral phase ($K_{\text{assoc}} \approx 10^{-7} \text{ M}^{-1}$) parallels that of DNA. However, unlike DNA, osteocalcin is part of the architecture of bone itself. Using antibodies against different regions of the molecule, Collins *et al.* (2000) have recently demonstrated that it is the acidic-rich (mineral associated) region that persists in laboratory heating experiments and in the archaeological record (Collins *et al.* 1999, 2000). Mineral stabilization of osteocalcin is therefore clearly demonstrated, and survival of osteocalcin is most strongly related to mineral alteration.

Lipids

Despite some initial interest (Everts *et al.* 1968), the lipid fraction of archaeological and palaeontological bone has been somewhat overlooked. Evershed *et al.* (1995) carried out a revealing preliminary investigation of lipids extracted from archaeological and palaeontological

bone. In all cases, appreciable amounts of cholesterol could be found along with degradation products. Analysis of modern samples revealed significant amounts of cholesterol and acyl lipids in bone associated with marrow; however, the amount of acyl lipids was greatly diminished in samples extracted further from the marrow cavity. In the archaeological specimens analysed, only cholesterol and its diagenetic congeners were preserved. The cholesterol degradation products may yet reveal something about the taphonomic history of the bone; furthermore, cholesterol provides an interesting alternative to collagen as a possible substrate for stable isotopic analysis in palaeodietary studies (Stott and Evershed 1996; Stott *et al.* 1997, 1999).

DNA

Like collagen, DNA degradation is thought to proceed via reduction in chain length. Although hydrolysis appears to be the rate-determining step in both cases, the chemistry is slightly different. For DNA, the first step is believed to be depurination (itself accelerated by glycation of nucleobases; Seidel and Pischetsrieder 1998), which leads to destabilization of the phosphodiester bond of the backbone (Lindahl 1993). A further difference is the packaging of DNA (different for mitochondrial and nuclear DNA), which may predetermine the size of initial fragmentation.

A 'limit' on DNA survival of 100 000 years is often considered (Hoss 2000), but this is not a very helpful concept. 'Antediluvian' amplifications are from permafrost material which, although now proving a storehouse of ancient DNA (Pääbo 2000), hardly represents a typical suite of burial environments. There have been relatively few studies that have considered the importance of taphonomy (Hagelberg and Clegg 1991; Tuross 1994; Burger *et al.* 1999; Poinar *et al.* 1996; Cooper *et al.* 1997). In one of the earliest studies of this type, a mass Civil War grave failed to yield DNA while an older Saxon cemetery proved more reliable (Hagelberg *et al.* 1991). The Civil War bones had suffered from extensive microbial deterioration. This finding, and reports of the difficulty of amplifying relatively young materials (Cattaneo *et al.* 1997; Kolman and Tuross 2000) implicate death history (Bell *et al.* 1996) as a controlling factor in DNA survival.

The success of DNA amplification from permafrost samples does reinforce the view that the over-arching controls on long-term survival in optimal burial environments are time and temperature. Smith *et al.* (2001) have recently used the concept of thermal age to compare reports on the survival of ancient DNA amplification. In a (small) sample set, they found that there was a good relationship between DNA amplification success and age of the sample, if the thermal history of the site was taken into account.

The limits suggested by Smith *et al.* (2001)—approximately 20 000 years at a constant 10°C—probably paint an over-optimistic picture of DNA preservation in general, because many of the bones in the study came from caves. Caves appear to have a number of advantages in terms of bone survival: (1) temperature fluctuations within caves are heavily dampened, and (2) the stable, slightly alkaline pH of karstic caves probably represents an optimal environment for the stabilization of bone apatite (Weiner *et al.* 1993). As Trueman and Martill (2002) observe, fossil bones are much less biodeteriorated than archaeological bones. Bones of greater antiquity are self-selected to be well preserved; success with older bones does not necessarily imply that younger samples will also amplify.

DNA screening What then, in addition to temperature, will be good markers for DNA survival? Poinar *et al.* (1996) successfully demonstrated the use of the DL ratio of aspartic acid as a screening tool, and this has become widely adopted (see, e.g., Krings *et al.* 1997, 2000; Kumar *et al.* 2000). A very elegant version of this approach, which can measure DL ratios excluding induced racemization, has been used in the hunt for ancient DNA (Scholz *et al.*

2000). However, in proteins, aspartic acid racemization occurs predominantly via peptide bound aspartyl and asparagine residues (Geiger and Clarke 1987) and is strongly dependent upon both sequence and the rate of denaturation (Van Duin and Collins 1998; Collins *et al.* 1999). Consequently, it seems unlikely that the depurination kinetics will differ in the same fashion as Asx racemization in all tissues.

More recently, Poinar and Stankiewicz (1999) have suggested a second approach, the use of pyrolysis GC–MS. The method can detect peptide and DNA markers, but seems of questionable value, since the protein markers can as readily be estimated from the weight percent nitrogen or even the weight percent acid insoluble fraction of bone. The presence of DNA markers (notably of modified bases) would be useful if it were possible to distinguish contaminant from normal DNA. Colson *et al.* (1997) used a variety of simpler methods to screen bone. They found their best relationship to DNA survival was with bone histology. Combining histology with nitrogen would seem to improve this approach further because some bones possess good histology but no nitrogen (Jans *et al.* 2002).

A key test of any screening tool is that the character used in screening is sensitive to the same factors as the target molecule, DNA. One reason why this is not straightforward is that the location of DNA in bone remains unclear. Guarino *et al.* (2000) report the presence of DNA within the osteocyte lacunae of ancient bone from Pompeii. There is a large surface area of bioapatite within bone, which has the potential to adsorb DNA released from deteriorating physiological fluids. Götherström *et al.* (2002) report a negative correlation between DNA survival and mineral alteration; this suggests that the DNA may be stabilized by adsorption to the mineral surface.

Exogenous biomolecules

Bone not only provides a reservoir for the survival of biomolecules from the organism from which it was once part of, but also for organisms that may have caused disease or were involved in the *post mortem* decay processes. Entire bacterial forms, possibly of the genus *Clostridium*, have been observed under scanning electron microscopy within Mesolithic bone (Jackes *et al.* 2001). Their size is consistent with pore structures observed in microbial focal destruction (above).

Diploptene, most likely originating from sedimentary bacterial cell membranes, has been found in archaeological specimens (Evershed *et al.* 1995). Perhaps of more significance is the presence of specific mycolic acids, the remnants of *Mycobacterium tuberculosis* cell membranes (Gernaey *et al.* 2001), which may be diagnostic of tuberculosis. As well as bacterial lipids, it is possible that microbial DNA may survive (Hass *et al.* 2000); however, it remains unclear how bacterial DNA is 'packaged' within the bone. It may be that microbial DNA has increased chances of survival over endogenous DNA, if it is located within a thick lipid cell membrane (e.g., *Mycobacterium*) or even spores (e.g., *Clostridium*).

CONCLUSIONS

The persistence of bone in the burial environment is unusual, and the persistence of biomolecules in bone is more unusual still. Bone is a composite of bioapatite, collagen and osteocalcin. The survival of these three phases should be intimately related, but (at least in high-temperature heating experiments) osteocalcin, and specifically the Gla-containing region, persist well beyond the loss of all the collagen. Neither collagen nor osteocalcin behaves as it does in physiological solution, and in both cases mineralization increases stabilization. The reduction in conformational flexibility by physical restriction and adsorption must both play a role. Bone

as a composite can be destroyed by loss of the organic (collagen) phase, either by long-term, slow degradation, or accelerated deterioration caused by cooking or by conditions in the burial environment. This purely chemical degradation of collagen will produce bones with excellent histology that may be preserved over geological timescales if they can be stabilized by secondary mineral precipitation. At the other extreme, chemical dissolution of bone mineral will expose the protein to microbial attack, and unless unusual burial conditions prevent biodeterioration (to preserve an organic ghost) the bone will be lost. Microbial attack, which is by far the more complicated scenario, represents localized chemical dissolution followed by enzymatic attack of exposed organic matter. Parts of the bone unaffected by these zones of deterioration will retain intact biomolecules, whose fate is governed by predictable chemical deterioration. The microbial degradation of bone will also be strongly influenced by temperature and other parameters of the burial environment, including oxygen and water availability, and the presence of organic inhibitors of bacterial growth such as those found in bogs (Painter 1991).

The location and mechanisms of stabilization of other biomolecules such as DNA, lipids and blood/cellular proteins require further study. It therefore remains unclear to what extent their survival can be linked to those of the two main bone proteins, collagen and osteocalcin. They are probably much more sensitive to the microbial pathway of attack due to their presumed location in cells and fluids which form the interconnected physiological porosity of the bone.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out as part of an EU-funded investigation 'The Degradation of Bone as an Indicator in the Deterioration of the European Archaeological Property' (project no. ENV4-CT98-0712). ARM acknowledges support for the University of Durham Research Committee.

REFERENCES

- Ajje, H. O., Hauschka, P. V., Kaplan, I. R., and Sobel, H., 1991, Comparison of bone collagen and osteocalcin for determination of radiocarbon ages and paleodietary reconstruction, *Earth and Planetary Science Letters*, **107**, 380–8.
- Ajje, H. O., Kaplan, I. R., Slota, P. J., and Taylor, R. E., 1990, AMS radiocarbon dating of bone osteocalcin, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B—Beam Interactions with Materials and Atoms*, **52**, 433–7.
- Ajje, H. O., Kaplan, I. R., Hauschka, P. V., Kirner, D., Slota, P. J., and Taylor, R. E., 1992, Radiocarbon dating of bone osteocalcin—isolating and characterizing a noncollagen protein, *Radiocarbon*, **34**, 296–305.
- Ascenzi, A., Brunori, M., Citro, G., and Zito, R., 1985, Immunological detection of hemoglobin in bones of ancient Roman times and of Iron and Eneolithic ages, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **82**, 7170–2.
- Atkinson, R. A., Evans, J. S., Hauschka, P. V., Levine, B. A., Meats, R., Triffitt, J. T., Viridi, A. S., and Williams, R. J. P., 1995, Conformational studies of osteocalcin in solution, *European Journal of Biochemistry*, **232**, 515–21.
- Bailey, A. J., Paul, R. G., and Knott, L., 1998, Mechanisms of maturation and ageing of collagen, *Mechanisms of Ageing and Development*, **106**, 1–56.
- Bailey, A. J., Sims, T. J., Ebbesen, E. N., Mansell, J. P., Thomsen, J. S., and Mosekilde, L., 1999, Age-related changes in the biochemical properties of human cancellous bone collagen: relationship to bone strength, *Calcified Tissue International*, **65**, 203–10.
- Bell, L. S., Boyde, A., and Jones, S. J., 1991, Diagenetic alteration to teeth *in situ* illustrated by backscattered electron imaging, *Scanning*, **13**, 173–83.
- Bell, L. S., Cox, G., and Sealy, J., 2001, Determining isotopic life history trajectories using bone density fractionation and stable isotope measurements: a new approach, *American Journal of Physical Anthropology*, **116**, 66–79.
- Bell, L. S., Skinner, M. F., and Jones, S. J., 1996, The speed of *post mortem* change to the human skeleton and its taphonomic significance, *Forensic Science International*, **82**, 129–40.
- Boskey, A. L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S. B., Ducey, P., and Karsenty, G., 1998, Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin, *Bone*, **23**, 187–96.

- Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B., and Henke, W., 1999, DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis*, **20**, 1722–8.
- Cattaneo, C., Craig, O. E., James, N. T., and Sokol, R. J., 1997, Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences, *Journal of Forensic Sciences*, **42**, 1126–35.
- Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Phillips, P., and Sokol, R. J., 1992a, Detection of blood proteins in ancient human bone using ELISA: a comparative study of the survival of IgG and albumin, *International Journal of Osteoarchaeology*, **2**, 3103–7.
- Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Phillips, P., and Sokol, R. J., 1992b, Reliable identification of human albumin in ancient bone using ELISA and monoclonal-antibodies, *American Journal of Physical Anthropology*, **87**, 365–72.
- Cattaneo, C., DiMartino, S., Scali, S., Craig, O. E., Grandi, M., and Sokol, R. J., 1999, Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques, *Forensic Science International*, **102**, 181–91.
- Child, A. M., 1995, Towards an understanding of the decomposition of bone in the archaeological environment, *Journal of Archaeological Science*, **22**, 165–74.
- Collins, M. J., Waite, E. R., and van Duin, A. C. T., 1999, Predicting protein decomposition: the case of aspartic-acid racemization kinetics, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B—Biological Sciences*, **354**, 51–64.
- Collins, M. J., Walton, D., and King, A., 1998, The geochemical fate of proteins, *Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere*, **707**, 74–87.
- Collins, M. J., Riley, M., Child, A. M., and Turner-Walker, G., 1995, A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen, *Journal of Archaeological Science*, **22**, 175–83.
- Collins, M. J., Gernaey, A. M., Nielsen-Marsh, C. M., Vermeer, C., and Westbroek, P., 2000, Osteocalcin in fossil bones: evidence of very slow rates of decomposition from laboratory studies, *Geology*, **28**, 1139–42.
- Colson, I. B., Bailey, J. F., Vercauteren, M., and Sykes, B. C., 1997, The preservation of ancient DNA and bone diagenesis, *Ancient Biomolecules*, **1**, 109–17.
- Cooper, A., Poinar, H. N., Pääbo, S., Radovic, J., Debenath, A., Caparros, M., Barroso-Ruiz, C., Bertranpetit, J., Nielsen-Marsh, C., Hedges, R. E. M., and Sykes, B., 1997, Neanderthal genetics, *Science*, **277**, 1021–4.
- Denys, C., Fernández-Jalvo, Y., and Dauphin, Y., 1995, Experimental taphonomy: preliminary results of the digestion of micromammal bones in the laboratory, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, **321**, série II a, 803–9.
- Donoghue, H. D., Spigelman, M., Zias, J., Gernaey-Child, A. M., and Minnikin, D. E., 1998, Mycobacterium tuberculosis complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old, *Letters in Applied Microbiology*, **27**, 265–9.
- Evershed, R. P., Turner-Walker, G., Hedges, R. E. M., Tuross, N., and Leyden, A., 1995, Preliminary results for the analysis of lipids in ancient bone, *Journal of Archaeological Science*, **22**, 277–90.
- Everts, J. M., Dobrenz, A. R., and Wyckoff, R. W. G., 1968, Fatty acids in fossil bones, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **26**, 955–62.
- Fernández-Jalvo, Y., Sánchez-Chillón, B., Andrews, P., Fernández-López, S., and Alcalá Martínez, L., 2002, Morphological taphonomic transformations of fossil bones in continental environments, and repercussions on their chemical composition, *Archaeometry*, **44**, 353–62.
- Fogel, M. L., Tuross, N., Johnson, B. J., and Miller, G. H., 1997, Biogeochemical record of ancient humans, *Organic Geochemistry*, **27**, 275–87.
- Fratzl, P., Schreiber, S., and Klaushofer, K., 1996, Bone mineralization as studied by small-angle X-ray scattering, *Connective Tissue Research*, **35**, 9–16.
- Fujisawa, R., and Kuboki, Y., 1991, Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face of hydroxyapatite crystals, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1075**, 56–60.
- Geiger, T., and Clarke, S., 1987, Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation, *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 785–94.
- Gernaey, A. M., Minnikin, D. E., Copley, M. S., Dixon, R. A., Middleton, J. C., and Roberts, C. A., 2001, Mycolic acids and ancient DNA confirm an osteological diagnosis of tuberculosis, *Tuberculosis*, **81**, 259–65.
- Glimcher, M. J., 1990, The possible role of collagen fibrils and collagen–phosphoprotein complexes in the calcification of bone *in vitro* and *in vivo*, *Biomaterials*, **11** S, 7–10.
- Götherström, A., Collins, M. J., Angerbjörn, A., and Lidén, K., 2002, Bone preservation and DNA amplification, *Archaeometry*, **44**, 395–404.
- Greenlee, D. M., 1996, An electron microprobe evaluation of diagenetic alteration in archaeological bone, *Archaeological Chemistry*, **625**, 334–54.

- Guarino, F. M., Angelini, F., Odierna, G., Bianco, M. R., Di Bernardo, G., Forte, A., Cascino, A., and Cipollaro, M., 2000, Detection of DNA in ancient bones using histochemical methods, *Biotechnic and Histochemistry*, **75**, 110–17.
- Haas, C. J., Zink, A., Palfi, G., Szeimies, U., and Nerlich, A. G., 2000, Detection of leprosy in ancient human skeletal remains by molecular identification of *Mycobacterium leprae*, *American Journal of Clinical Pathology*, **114**, 428–36.
- Hackett, C. J., 1981, Microscopical focal destruction (tunnels)—in exhumed human bones, *Medicine, Science and the Law*, **21**, 243–65.
- Haddy, A., and Hansen, A., 1982, Nitrogen and fluorine dating of Moundville skeletal samples, *Archaeometry*, **24**, 37–44.
- Hagelberg, E., and Clegg, J. B., 1991, Isolation and characterization of DNA from archaeological bone, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B—Biological Sciences*, **244**, 45–50.
- Hagelberg, E. Bell, L. S., Allen, T., Boyde, A., Jones, S. J., and Clegg, J. B., 1991, Analysis of ancient bone DNA—techniques and applications, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B—Biological Sciences*, **333**, 399–407.
- Hauschka, P. V., 1980, Osteocalcin: a specific protein of bone with potential for fossil dating, in *Biogeochemistry of amino acids* (eds. P. E. Hare, T. C. Hoering and T. King Jr), 75–82, John Wiley, New York.
- Hauschka, P. V., 1986, Osteocalcin: the vitamin-K dependent Ca-binding protein of bone matrix, *Haemostasis*, **16**, 258–72.
- Hedges, R. E. M., 2002, Bone diagenesis: an overview of processes, *Archaeometry*, **44**, 319–28.
- Hedges, R. E. M., and Law, I. H., 1989, The radiocarbon dating of bone, *Applied Geochemistry*, **4**, 249–53.
- Hedges, R. E. M., and Millard, A. R., 1995, Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes, *Journal of Archaeological Science*, **22**, 155–64.
- Hedges, R. E. M., and Wallace, C. J. A., 1978, The survival of biochemical information in archaeological bone, *Journal of Archaeological Science*, **5**, 377–86.
- Hoss, M., 2000, Ancient DNA—Neanderthal population genetics, *Nature*, **404**, 453–4.
- Huq, N. L., Rambaud, S. M., Teh, L.-C., Davies, A. D., McCulloch, B., Trotter, M. M., and Chapman, G. E., 1990, Immunochemical detection and characterization of osteocalcin from Moa bone, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **129**, 714–20.
- Iacumin, P., Bocherens, H., Mariotti, A., and Longinelli, A., 1996, An isotopic palaeoenvironmental study of human skeletal remains from the Nile Valley, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **126**, 15–30.
- Jackes, M., Sherburne, R., Lubell, D., Barker, C., and Wayman, M., 2001, Destruction of microstructure in archaeological bone: a case study from Portugal, *International Journal of Osteoarchaeology*, **11**, 415–32.
- Jans, M. M. E., Kars, H., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Nord, A. G., Arthur, P., and Earl, N., 2002, *In situ* preservation of archaeological bone: a histological study within a multidisciplinary approach, *Archaeometry*, **44**, 343–52.
- Kimber, R. W. L., and Hare, P. E., 1992, Wide-range of racemization of amino-acids in peptides from human fossil bone and its implications for amino-acid racemization dating, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **56**, 739–43.
- Kleiter, G. A., Damen, J. J. M., Everts, V., Niehof, J., and Tencate, J. M., 1994, The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin *in vitro*, *Journal of Dental Research*, **73**, 1523–9.
- Klont, B., Damen, J. J. M., and ten Cate, J. M., 1991, Degradation of bovine incisor root collagen in an *in vitro* caries model, *Archives of Oral Biology*, **36**, 299–304.
- Kolman, C. J., and Tuross, N., 2000, Ancient DNA analysis of human populations, *American Journal of Physical Anthropology*, **111**, 5–23.
- Krane, S., 1975, Degradation of collagen in connective tissue diseases. Rheumatoid arthritis, in *Dynamics of connective tissue macromolecules* (eds. P. M. C. Burleigh and A. R. Poole), 309–26, North Holland, Amsterdam.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M., and Pääbo, S., 1997, Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans, *Cell*, **90**, 19–30.
- Krings, M., Capelli, C., Tschentscher, F., Geisert, H., Meyer, S., von Haeseler, A., Grossschmidt, K., Possnert, G., Paunovic, M., and Pääbo, S., 2000, A view of Neandertal genetic diversity, *Nature Genetics*, **26**, 144–6.
- Kronick, P. L., and Cooke, P., 1996, Thermal stabilization of collagen fibres by calcification, *Connective Tissue Research*, **33**, 275–82.
- Kumar, S. S., Nasidze, I., Walimbe, S. R., and Stoneking, M., 2000, Brief communication: Discouraging prospects for ancient DNA from India, *American Journal of Physical Anthropology*, **113**, 129–33.
- Landis, W. J., 1996, Mineral characterization in calcifying tissues: atomic, molecular and macromolecular perspectives, *Connective Tissue Research*, **35**, 1–8.
- Landis, W. J., Hodgins, K. J., Song, M. J., Arena, J., Kiyonaga, S., Marko, M., Owen, C., and McEwen, B. F., 1996, Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging, *Journal of Structural Biology*, **117**, 24–35.

- Lee, D. D., and Glimcher, M. J., 1991, Three dimensional spatial relationship between the collagen fibrils and the inorganic calcium phosphate crystals of pickerel (*Americanus americanus*) and herring (*Clupea harengus*) bone, *Journal of Molecular Biology*, **217**, 487–501.
- Lees, S., 1989, Sonic velocity and the ultrastructure of mineralised tissues, in *Calcified tissue* (ed. D. W. L. Hukins), 121–52, Macmillan Press, London.
- Lindahl, T., 1993, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, **362**, 709–15.
- Lowenstein, J. M., Sarich, V. M., and Richardson, B. J., 1981, Albumin systematics of the extinct mammoth and Tasmanian wolf, *Nature*, **291**, 1409–11.
- Luo, G., Ducey, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., and Karsenty, G., 1997, Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein, *Nature*, **386**, 78–81.
- Manning, D. A. C., 2000, Carbonates and oxalates in sediments and landfill: monitors of death and decay in natural and artificial systems, *Journal of the Geological Society*, **157**, 229–38.
- Martin, R. B., 1991, On the significance of remodeling space and activation rate changes in bone remodeling, *Bone*, **12**, 391–400.
- Mayer, L. M., 1994, Surface area control of organic carbon accumulation in continental shelf sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **58**, 1271–84.
- Miles, C. A., and Ghelashvili, M., 1999, Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers, *Biophysical Journal*, **76**, 3243–52.
- Miles, C. A., Sionkowska, A., Hulin, S. L., Sims, T. J., Avery, N. C., and Bailey, A. J., 2000, Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light, *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 33 014–20.
- Millard, A. R., 1998, Bone in the burial environment, in *Preserving archaeological remains in situ* (eds. M. Corfield, P. Hinton, T. Nixon and M. Pollard), 93–102, Museum of London Archaeology Service, London.
- Montgelard, C., 1992, Albumin preserved in fossil bones and systematics of *Malpaisolys insularis* (Muridae, Rodentia), an extinct rodent of the Canary Islands, *Historical Biology*, **6**, 293–302.
- Nielsen-Marsh, C. M., and Hedges, R. E. M., 1999, Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies, *Archaeometry*, **41**, 165–74.
- Nielsen-Marsh, C. M., Hedges, R. E. M., Mann, T., and Collins, M. J., 2000, A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone, *Thermochimica Acta*, **365**, 129–39.
- Oakley, K. P., 1980, Relative dating of the fossil hominids of Europe, *Bulletin of the British Museum of Natural History (Geology)*, **34**, 1–63.
- Ostrom, P. H., Schall, M., Gandhi, H., Shen, T. L., Hauschka, P. V., Strahler, J. R., and Gage, D. A., 2000, New strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **64**, 1043–50.
- Pääbo, S., 2000, Of bears, conservation genetics, and the value of time travel, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **97**, 1320–1.
- Painter, T. J., 1991, Lindow man, Tollund man and other peat-bog bodies: the preservative and antimicrobial action of sphagnum, a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties, *Carbohydrate Polymers*, **15**, 123–42.
- Pike, A., Nielsen-Marsh, C. M., and Hedges, R. E. M., 2001, Bone dissolution and hydrology, *Proceedings of Archaeological Sciences 1997*, British Archaeological Reports, Archaeopress, Oxford.
- Poinar, H. N., 1999, DNA from fossils: the past and the future, *Acta Paediatrica*, **88**, 133–40.
- Poinar, H. N., and Stankiewicz, B. A., 1999, Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 8426–31.
- Poinar, H. N., Hoss, M., Bada, J. L., and Pääbo, S., 1996, Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA, *Science*, **272**, 864–6.
- Price, P., 1983, Osteocalcin, *Journal of Bone and Mineral Research*, **1**, 157–90.
- Prigodich, R. V., and Vesely, M. R., 1997, Characterization of the complex between bovine osteocalcin and type I collagen, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **345**, 339–41.
- Prostak, K. S., and Lees, S., 1996, Visualization of crystal-matrix structure. *In situ* demineralization of mineralized turkey leg tendon and bone, *Calcified Tissue International*, **59**, 474–9.
- Putnis, A., and Putnis, C. V., 1995, The efficiency of a DTPA based solvent in the dissolution of barium sulfate scale deposits, *SPE International*, 773–85.
- Roberts, S. J., Smith, C. I., Millard, A., and Collins, M. J., 2002, The taphonomy of cooked bone: characterizing boiling and its physico-chemical effects, *Archaeometry*, **44**, 485–94.
- Rudakova, T. E., and Zaikov, G. E., 1987, Degradation of collagen and its possible applications in medicine, *Polymer Degradation and Stability*, **18**, 271–91.

- Scholz, M., Bachmann, L., Nicholson, G. J., Bachmann, J., Giddings, I., Ruschhoff-Thale, B., Czarnetzki, A., and Pusch, C. M., 2000, Genomic differentiation of Neanderthals and anatomically modern man allows a fossil-DNA-based classification of morphologically indistinguishable hominid bones, *American Journal of Human Genetics*, **66**, 1927–32.
- Seidel, W., and Pischetsrieder, M., 1998, DNA-glycation leads to depurination by the loss of N2-carboxyethylguanine *in vitro*, *Cellular and Molecular Biology*, **44**, 1165–70.
- Smith, C. I., Chamberlain, A. T., Riley, M. S., Cooper, A., Stringer, C. B., and Collins, M. J., 2001, Not just old, but old and cold, *Nature*, **410**, 771–2.
- Smith, P. R., and Wilson, M. T., 1990, Detection of haemoglobin in human skeletal remains by ELISA, *Journal of Archaeological Science*, **17**, 255–68.
- Stott, A. W., and Evershed, R. P., 1996, $\delta^{13}\text{C}$ analysis of cholesterol preserved in archaeological bones and teeth, *Analytical Chemistry*, **68**, 4402–8.
- Stott, A. W., Evershed, R. P., and Tuross, N., 1997, Compound-specific approach to the $\delta^{13}\text{C}$ analysis of cholesterol in fossil bones, *Organic Geochemistry*, **26**, 99–103.
- Stott, A. W., Evershed, R. P., Jim, S., Jones, V., Rogers, J. M., Tuross, N., and Ambrose, S., 1999, Cholesterol as a new source of palaeodietary information: experimental approaches and archaeological applications, *Journal of Archaeological Science*, **26**, 705–16.
- Taylor, R. E., and Hare, P. E., 1995, Geochemical criteria for thermal alteration of bone, *Journal of Archaeological Science*, **22**, 115–19.
- Thomas, C. D. L., Stein, M. S., Feik, S. A., Wark, J. D., and Clement, J. G., 2000, Determination of age at death using combined morphology and histology of the femur, *Journal of Anatomy*, **196**, 463–71.
- Traub, W., Arad, T., and Weiner, S., 1992, Growth of mineral crystals in turkey tendon collagen-fibers, *Connective Tissue Research*, **28**, 99–111.
- Trueman, C. N., and Martill, D. M., 2002, The long-term survival of bone: the role of bioerosion, *Archaeometry*, **44**, 000–000.
- Tuross, N., 1991, Recovery of bone and serum proteins from human skeletal tissue, in *Human palaeopathology* (eds. M. B. H. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcolm and R. S. Swift), 51–4, Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Tuross, N., 1994, The biochemistry of ancient DNA in bone, *Experientia*, 530–5.
- Van Duin, A. C. T., and Collins, M. J., 1998, The effects of conformational constraints on aspartic acid racemization, *Organic Geochemistry*, **29**, 1227–32.
- Van Klinken, G. J., 1999, Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements, *Journal of Archaeological Science*, **26**, 687–95.
- Wang, X. D., Masilamani, N. S., Mabrey, J. D., Alder, M. E., and Agrawal, C. M., 1998, Changes in the fracture toughness of bone may not be reflected in its mineral density, porosity, and tensile properties, *Bone*, **23**, 67–72.
- Wang, X. D., Bank, R. A., TeKoppele, J. M., Hubbard, G. B., Athanasiou, K. A., and Agrawal, C. M., 2000, Effect of collagen denaturation on the toughness of bone, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **371**, 228–39.
- Weiner, S., and Wagner, H. D., 1998, The material bone: structure–mechanical function relations, *Annual Review of Materials Science*, **28**, 271–98.
- Weiner, S., Goldberg, P., and Bar-Yosef, O., 1993, Bone preservation in Kebara Cave, Israel, using on-site Fourier transform infrared spectrometry, *Journal of Archaeological Science*, **20**, 613–27.
- Weiner, S., Traub, W., and Wagner, H. D., 1999, Lamellar bone: structure–function relations, *Journal of Structural Biology*, **126**, 241–55.
- Weser, U., Kaup, Y., Etspuler, H., Kenward, N., and Hedges, R. E. M., 1996, Biochemically and immunologically active alkaline phosphatase in archaeologically important bone samples, *Journal of Archaeological Science*, **23**, 723–30.
- Wess, T. J., Drakopoulos, M., Snigirev, A., Wouters, J., Paris, O., Fratzl, P., Collins, M., Hiller, J., and Nielsen, K., 2001, The use of small-angle X-ray diffraction studies for the analysis of structural features in archaeological samples, *Archaeometry*, **43**, 117–29.
- White, E. M., and Hannus, L. A., 1983, Chemical weathering of bone in archaeological soils, *American Antiquity*, **48**, 316–22.
- Wians, F. H., Krech, K. E., and Hauschka, P. V., 1983, Effects of magnesium and calcium on osteocalcin adsorption to hydroxyapatite, *Magnesium*, **2**, 83–92.
- Yoshino, M., Kimijima, T., Miyasaka, S., Sato, H., and Seta, S., 1991, Microscopic study on estimation of time since death in skeletal remains, *Forensic Science International*, **49**, 143–58.
- Zioupou, P., Currey, J. D., and Hamer, A. J., 1999, The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone, *Journal of Biomedical Materials Research*, **45**, 108–16.



Analytica Chimica Acta 339 (1997) 99–107

ANALYTICA
CHIMICA
ACTA

Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids

János Csapó^{a,*}, Zsuzsanna Csapó-Kiss^a, László Wágner^b, Tibor Tálos^b, Truman G. Martin^c, Staffan Folestad^d, Anna Tivesten^d, Sándor Némethy^e

^aPANNON Agricultural University, Faculty of Animal Science, P.O. Box 16, Dénesmajor 2, H-7401 Kaposvár, Hungary

^bPANNON Agricultural University, Faculty of Georgikon Agricultural Sciences, Deák F.u. 16, H-8360 Keszthely, Hungary

^cDepartment of Animal Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA

^dDepartment of Analytical and Marine Chemistry, University of Göteborg and Chalmers University of Technology, S-412 96 Göteborg, Sweden

^eDepartment of Marine Geology, University of Göteborg, Göteborg, Sweden

Received 6 March 1996; revised 16 April 1996; accepted 22 September 1996

Abstract

Racemization of free amino acids is considerably lower than those bound in peptide. In the same experimental conditions, the rate of racemization of free amino acids is only 20%–80% that of peptide-bound amino acids. When using traditional protein hydrolysis, the racemization was 1.2–1.6 times as high as that obtained at high temperatures (160–180°C), under conditions ensuring total hydrolysis of the protein. This lower degree of racemization may be explained by the fact that, at high temperatures, the protein hydrolyses more rapidly into free amino acids and the racemization of free amino acids is considerably lower than those bound in polypeptides. When hydrolysis is conducted at lower temperatures for longer times, the amino acids bound in the peptide chain are exposed for a longer time to the effects of racemization. As a result, we may say that any factor that speeds up hydrolysis will lower the degree of racemization. Racemization was higher for proteins in milk powder than for pure proteins. This may be explained as a result of catalysis of the racemization by the heavy metals present. After 48 h at 110°C and in the presence of 4 M barium hydroxide, all amino acids (whether free or bound in peptide) were totally racemized. Therefore, the racemization of tryptophan cannot be determined using barium hydroxide promoted protein hydrolysis. High temperature hydrolysis (at 160°C for 45–60 min, at 170°C for 30–45 min and 180°C for 30 min) is recommended for those who would like to hydrolyse the protein for short times and determine the degree of racemization occurring in the polypeptide chain, but do not wish to use enzyme hydrolysis.

Keywords: Sample preparation; Protein hydrolysis; Racemization; Amino acids; Tryptophan; D-Amino acids

1. Introduction

The role of optical activity in living organisms has long been known. The large group of biologically active molecules, such as the amino acids, are all optically active. Thus, in order to know their roles in

*Corresponding author.

living organisms, we should be able to separate and determine their enantiomers. Recently, considerable effort has been devoted to the separation and quantitation of amino acid enantiomers. Among these is the archaeometric application whereby one can establish the age of archaeological relics based on the racemization of amino acids, specifically the epimerization of isoleucine [1–4]. Another example of recent work is the study of the composition of extraterrestrial materials [5]. Recent research has demonstrated that, due to technological intervention or the alteration of microbiological status, foods may contain significant amount of D-amino acids [6–20]. Several articles have dealt with the D-amino acid content of milk [21–25]. From these reports, it became obvious that the appearance of D-amino acids is not solely due to technological intervention (heat treatment, heat preservation), but may also result from alteration of the microbiological status.

When attempting to quantify amino acid enantiomers, it is not sufficient to separate these from each other. One also has to pay attention to their separation from the other amino acids and their derivatives. The amino acid derivative, on which we decide to depend, should be detectable with good sensitivity. Lately, pre-column derivative formation has been used with a fluorescent reagent, followed by reversed phase chromatography (RPC) of the derivatives. Using these methods, the detection limits for the amino acids of interest are extremely low. On the other hand, the flexibility of this analytical method provides outstanding advantages [26–28]. Thus, automatic methods have been developed for the simultaneous determination of optically inactive α -phthalaldehyde/mercaptoethanol (OPA) and α -amino acids [29], and of 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) in the presence of α -amino and -imino acids [30,31]. The reaction of optically active (chiral) amino acids with chiral reagents yields diastereoisomer compounds. In theory, one should be able to separate these using a non-chiral column. If the chiral reagent is another amino acid, then the separation and determination of the diastereomeric dipeptide may be achieved by ion-exchange column chromatography [32–35].

Following derivative formation with chiral reagents, the enantiomers of protein building block

amino acids may be separated in a single run using RPC. Since the chromatographic separation takes 50–70 min, it is of paramount importance that the analytical method be adaptable to full automation. Another prerequisite is that derivative formation should be simple, proceeding in a short time at the room temperature. The reaction between the optically active thiols, OPA and the amino acids to be determined has been used to separate and quantify the amino acid enantiomers [36,37]. Chiral 1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate (FLEC), when used for the separation of enantiomers, has the advantage of being able to form derivatives not only with the α -amino acids but also with imino acids [38].

It is very important to know whether or not racemization occurs during protein hydrolysis. If it does, the results of the determination will be influenced adversely. Various studies have reported that the degree of racemization during peptide hydrolysis is dependent on the protein type and amino acid background. It was found [39–42] that amino acids bound in peptides racemize faster than free amino acids.

Several reports have appeared in the literature [43–46] dealing with the use of microwave technology in protein hydrolysis. Some authors reported excellent results [47,48] using high temperatures and short times for the hydrolysis process. It appears that, during microwave promoted hydrolysis, significant racemization occurs, because microwaves have been used on purpose [49] to trigger racemization of amino acids. Reports have been published describing the increase of D-enantiomer concentration in foods [50] under the influence of microwave treatment. Racemization is no cause for concern if one does not wish to determine the enantiomers of amino acids. However, if the aim is the separation and determination of amino acid enantiomers, the protein hydrolysis procedure selected should be such that the accompanying racemization is as small as possible. This is necessary since, in the case of significant racemization, we are unable to distinguish between the amino acid enantiomers initially present in the sample from those that appear during the hydrolysis process. Several methods have been developed [51–53] which restrict racemization occurring during hydrolysis. However, these proved to be lengthy and tedious. As a consequence, the objective was to

develop a protein hydrolysis method having the lowest possible degree of racemization, at high temperatures for a short duration.

2. Experimental

2.1. Hydrolysis and processing of the hydrolysate

Reusable pyrex hydrolysis tubes 8 mm i.d. (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) were used for hydrolysis of the proteins and for treating the free amino acids. Each tube can contain up to 8 cm³ of hydrolysing agent without making contact with the PTFE (polytetrafluoroethylene) sealing cup. 1 ml of 6 M hydrochloric acid was added to each tube for preparation of the protein and peptide hydrolysate. Each tube had two PTFE sealing caps to give complete leak-free operation during heating at 160, 170 or 180°C.

Either 1 mg of peptide, protein, or free amino acids, or 20 mg of fat-free milk powder was weighed into Pyrex tubes previously washed with hydrochloric acid and deionised water. One ml 6 M HCl was added to each sample (HCl was obtained from the Pierce Chemical Company) and nitrogen was bubbled for 5 min through the hydrolysing agent via a glass capillary. After bubbling with nitrogen, the Pyrex tubes were immediately closed, and put into the heating oven at 160, 170 or 180°C for 15, 30, 45 or 60 min. One sample of each examined material was hydrolysed at 110°C for 24 h with 6 M HCl, according to the method of More and Stein [15]. Another sample was hydrolysed at 110°C for 48 h using 4 M barium hydroxide for the determination of tryptophan from samples of food and feed. After hydrolysis, the tubes were cooled at room temperature, HCl was removed by lyophilization and the residue was dissolved in 0.01 M HCl. After the barium hydroxide hydrolysis, the pH of the hydrolysate was adjusted to neutral with 1 M HCl, and the barium was removed from the hydrolysate in the form of barium sulphate. During neutralisation, the temperature was held below 30°C with the help of a sodium chloride–ice mixture. Next, all of the hydrolysates were filtered and stored at –25°C until the analysis for D- and L-amino acid enantiomers by liquid chromatography (LC).

2.2. Materials tested

The following materials were used for testing the racemization during hydrolysis: bovine ribonuclease, lysozyme, cytochrome C, mare's milk powder, and individual free amino acids as follows: L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-threonine, L-alanine, L-valine, L-phenylalanine, L-histidine and L-tryptophan. The protein content of the milk powder (22.7%) was determined using a Kjel-Foss 16200 (Foss Electric, Denmark) rapid nitrogen analyser. The protein content was calculated from % nitrogen using a conversion factor of 6.38. Peptides and proteins were hydrolysed at various temperature–time combinations. The free amino acid samples were subjected to the same temperature–time treatments. LC was used for the determination of the L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-threonine, L-alanine, L-valine, L-phenylalanine, L-histidine and L-tryptophan content of the samples.

2.3. Liquid chromatography for separation and determination of the D- and L-amino acids

2.3.1. Instruments

The chromatographic system was assembled from Isco 100 DM syringe pumps (Isco Inc., Lincoln, NE) and a Rheodyne (Berkeley, CA) injector equipped with a 20 μ l loop. The separation process was monitored and the chromatograms were stored on an Isco Chem Research (Isco Inc.) system. The derivative formation and sample injection were performed manually. The excitation and observation wavelengths were 325 and 420 nm, respectively.

2.3.2. Reagents

Acetonitrile and methanol were purchased from Rathburn Ltd (Walkeburn, England). The amino acid standards, the *o*-phthalaldehyde and TATG were obtained from Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO). The buffers used for elution were prepared from mono- and di-sodium phosphates. The pH was adjusted with 4 M sodium hydroxide.

2.3.3. Synthesis of derivatives

The reaction was carried out in a 120 μ l microvial which was placed in another vial (volume, 1.8 ml) that had a PTFE coating, internal cover plate, and a

screw cap. The sample (free amino acid or protein hydrolysate removed by lyophilization), dissolved in 90 µl of borate buffer (0.4 M, pH 9.5), was mixed with 15 µl of reagent (8 mg of OPA and 44 mg of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside (TATG) dissolved in 1 ml of methanol). The mixture was homogenized by bubbling through approximately 100 µl of nitrogen and was left standing for 6 min. Then, 25 µl of the reaction mixture was injected into the analytical column. After injection, the system was rinsed three times with approximately 100 µl of a 70 : 30 (v/v) acetone–water solution. Synthesis of derivatives was performed manually and the reagent solution was mixed with the aid of an IKA Vibro Fix instrument (Janke and Kunkel, IKA-WERK, Breisgau, Germany).

2.3.4. Separation and quantitation of the enantiomers

The enantiomers were separated according to the method of Einarson et al. [6], using a reversed-phase analytical column packed with Kromasil octyl C8 (250×5.6 mm i.d., 5 µm particle size, EKA Nobel AB, Bohus, Sweden). To increase the life of the column, a safety column was fitted between the sample injector and the analytical column (RP8, Newguard, 25×3.2 mm internal diameter, 7 µm particle size, EKA Nobel AB), and a cleaning column (C18, 36×4.5 mm internal diameter, 20 µm particle size, Rsil, EKA Nobel AB) was installed between the pump and the sample injector. In order to separate the enantiomers, the two component gradi-

Table 1
Elution of the gradient as a function of time

Time (min)	A ^a (%)	B ^b
0	95	5
10	95	5
35	83	17
55	72	28
56	67	33
74	67	33
75	62	38

^a 40% methanol in phosphate buffer (9.5 mM, pH 7.05).

^b Acetonitrile.

ent system had the following composition: A=40% methanol in phosphate buffer (9.5 mM, pH 7.05) and B=acetonitrile. The flow rate was 1 ml min⁻¹, and the elution of the gradient as a function of time is shown in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. D-amino acid composition of bovine ribonuclease as related to time and temperature

Bovine ribonuclease was hydrolysed by 6 M HCl at 110°C for 24 h or at 160, 170 and 180°C for 15, 30, 45 and 60 min. The D-amino acid compositions of ribonuclease after hydrolysis at 110°C for 24 h and at elevated temperatures for shorter times are given in Tables 2–4. The data in Table 2 showed that with

Table 2
D-amino acid content of bovine ribonuclease hydrolysed using 6 M hydrochloric acid at 160°C for different times

Amino acid	6 M HCl at 110°C for	6 M HCl at 160°C for				
	24 h	15 min	30 min	45 min	60 min	
Asp	6.73	1.73	2.78	3.11	3.34	
Glu	4.58	1.58	2.59	2.61	2.84	
Thr	3.64	1.47	1.70	1.97	2.21	
Ala	2.95	1.41	1.58	1.60	1.73	
Val	2.34	1.22	1.29	1.51	1.54	
Phe	3.28	2.13	2.47	2.93	3.21	
His	1.96	0.92	1.41	1.52	1.64	
Trp ^a						

The values refer to the percent racemization expressed as the ratio (D/D+L)100. Each value is the mean of triplicate determinations. Hydrolysis conditions: 6 M HCl, 110°C for 24 h or 160°C for different times using Pyrex No. 9826 tubes.

^a Almost totally decomposed during 6 M HCl hydrolysis at 160°C for 15–60 min.

Table 3
D-amino acid content of bovine ribonuclease hydrolysed using 6 M hydrochloric acid at 170°C for different times

Amino acid	6 M HCl at 110°C for	6 M HCl at 170°C for				
	24 h	15 min	30 min	45 min	60 min	
Asp	6.73	2.23	3.02	3.62	3.89	
Glu	4.58	1.97	2.74	2.93	3.28	
Thr	3.64	1.99	2.16	2.54	2.84	
Ala	2.95	1.69	1.99	2.22	2.54	
Val	2.34	1.61	1.90	2.03	2.17	
Phe	3.28	2.30	2.83	3.01	3.10	
His	1.96	1.22	1.59	1.63	1.81	

Data expressed as in Table 1.

Table 4
D-amino acid content of bovine ribonuclease hydrolysed using 6 M hydrochloric acid at 180°C for different times

Amino acid	6 M HCl at 110°C for	6 M HCl at 180°C for			
	24 h	15 min	30 min	45 min	
Asp	6.73	2.69	4.28	6.19	
Glu	4.58	2.94	3.42	4.61	
Thr	3.64	2.45	3.06	3.39	
Ala	2.95	1.37	2.89	3.31	
Val	2.34	1.99	2.43	2.70	
Phe	3.28	2.97	3.12	3.78	
His	1.96	1.77	2.09	2.53	

Data expressed as in Table 1.

both the traditional hydrolysis (6 M HCl, 24 h, 110°C) and the high temperature–short duration hydrolysis, tryptophan was almost completely decomposed. As a result, we shall not report this amino acid in the following tables. It is clear that, among the examined amino acids, the highest degree of racemization [D/(D+L)×100] is recorded for aspartic acid, in both the traditional and the short duration hydrolyses. This is followed in decreasing order by glutamic acid, threonine, phenylalanine, alanine, valine and histidine. At 160°C, the degree of racemization increases as the hydrolysis time increases. In the case of every amino acid tested, the lowest racemization was recorded at 15 min hydrolysis times. On increasing the hydrolysis time from 15 to 60 min, racemization increased from 1.73% to 3.34% in the case of aspartic acid, 1.58% to 2.84% for glutamic acid, 1.47% to 2.12% for threonine, 1.41% to 1.73% for alanine,

1.22% to 1.54% for valine, 2.13% to 3.21% for phenylalanine and 0.92% to 1.64% for histidine.

In earlier studies [48], it was reported that protein hydrolyses performed at 160°C for 15–45 min were insufficient for complete hydrolyses of proteins, and especially for breakage of the bond adjacent to Val, Ile and Leu. Therefore, for hydrolysis done at 160°C, only the 60 min times have practical importance. If we compare the racemization obtained after 60 min hydrolysis with the results of the traditional method, it is found that the degree of racemization for the traditional method, on average, is 1.5 times as high as that of brief hydrolysis performed at 160°C.

We reach similar conclusions if we analyse the data featured in Tables 3 and 4. When performing the hydrolysis at 170°C, the hydrolysis reaction practically concludes after 45 min; and after 60 min, even the very stubborn bonds adjacent to Val are broken. At 180°C, 30–45 min is sufficient for complete hydrolysis. Therefore, when comparing results obtained during traditional hydrolysis, it is advisable to make comparisons with data obtained at 170°C for 45 min and 180°C for 30 min. Hydrolysis at 160°C for 60–90 min yields racemization similar to hydrolysis at 170°C for 45 min. Hydrolysis at 180°C for 45 min yields a racemization ca. 1.5 times greater than that of the hydrolysis carried out at a lower temperature which results in total breakage of bonds. Obviously, both increasing the temperature (from 160 to 180°C) and increasing the time (from 15 to 60 min) produced a higher degree of racemization. However, at all three temperatures, continuation of hydrolysis until total hydrolysis of the peptide bond (e.g. at 180°C for 30 min), produced a degree of

racemization which represented only ca. 50%–70% of that observed in the case of traditional hydrolysis.

The data in Tables 2–4 were subjected to analysis of variance with temperatures, times and amino acids representing the main effects. All main effects plus the interactions of temperature–time and temperature–amino acids were highly significant ($P < 0.001$) sources of variance affecting the degree of racemization. Increases in temperature and time of hydrolysis caused increases in racemization. The degree of racemization, when averaged over all time–temperature treatments, varied from 1.16% for His to 2.52% for Asp.

The degree of racemization values (average for all amino acids and for Asp) were fitted to a curvilinear and interactive function of time and temperature. The model explained 94%–96% of the variation in the

dependent variable. The function for Asp indicated that 3.6% racemization would occur at 60, 42 and 28 min, respectively, for 160, 170 and 180°C temperatures. The corresponding times for average racemization were 70, 35 and 20 min to produce 2.33% racemization.

3.2. Influence of the hydrolysis method on the D-amino acid content of lysozyme, cytochrome C and milk powder

After the experiments with ribonuclease, we hydrolysed lysozyme, cytochrome C and milk powder using the traditional method. The results thus obtained were compared with the data obtained at 160°C for 60 min, at 170°C for 45 and 60 min and, finally, at 180°C for 30 min. The degree of racemiza-

Table 5
D-amino acid content of lysozyme (A), cytochrome C (B) and milk powder (C) hydrolysed using 6 M hydrochloric acid at different temperatures for different times

Amino acid	6 M HCl					
	at 110°C for 24 h			at 160°C for 60 min		
	A	B	C	A	B	C
Asp	6.62	7.01	7.89	3.27	3.42	4.15
Glu	4.58	4.61	5.93	2.79	2.84	3.61
Thr	3.62	3.74	4.38	2.29	2.31	3.14
Ala	2.99	3.21	4.02	1.69	1.65	2.13
Val	2.11	2.24	2.53	1.69	1.84	2.33
Phe	3.31	3.42	3.64	3.19	3.37	3.57
His	1.83	1.89	2.38	1.64	1.67	2.01

Data expressed as in Table 1.

Table 6
D-amino acid content of lysozyme (A), cytochrome C (B) and milk powder (C) hydrolysed using 6 M hydrochloric acid at different temperatures for different times

Amino acid	6 M HCl					
	at 170°C for 45 min			at 180°C for 30 min		
	A	B	C	A	B	C
Asp	3.29	3.57	4.42	3.84	3.99	4.67
Glu	2.81	2.89	3.74	3.51	3.63	3.92
Thr	2.11	2.23	3.04	2.87	3.14	3.42
Ala	1.72	1.77	2.11	2.81	2.89	3.04
Val	1.71	1.82	2.27	2.54	2.57	2.82
Phe	2.89	3.11	3.60	2.97	2.83	3.20
His	1.52	1.60	1.99	1.79	1.93	2.11

Data expressed as in Table 1.

tion was compared with the various hydrolysis conditions. The selection of the these time–temperature combinations was based on the time–temperature combinations required to produce total amino acid hydrolysis. The data in Tables 5 and 6 show that the degrees of racemization for lysozyme and cytochrome C were virtually identical to that obtained for ribonuclease at the same time and temperature. In the case of milk powder, for each temperature–time combination, we obtained a degree of racemization 15%–25% higher than that of the three pure proteins. The higher racemization may be partially explained by the mineral matter content of the milk powder. It is known that, with the exception of nickel, heavy metals catalyse the racemization of amino acids.

3.3. Racemization of free amino acids during hydrolysis.

The racemization of free amino acids has been reported to be lower than that of amino acids bound in peptides. In order to test the hypothesis that there is a difference between the racemization of free amino acids and those bound in peptides, we have treated each free amino acid with 6 M HCl for various times, and at various temperatures. The results of this investigation are shown in Table 7. When samples were treated for the same length of time, racemization increased with increased treatment temperature. Also, racemization increased with increased treatment times. The high temperature treatments yielded 20%–55% less racemization than was observed for the traditional treatment of 110°C for 24 h. Even in

the case of the sample treated at 180°C for 30 min, the racemization, except for valine, was only 70%–90% of that seen for traditional treatment. If we compare the racemization of free (Table 7) and peptide bound (Tables 2–6) amino acids, we find that the percentage racemization of peptide bound amino acids is 4–6 times greater than that of free amino acids at 110°C for 24 h. When both the free amino acids and the peptide bound amino acids were subjected to the same high temperature and short time hydrolysis, the above ratio ranged 5–7.

3.4. Racemization when using barium hydroxide promoted hydrolysis

It was observed earlier in this report that, during hydrolysis with 6 M HCl, tryptophan decomposed almost completely. If we wish to determine the degree of racemization for tryptophan, we must resort to a hydrolysis method that does not cause decomposition of Trp. Since we have been using barium hydroxide hydrolysis for the determination of the Trp content of proteins, we decided to examine racemization associated with this process. We hydrolysed pure proteins (ribonuclease, lysozyme, cytochrome C), milk powder and free amino acids with 4 M barium hydroxide. We found that, in all materials examined (including free amino acids), all amino acids were fully racemized. In other words, we were able to demonstrate the presence of 50% L- and 50% D-enantiomers. Because of this, barium hydroxide-based hydrolysis may not be used to measure racemization of tryptophan contained in proteins.

Table 7
Racemization of free amino acids treated with protein hydrolysis at different temperatures for different times

Amino acid	6 M HCl							
	at 110°C for		at 160°C for		at 170°C for		at 180°C for	
	24 h		45 min	60 min	30 min	45 min	15 min	30 min
Asp	1.42		0.79	0.93	0.73	1.04	0.94	1.12
Glu	1.07		0.54	0.82	0.68	0.89	0.91	1.03
Thr	0.83		0.31	0.38	0.32	0.41	0.42	0.61
Ala	0.69		0.22	0.29	0.27	0.35	0.37	0.52
Val	0.54		0.19	0.25	0.17	0.24	0.37	0.57
Phe	0.72		0.21	0.27	0.20	0.31	0.32	0.47
His	0.47		0.11	0.18	0.10	0.19	0.21	0.33

Data expressed as in Table 1.

4. Conclusions and recommendations

The racemization of free amino acids was considerably lower than that of amino acids bound in peptides. Under the same experimental conditions, the degree of racemization of free amino acids was only 20%–80% that of peptide bound amino acids.

Traditional protein hydrolysis-produced racemization is 1.5 times as high as that obtained at high temperatures (160–180°C), under conditions ensuring total hydrolysis of the protein. This lower degree of racemization may be explained by the fact that, at high temperatures, the protein hydrolyses more rapidly into free amino acids. The racemization of free amino acids is considerably less than that of amino acids bound in polypeptides. Therefore, high temperature hydrolysis promotes conversion to the free state, in which amino acids are less subject to racemization. When hydrolysis is conducted at lower temperatures for longer times, the amino acids bound in the peptide chain are exposed for a longer time to the effects causing racemization. As a result, we may say that factors which speed up hydrolysis will lower the degree of racemization.

In the case of milk powder, racemization was higher than in the case of pure proteins. This may be explained by catalysis of the racemization associated with the heavy metals present. After 48 h at 110°C and in the presence of 4 M barium hydroxide, all amino acids (whether free or bound in peptide) were totally racemized. Therefore, the racemization of tryptophan cannot be determined using barium hydroxide promoted protein hydrolysis.

We recommend that protein samples be hydrolysed at a high temperature for a short time (160°C for 60 min and 170°C for 45 min) for the determination of the degree of racemization occurring in the polypeptide chain if enzyme hydrolysis is not to be used.

Acknowledgements

The financial support of National Fund for Scientific Research (OTKA T 6653, OTKA T 14916) and Ministry of Education (MKM-15) is gratefully acknowledged.

References

- [1] J.F. Wehmiller and P.E. Hare, *Science*, 173 (1971) 907.
- [2] K.M. Williams and G.G. Smith, *Origins of Life*, 8 (1977) 91.
- [3] G.H. Miller and P.E. Hare, In P.E. Hare, T.C. Hoering and K. King, Jr. (Eds): *Biogeochemistry of amino acids*, J. Wiley and Sons, NY, (1980) 415.
- [4] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, L. Költő and I. Papp, *Archaeometry* '90, Birkhauser Verlag, Basel, (1990) 627.
- [5] J.R. Cronin and S. Pizzarello, *Adv. Space. Res.*, 3 (1983) 5.
- [6] M.F. Boehm and J.L. Bada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 5263.
- [7] S. Bunjapamai, R.R. Mahoney and I.S. Fagerson, *J. Food Sci.*, 47 (1982) 1229.
- [8] J.W. Finley, In *Chemical Changes in Food During Processing* (Inst. Food Technologists Basic Symp. Ser.), T. Richardson and J. W. Finley (Eds), (1985) 443. Westport, Conn. AVI Publ.
- [9] M. Friedman and R. Liardon, *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1985) 666.
- [10] M.J. Friedman, J.C. Zahnley and P.M. Masters, *J. Food Sci.*, 46 (1981) 127.
- [11] M. Fuse, F. Hayase and H. Kato, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 37 (1984) 348.
- [12] F. Hayase, H. Kato and M. Fujimaki, *Agric. Biol. Chem.*, 37 (1973) 191.
- [13] R. Hayashi and I. Kameda, *Agric. Biol. Chem.*, 44 (1980) 891.
- [14] R. Hayashi and I. Kameda, *J. Food Sci.*, 45 (1980) 1430.
- [15] W.L. Jenkins, L.R. Tovar, D.E. Schwass, R. Liardon and K.L. Carpenter, *J. Agric. Food Chem.*, 32 (1984) 1035.
- [16] R. Liardon and R.F. Hurrell, *J. Agric. Food. Chem.*, 31 (1983) 432.
- [17] H. Man and J.L. Bada, *Ann. Rev. Nutr.*, 7 (1987) 209.
- [18] P.E. Masters and M. Friedman, In *Chemical Deterioration of Proteins ACS Symp. Ser. 123* 165, J.R. Whitaker and M. Fujimaki (Eds.), Washington, DC, Am. Chem. Soc. (1980) 268.
- [19] G.R. Palla, R. Marchelli, A. Dossena and G. Casnati, *J. Chromatogr.*, 475 (1989) 45.
- [20] J. Csapó and Z. Henics, *Acta Agr. Hung.*, 40 (1991) 159.
- [21] H. Brückner and M. Hausch, *Milchwissenschaft*, 45 (1990) 357.
- [22] H. Brückner and M. Hausch, *Milchwissenschaft*, 45 (1990) 421.
- [23] L. Gandolfi, G. Palla, L. Delprato, F. DeNisco, R. Marchelli and C. Salvadori, *J. Food Sci.*, 57 (1992) 377.
- [24] H. Brückner, P. Jaek, M. Langer and H. Godel, *Amino Acids*, 2 (1992) 271.
- [25] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, J. Stefler, T.G. Martin and S. Némethy, *J. Dairy Sci.*, 78 (1995) 2375.
- [26] P. Lindroth and K. Mopper, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 1667.
- [27] Y. Tophui, D.E. Schmidt, W. Lindner and B.L. Karger, *Anal. Biochem.*, 115 (1981) 123.
- [28] S. Einarsson, S. Folestad and B. Josefsson, *J. Liquid Chrom.*, 10 (1987) 1589.

- [29] R.J. Smith and K.A. Panico, *J. Liquid Chromatogr.*, 8 (1985) 1873.
- [30] R. Cunico, A.G. Majer, C.T. Wehr and T.L. Sheehan, *BioChromatography*, 1 (1986) 1.
- [31] I. Betner and P. Foldi, *LC-GC*, (1988) 832.
- [32] R. Hirschmann, R.G. Strachan, H. Schwann, E.F. Schoenewaldt, H. Joshua, B. Barkenmeyer, D.F. Weber, W.J. Paleveda, T.A. Jacob, T.E. Beesley and R.G. Denkwalter, *J. Org. Chem.*, 32 (1967) 3415.
- [33] J.M. Manning and S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 5591.
- [34] J. Csapó, I. Tóth-Pósfai and Zs. Csapó-Kiss, In G. Lubec and G.A. Rosenthal (Eds): *Amino Acids, Chemistry, Biology and Medicine, ESCOM Sci. Publ. B.V.*, (1990) 96.
- [35] J. Csapó, I. Tóth-Pósfai and Zs. Csapó-Kiss, *Amino Acids*, 1 (1991) 331.
- [36] D.W. Aswad, *Anal. Biochem.*, 137 (1984) 405.
- [37] R.H. Buck and K. Krummen, *J. Chromatogr.*, 387 (1987) 255.
- [38] S. Einarsson, B. Josefsson, P. Möller and D. Sanchez, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1191.
- [39] H. Frank, W. Woiwode, G. Nicholson and E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.*, (1981) 354.
- [40] G.G. Smith and G.V. Reddy, *J. Org. Chem.*, 54 (1989) 4529.
- [41] R. Liardon and S. Lederman, *J. Agric. Food. Chem.*, 34 (1986) 557.
- [42] R. Liardon and M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 661.
- [43] S.T. Chen, S.H. Chiou, Y.H. Chu and K.T. Wang, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30 (1987) 572.
- [44] C. Woodward, L.B. Gilman and W.G. Engelhart, *International Laboratory*, September (1990) 40.
- [45] L.B. Gilman and C. Woodward, *Current Research in Protein Chemistry*, (1990) 23.
- [46] M.V. Pickering and P. Newton, *Bio Separations*, 3 (1992) 10.
- [47] S.H. Chiou and K.T. Wang, *J. Chromatogr.*, 448 (1988) 404.
- [48] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, S. Folestad and A. Tivesten, *Anal. Chim. Acta*, 289 (1994) 105.
- [49] S.T. Chen, S.H. Wu and K.T. Wang, *Int. J. Peptid Protein. Res.*, 33 (1989) 73.
- [50] G. Lubec, C.H.R. Wolf and B. Bartosch, *The Lancet*, March 31, (1990) 792.
- [51] A. D'Aniello, G. D'Onofrio and M. Pichetola, *Biochim. Biophys. Acta*, 1037 (1990) 200.
- [52] G.G. Smith, A. Khatib and G.S. Reddy, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 293.
- [53] G.S. Reddy, S.V. Reddy and G.G. Smith, *Inorg. Chim. Acta*, 166 (1989) 55.



Analytica Chimica Acta 289 (1994) 105–111

**ANALYTICA
CHIMICA
ACTA**

Mercaptoethanesulphonic acid as a protecting and hydrolysing agent for the determination of the amino acid composition of proteins using an elevated temperature for protein hydrolysis

János Csapó ^{*,a}, Zsuzsanna Csapó-Kiss ^a, Staffan Folestad ^b, Anna Tivesten ^b

^a Faculty of Animal Science, PANNON Agricultural University, P.O. Box 16, Dénesmajor 2, H-7401 Kaposvár, Hungary

^b Department of Analytical and Marine Chemistry, University of Göteborg, and Chalmers University of Technology, S-412 96 Gothenburg, Sweden

(Received 23rd July 1993)

Abstract

Mercaptoethanesulphonic acid (MES-OH) (3 M) was used for the hydrolysis of different samples (pure proteins, free tryptophan and milk powder with a high sugar content). Different temperatures (160, 170 and 180°C) and time periods (15–90 min) were compared under standard conditions to minimize side-reactions in order to obtain the best recovery of the amino acids (especially tryptophan and methionine). The materials used for testing the hydrolysis methods were bovine ribonuclease, lysozyme, cytochrome *c*, free tryptophan and mare's milk powder. Hydrolysis at high temperature was successfully applied for the amino acid analysis of milk powder with high contents of carbohydrate and pure proteins. In some instances, such as in tryptophan and methionine determination at 160–170°C for 15–30 min, the results were better than those obtained by the original MES-OH method. A disadvantage of the MES-OH hydrolysis method is that it reduces cystine to cysteine, which co-elutes with proline from the ion-exchange column used to separate the released amino acids and it may interfere with the determination of proline in high-cystine proteins.

Key words: Sample preparation; Amino acids; Mercaptoethanesulphonic acid; Methionine; Protein hydrolysis; Tryptophan

1. Introduction

The problems associated with the rapid and accurate determination of the tryptophan content of polypeptides, food and feed proteins have not yet been completely solved. Tryptophan can be determined indirectly in intact proteins by spec-

trophotometric methods if the amount of tyrosine is known [1,2]. The tryptophan content can also be determined directly after basic hydrolysis of proteins [3,4], but this method is time consuming. Such a hydrolysate is not suitable for total amino acid analysis because some amino acids (especially arginine) are damaged under the conditions of hydrolysis. During acid hydrolysis of proteins, tryptophan is partly or, in the presence of carbohydrates, totally decomposed.

106

J. Csapó et al. / Analytica Chimica Acta 289 (1994) 105–111

In the last 20 years, attempts have been made to eliminate the destruction of tryptophan residues. Matsubara and Sasaki [5] performed the hydrolysis of proteins with 6 M HCl containing 0.5–5% thioglycolic acid, Liu and Chang [6] used 3 M *p*-toluenesulphonic acid containing 0.2% tryptamine, Simpson et al. [7] introduced the non-volatile 4 M methanesulphonic acid containing 3-(2-aminoethyl)indole and Penke et al. [8] and Csapó et al. [9] used 3 M mercaptoethanesulphonic acid for the mild acid hydrolysis of peptides and proteins in order to increase the precision of determination for tryptophan.

More recently, some hydrolysis methods at elevated temperature [10] or using microwave techniques [11–13] were developed. With the help of microwave irradiation, the temperature in the hydrolysis vessels is > 150°C, and this offers the advantage of shortening the hydrolysis time from 24–72 h to 15–45 min. The use of a mixed acid solvent of hydrochloric acid and trifluoroacetic acid [14] or hydrochloric acid and propionic acid [10] at temperatures > 150°C has been reported. In this work, 3 M mercaptoethanesulphonic acid at 160, 170 or 180°C was used for the amino acid analysis of pure proteins, free tryptophan and milk powder with a high sugar content. Different temperatures and different hydrolysis times were compared under standard conditions. The aims were to minimize side-reactions during the mercaptoethanesulphonic acid hydrolysis for in order to obtain an efficient recovery of the individual amino acids (especially tryptophan and methionine), and to establish a rational hydrolysis method for the amino acid analysis of food and feed samples. A further objective was to develop a hydrolysis method that permits the accurate and very rapid hydrolysis of proteins.

2. Experimental

2.1. Hydrolysis and processing of the hydrolysate

Reusable Pyrex hydrolysis tubes of 8 mm i.d. (Pierce, Rockford, IL) were used for the hydrolysis of proteins or for treating free tryptophan. The tubes can contain up to 8 ml of hydrolysing

agent without contact with the PTFE sealing cup. In each instance, 1 ml of 3 M mercaptoethanesulphonic acid (MES-OH) (Pierce) was added to the tubes for the preparation of protein and peptide hydrolysate. Each tube had two PTFE sealing caps to achieve complete leak-free operation during heating at 160, 170 or 180°C.

A 1-mg amount of peptide, protein or free tryptophan or 20 mg of fat-free milk powder was weighed into Pyrex tubes previously washed with hydrochloric acid and deionized water. A 1-ml volume of 3 M MES-OH was added to each sample and nitrogen was bubbled for 5 min through the contents by a glass capillary. The Pyrex tubes were then immediately closed, and placed in the oven at 160°C for 15, 30, 45, 60 or 90 min at 170°C for 30, 45, 60 or 90 min or at 180°C for 15, 30, 45, 60 or 90 min. One sample of each material examined was hydrolysed at 110°C for 24 h, according to the method of Moore and Stein [15], with 6 M HCl, and one sample with 3 M MES-OH at 125°C for 24 h as suggested by Liu and Chang [6]. After hydrolysis, the tubes were cooled to room temperature and the pH of the samples was adjusted to 2.2 with 4 M NaOH. During neutralization, the temperature was held below 30°C with the help of a sodium chloride–ice mixture. After dilution with citrate buffer (pH 2.2), the hydrolysates were filtered and applied to an automatic amino acid analyser (based on ion-exchange chromatography).

2.2. Materials tested

The materials used for testing the hydrolysis methods were bovine ribonuclease, lysozyme, cytochrome *c*, free tryptophan and mare's milk powder. The protein content of the milk powder (22.7%) was determined using a Kjeld-Foss 16200 rapid nitrogen analyser (Foss Electric, Hillerød, Denmark). The protein content was calculated from the percentage of nitrogen using a conversion factor of 6.38.

2.3. Amino acid analysis

The peptides and proteins were hydrolysed at different temperatures for different times, and

* Corresponding author.

Table 1
Amino acid composition of bovine ribonuclease hydrolysed by MES-OH at 160°C for different times

Amino acid	Theoretical value	6 M HCl, 110°C for 24 h	3 M MES-OH, 125°C for 24 h	3 M MES-OH, 160°C for				
				15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Asp	12.54	12.40	13.03	15.16	14.32	13.35	13.46	12.83
Thr	7.48	7.19	7.63	8.15	8.11	7.65	6.64	7.46
Ser	9.90	9.73	10.13	9.76	9.81	9.99	10.16	9.91
Glu	11.11	12.18	12.30	12.73	11.84	11.38	11.32	11.10
Pro	2.89	2.96	5.00	4.43	4.53	4.70	5.03	5.22
Gly	1.41	1.64	1.49	2.37	2.22	2.06	1.70	1.70
Ala	6.71	6.92	6.92	7.81	7.84	7.27	7.29	7.08
Cys	6.08	5.15	–	4.25	4.02	3.89	2.22	1.42
Val	6.62	6.66	6.82	4.10	4.32	5.24	6.02	6.78
Met	3.75	3.26	3.86	3.87	3.85	3.93	3.95	3.86
Ile	2.47	2.52	2.54	0.84	1.71	2.15	2.42	2.56
Leu	1.65	1.75	1.68	1.37	1.54	1.66	1.70	1.68
Tyr	6.83	6.78	7.02	5.84	6.32	6.51	6.69	6.98
Phe	3.11	3.36	3.42	2.69	2.93	3.05	3.15	3.34
Lys	9.18	9.18	9.54	9.67	9.72	9.81	9.60	9.45
His	3.90	3.83	4.05	2.87	2.95	3.17	3.23	4.13
Arg	4.37	4.49	4.57	4.09	4.06	4.19	4.42	4.50

Data are expressed as g amino acid per 100 g protein. The values are the means of triplicate determinations. Hydrolysis conditions, 3 M MES-OH 125°C for 24 h and 160°C for different times using Pyrex No. 9826 tubes. The theoretical values for different amino acids were calculated from the protein sequence.

the amino acid contents of the hydrolysates were determined with an LKB 4101 automatic amino acid analyser (LKB Biochrom, UK) using a Merck

amino acid calibration standard. Otherwise the analyses were carried out as described by Csapó et al. [16].

Table 2
Amino acid composition of bovine ribonuclease hydrolysed by MES-OH at 170 and 180°C for different times

Amino acid	170°C for				180°C for			
	30 min	45 min	60 min	90 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Asp	13.44	13.40	12.68	13.04	13.73	13.28	12.93	12.96
Thr	7.69	7.70	7.55	7.68	7.77	7.50	7.52	7.53
Ser	10.03	10.04	9.84	7.94	10.16	9.94	9.94	9.81
Glu	11.27	11.21	10.88	11.32	11.70	11.46	11.61	11.81
Pro	4.73	5.99	6.14	6.55	5.93	5.94	6.08	6.35
Gly	2.06	1.70	1.71	1.76	2.11	1.70	1.64	1.67
Ala	7.27	7.13	6.99	7.08	7.42	6.99	6.88	6.93
Cys	3.87	2.20	1.44	0.91	2.40	1.99	0.84	0.15
Val	5.22	5.89	6.63	6.89	4.51	5.72	6.64	6.78
Met	3.93	3.92	3.80	3.66	4.04	3.70	3.73	3.61
Ile	2.16	2.41	2.52	2.62	1.35	2.21	2.51	2.58
Leu	1.64	1.66	1.64	1.71	1.64	1.62	1.67	1.68
Tyr	6.47	6.70	6.93	6.98	6.63	6.86	6.87	6.85
Phe	3.05	3.12	3.32	3.46	3.11	3.09	3.16	3.24
Lys	9.80	9.37	9.45	9.72	9.99	9.47	9.28	9.31
His	3.17	3.23	4.03	4.11	3.22	4.13	4.13	4.17
Arg	4.20	4.33	4.45	4.58	4.29	4.40	4.57	4.57

Data expressed as in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Amino acid composition of bovine ribonuclease

Bovine ribonuclease was hydrolysed with 6 M HCl at 110°C for 24 h, 3 M MES-OH at 125°C for 24 h and 3 M MES-OH at 160, 170 and 180°C for different times (15–90 min). The amino acid compositions of ribonuclease after the two 24-h hydrolyses and at elevated temperatures for shorter times are given in Tables 1 and 2. The results in Table 1 shows that the conventionally used 6 M HCl at 110°C and the MES-OH hydrolysis method at 125°C gave very similar results, except for the two very sensitive amino acids (threonine and methionine). For these amino acids, the 3 M MES-OH method gave higher results than the 6 M HCl method. Using the MES-OH hydrolysis method, it was found that the cystine content of the sample was reduced to cysteine and the free SH group of cysteine can react with the SH group of MES-OH, resulting in the formation of a small amount of 2-amino-3-(2-sulphoethylthio)propionic acid. A further finding was that, using MES-OH hydrolysis, the cysteine (formed from the cystine) appeared in the chromatogram in the place of proline and, particularly with proteins of high cystine content, this resulted in incorrect proline determinations.

As can be seen from the results in Table 1, 45 min was not a sufficient time to hydrolyse all of the peptide bonds, shorter hydrolysis times yielded incomplete recoveries of several amino acids (valine, leucine, isoleucine) and 60 min at 160°C was not sufficient for total cleavage of the peptide bonds adjacent to valine. The results of hydrolysis at 160°C for 60 min were very similar (except for valine) to those of conventionally used hydrolysis methods. The recovery of valine was close to 100% only with hydrolysis at 160°C for 90 min. At 170 and 180°C, 60 and 45 min, respectively, were needed for the total hydrolysis of peptide bonds. The higher temperatures did not yield decreased amounts of threonine and methionine.

In summary, it can be stated that the optimum hydrolysis times for all amino acids were 90, 60 and 45 min at 160, 170 and 180°C, respectively.

With shorter times, the recoveries of valine and isoleucine were much lower, but those of threonine and methionine did not change.

3.2. Recovery of free tryptophan

In Table 3, the recoveries of free tryptophan after treatment with 3 M MES-OH at various temperatures for various times are shown. The tryptophan completely decomposed during acidic hydrolysis, but 93.2% of tryptophan remained unchanged after hydrolysis at 125°C for 24 h. This is very similar to the results obtained with hydrolysis at 160°C for 90 min, 170°C for 60 min and 180°C for 45 min. With increasing temperature and hydrolysis time, the decomposition of free tryptophan increased. However, at the highest temperature and longest hydrolysis time (180°C for 60 min), 91.2% of free tryptophan remain unchanged. Accordingly, the decomposition rate of tryptophan at lower temperatures and longer times is very similar to that at higher temperatures and shorter times.

Table 3
Recovery (%) of free tryptophan

Hydrolysis conditions	Hydrolysis time	Recovery of tryptophan (%) ^a
6 M HCl, 110°C	24 h	–
3 M MES-OH, 125°C	24 h	93.2
3 M MES-OH, 160°C	15 min	99.8
	30 min	98.3
	45 min	96.4
	60 min	95.2
	90 min	93.1
3 M MES-OH, 170°C	30 min	96.2
	45 min	95.3
	60 min	94.8
	90 min	92.1
3 M MES-OH, 180°C	15 min	94.3
	30 min	94.1
	45 min	93.1
	60 min	91.2

Theoretical value tryptophan content = 7.41 g per 100 g protein.

^a Mean of three runs.

Table 4
Tryptophan contents of lysozyme using various hydrolysis methods

	160°C for			170°C for			180°C for		
	45 min	60 min	90 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min	45 min
Tryptophan content found (g per 100 g protein) ^a	7.18	7.03	6.94	7.09	6.94	6.82	7.08	6.91	6.74
Tryptophan recovery (%) ^a	96.9	94.9	93.7	95.7	93.7	92.0	95.5	93.3	90.9

Theoretical value tryptophan content = 7.41 g per 100 g protein.

^a Mean of three runs.

Table 5
Tryptophan contents of cytochrome *c* using various hydrolysis methods

Hydrolysis	160°C for			170°C for			180°C for		
	45 min	60 min	90 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min	45 min
Tryptophan content found (g per 100 g protein) ^a	1.49	1.44	1.40	1.42	1.39	1.37	1.38	1.36	1.29
Tryptophan recovery (%) ^a	96.1	92.9	90.3	91.6	89.7	88.4	89.0	87.7	83.2

Theoretical value tryptophan content = 1.55 g per 100 g protein.

^a Mean of three runs.

Table 6
Amino acid composition of milk powder hydrolysed by MES-OH at different temperatures for different times

Amino acid	6 M HCl, 110°C for 24 h	3 M MES-OH, 125°C for 24 h	MES-OH, 160°C for			MES-OH, 170°C for		MES-OH, 180°C for	
			30 min	45 min	60 min	45 min	60 min	30 min	45 min
Asp	10.4	9.2	9.5	9.4	9.2	9.3	9.7	9.6	9.7
Thr	4.3	4.3	4.6	4.4	4.3	4.4	4.3	4.3	4.2
Ser	6.2	6.4	6.6	6.4	6.4	6.4	6.2	6.3	6.2
Glu	21.2	20.1	21.0	20.6	20.5	21.1	20.8	20.5	20.8
Pro	7.7	8.1	8.0	8.0	8.0	8.2	8.1	8.1	8.2
Gly	1.9	1.7	1.8	1.7	1.7	1.8	1.8	1.9	1.8
Ala	3.2	3.3	3.3	3.2	3.3	3.2	3.2	3.3	3.3
Cys	0.7	–	0.4	0.1	–	0.2	–	–	–
Val	4.1	4.5	3.7	4.3	4.5	4.3	4.4	4.4	4.5
Met	1.8	2.2	2.3	2.3	2.2	2.2	2.1	2.2	2.1
Ile	3.8	4.6	3.7	4.2	4.5	4.3	4.5	4.4	4.6
Leu	9.7	9.7	9.3	9.5	9.6	9.5	9.6	9.6	9.4
Tyr	4.3	4.8	4.9	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.6
Phe	4.7	4.6	4.8	4.8	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
Lys	8.4	8.2	8.2	8.2	8.1	8.0	8.0	8.1	8.0
His	2.4	2.6	2.3	2.6	2.6	2.3	2.5	2.4	2.4
Arg	5.2	4.4	4.2	4.3	4.5	4.1	4.2	4.3	4.5
Trp	–	1.30	1.34	1.29	1.27	1.29	1.14	1.09	1.01
Recovery (%) ^a									
Trp	0	100	103.1	99.2	97.7	99.2	87.7	83.9	77.7
Met	81.0	100	104.5	104.5	100	100	95.4	100	95.4

Results expressed in Table 1.

^a Hydrolysis at 125°C for 24 h with 3 M MES-OH = 100%.

3.3. Analysis of tryptophan-containing pure proteins

Lysozyme and cytochrome *c* were hydrolysed with 3 M MES-OH at various temperatures and for various times and the results are given in Tables 4 and 5. In the higher tryptophan-containing lysozyme, the recovery of tryptophan was higher than that found for cytochrome *c*. Similarly to the results for the recovery of free tryptophan, it can be stated that, with increasing temperature and hydrolysis time, the decomposition of tryptophan will be higher. It seems that the optimum hydrolysis conditions for tryptophan determination would be a shorter time and a lower temperature, such as 160°C for 45 min or 170°C for 30 min. The recovery of tryptophan from cytochrome *c* with hydrolysis at 180°C for 15 min was only 89.0%. When choosing the optimum hydrolysis time and temperature, one must consider that a lower temperature and a shorter hydrolysis time may not be sufficient to cleave the peptide bonds between hydrophobic amino acids.

3.4. Analysis of milk powder

The tryptophan contents of milk powder following various methods of hydrolysis are presented in Table 6. The 6 M HCl (110°C for 24 h) and the 3 M MES-OH (125°C for 24 h) hydrolysis methods gave very similar results for the amino acid composition of milk powder except for methionine and cystine. The methionine content of milk powder is higher after 3 M MES-OH hydrolysis owing to the reducing effect of MES-OH. The cystine content of milk powder cannot be determined by the MES-OH hydrolysis method because the cystine content of the milk protein will be reduced to cysteine and this amino acid appears in the chromatogram in the same position as proline. Fortunately, with milk powder the very low cystine content does not seriously affect the determination of proline. The reduction of cystine to cysteine is influenced by the time and temperature of hydrolysis. With hydrolysis at 160°C for 30 and 45 min and at 170°C for 45 min, part of the cystine can be determined after 3 M MES-OH hydrolysis. After longer times and/or

higher temperatures of hydrolysis, most of the cystine will be converted into cysteine.

As can be seen from the results in Table 6, 30 or 45 min is not sufficient to hydrolyse the peptide bonds adjacent to valine and isoleucine. The results of hydrolysis at 160°C for 60 min are very similar to those with 6 M HCl at 110°C for 24 h and 3 M MES-OH at 125°C for 24 h. The recoveries of aliphatic amino acids were also very good. The methionine and threonine contents of milk protein decreased with increasing hydrolysis time and/or temperature. These decreases were small and the methionine content of milk protein was higher at the highest temperature and longest hydrolysis time than the values obtained by the 6 M HCl hydrolysis method. The recovery of methionine with hydrolysis at elevated temperature for a short time was higher than that obtained with hydrolysis at 125°C for 24 h.

The recovery of tryptophan was lower with a longer hydrolysis time and/or higher temperature than with hydrolysis at 125°C for 24 h. It seems that 180°C is too high for tryptophan determination. The optimum hydrolysis conditions for tryptophan determination are 160°C for 30, 45 or 60 min or 170°C for 45 min.

In conclusion, high-temperature hydrolysis with 3 M MES-OH was successfully applied to the amino acid analysis of pure proteins and milk powder with high carbohydrate content. The aim of these investigations was to introduce a rapid method that is suitable for the complete hydrolysis of protein and with a hydrolysate that is suitable for complete amino acid determination, including tryptophan. In the original method proposed by Penke et al. [8], the protein was hydrolysed with 3 M MES-OH at 110°C for 24 and 72 h, similarly to the conventionally used 6 M HCl hydrolysis. In this work, it was found that a higher temperature and shorter time yielded results that were very similar to those in the original methods. In some instances (such as tryptophan and methionine determination with hydrolysis at 160 or 170°C for 15–80 min), the results were superior to those obtained with the original method. The great disadvantage of this method is that MES-OH reduces cystine into cysteine, which appears in the chromatogram at the position of

proline and this, particularly with proteins with a high cystine content, may give false results for proline determination.

4. Acknowledgement

The authors greatly appreciate the editorial assistance of Dr. Truman G. Martin (Visiting Professor at PANNON Agricultural University, Kaposvár, and Professor of Animal Science at Purdue University).

5. References

- [1] T.W. Goodwin and R.A. Morton, *Biochem. J.*, 40 (1946) 628.
- [2] W.L. Bencze and K. Schmid, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1193.
- [3] A. Dreze, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38 (1956) 243.
- [4] F.J. Oelshlegel, J.R. Schroeder and M.A. Stahmann, *Anal. Biochem.*, 34 (1970) 331.
- [5] H. Matsubara and R.M. Sasaki, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 35 (1969) 157.
- [6] T.Y. Liu and Y.H. Chang, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 2842.
- [7] R.J. Simpson, M.R. Neuberger and T.Y. Liu, *J. Biol. Chem.*, 251 (1976) 1936.
- [8] B. Penke, R. Ferenczy and K. Kovács, *Anal. Biochem.*, 60 (1974) 45.
- [9] J. Csapó, B. Penke, I. Tóth-Pósfai and Zs. Csapó-Kiss, *Acta Aliment.*, 15 (1986) 227.
- [10] S.H. Chiou and K.T. Wang, *J. Chromatogr.*, 448 (1988) 404.
- [11] S.T. Chen, S.H. Wu and K.T. Wang, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 33 (1989) 73.
- [12] S.T. Chen, S.H. Chiou, Y.H. Chu, and K.T. Wang, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 30 (1987) 572.
- [13] M.V. Pickering and P. Newton, *BioSeparations*, 3 (1992) 10.
- [14] A. Tsugita, and J.J. Scheffler, *Eur. J. Biochem.*, 124 (1982) 585.
- [15] S. Moore and W.H. Stein, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 893.
- [16] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss and I. Tóth-Pósfai, *Acta Aliment.*, 15 (1986) 3.

Use of amino acids and their racemisation for age determination in archaeometry

J. Csapó*, Zs. Csapó-Kiss

PANNON Agricultural University Faculty of Animal Science, P.O. Box 16, Guba S. u. 40, H-7401 Kaposvár, Hungary

J. Csapó Jr.

Janus Pannonius University Faculty of Natural Sciences, Natural Geography Department, Ifjuság u. 6, H-7624 Pécs, Hungary

After reviewing previous attempts to use the extent of amino acid racemisation (AAR) for the determination of the age of archaeological samples containing proteins, the authors describe their own approach. Following an optimised protein hydrolysis with low racemisation the D- and L-amino acid content in fossil bone samples of known age (radiocarbon method) was determined by HPLC after pre-column derivatisation. Based on the obtained half-lives of racemisation and plotting the D/L ratio as a function of time for various amino acids, calibration curves are obtained which can be used for the age determination of fossil bone samples in the range of 2000–500 000 years. Another method is presented for the determination of age of textiles in the range of 100–1800 years. This method is based on

the determination by an amino acid analyser of the age-dependent alteration of amino acid composition of proteins. Cystine, methionine and tyrosine content decreases, while cysteic acid content increases with age. Prediction equations were developed as linear regressions of the age of wool based on cysteic acid, cystine and tyrosine contents. ©1998 Elsevier Science B.V.

Keywords: Amino acid racemisation; Racemisation; Archaeometry

1. Introduction

1.1. Amino acid racemisation

This article is a survey of the possibilities of determining the age of archaeological samples that contain

*Corresponding author.

proteins on the basis of transformations of the amino acids therein.

The first possibility is to base the age determination on the extent of racemisation of the L-amino acids which are the constituents of native proteins. Amino acid contents in fossil shell, bone and tooth samples from antiquity were reported first by Abelson [1] in 1954. In 1967, Hare and Abelson [2] reported that D-amino acids in fossils resulted from conversion of L-amino acids of protein. It was found that the older the fossil the higher the D/L ratio and, after a certain age, amino acids occurred in racemic form. The ratio of D-allo isoleucine and L-isoleucine content in a fossilised shell sample was found to be 0.32 and the fossil was estimated to be 70 000 years old, as reported by Hare and Mitterer [3] in 1968. This is considered to be the first application of amino acid racemisation (AAR) – or rather epimerisation – in geochronology.

Subsequently, racemisation of amino acids was used for the age determination of various materials containing protein [4–8, 22, 24]. Isoleucine was given special attention because L-isoleucine – containing two chiral centres – can be easily separated from the diastereomeric D-allo isoleucine by an amino acid analyser. Recently Miller et al. [23] used amino acid racemisation to determine the integrated temperature exposure during a long period of time.

However, some errors in age determination based on AAR were reported by Williams and Smith [5] in 1977. Temperature, pH, soil composition and various contaminants should also be considered when estimating the age of fossil bone samples. Recently Marshall [9] established that bones are not reliable materials for AAR testing, particularly if they come from a warm environment. The statement was based on differences observed between the age of Californian bones determined by ^{14}C accelerator mass spectrometry (5000–6000 years) and by AAR (50 000–60 000 years). Milford Wolpoff, a paleoanthropologist, expressed the opinion (cited by Marshall [9]) that many people currently regard AAR as “some kind of joke”.

Since various changes in temperature during the past and other conditions influencing dead biological specimens are not well known, the reaction temperature of racemisation can only be estimated and not accurately determined. For this reason in this study contents of D- and L-amino acids and their ratio were first determined in samples of known age (as determined by the radiocarbon method). These data were then compared with data obtained from the analysis of amino acids in samples of unknown age. To make the

comparison more accurate, the antecedents of samples of known age when analysed were the same as or similar to those of unknown age. All of the samples analysed in this study originated from the same Hungarian environment. The samples were excavated from a depth of approximately 1.5–2.0 m (the depth is very important because of the temperature; the yearly average temperature at this depth is 11°C). The pH of the soil at this depth in most cases was very near to neutral and never exceeded 7.0 (the pH ranged between 5.5 and 6.8). Approximately 150 fossil bone samples previously analysed by the radiocarbon method were collected from various Hungarian museums, and their D- and L-amino acid contents were determined. The D/L ratio was plotted against time, which produced a calibration curve. This curve can be used for age estimation of samples of unknown age after their D- and L-amino acid contents have been determined. The D/L ratio for two or three amino acids was determined for each sample and the mean value of ages estimated from calibration curves was considered the true age of the fossil sample.

The determination of the D/L amino acid ratio in hydrolyzed proteins requires chromatographic methods which are suitable for the simultaneous separation and highly sensitive detection of several amino acids and their enantiomers.

1.2. Oxidation rates of certain amino acids

In the course of these studies it was found that for samples containing proteins with a low D/L amino acid ratio (fossils under the age of about 2000–3000 years) it is not possible to achieve reliable data for their age. (The reason for this is mainly the racemisation during the hydrolysis step prior to the enantiomeric separation of the amino acids. This problem will be discussed below.) Another possibility for the age determination is to base the measurements on the changes in the amino acid composition of the aged samples. The basis for using the amino acids for age determination is that the two sulphur-containing amino acids are sensitive to oxidation both in the free state and when bound in peptide. Further, depending on environmental conditions, cystine may decompose into alanine, homocysteine, homocystine and glycine [10, 11]. Methionine may also be considerably degraded by being oxidised to methionine sulphone and sulfoxide [12]. In order to eliminate analytical problems due to the above [10, 11], Moore and Stein [13] and Hirs [14] devised methods for the determination of the two sulphurous amino acids in the oxidised state. Because

of the low content of sulphurous amino acids in collagen, which is the main protein constituent of bone, the methods based on the determination of their changes were found to be unsuitable for its age measurement. At the same time, however, calibration curves obtained on the basis of the changes in cystine, cysteic acid, methionine and tyrosine content as a function of their age enabled us – for the first time in the history of the archaeometry – to determine the age of wool carpets and textiles [19].

1.3. Amino acid determination method

In order to be able to measure the changes of the amino acid composition and/or the enantiomeric ratio of the individual amino acids in very small archaeological samples, the use of the highly selective and sensitive high-performance liquid chromatography method (HPLC) is inevitable. Precolumn derivatisation of α -amino acids using *o*-phthalic aldehyde (OPA) and various thiols as the reagents leads to fluorescent formed derivatives, while another reagent, 9-fluorenyl-methyl chloroformate (FMOC-Cl), transforms α -amino and imino acids to fluorometrically active derivatives. Both types of derivatives have good chromatographic properties, enabling several amino acids to be separated and measured within one chromatographic run at very low concentration levels.

If the aim is the enantiomeric separation of amino acids, a chiral derivatisation agent should be used to transform the amino acid enantiomers to pairs of diastereomeric derivatives separable on achiral HPLC columns. The chiral 1-(9-fluorenyl)-ethyl chloroformate (FLEC) reagent [20] and also the OPA/thiol reagent are suitable for this purpose if a chiral thiol is used in the latter case [16]. If the aim is only the separation of the isoleucine and D-allo isoleucine, no precolumn derivatisation is necessary since they are diastereoisomers, and the separation and quantitation can be made with the amino acid analyser without chiral selectors.

The prerequisite of a successful chromatographic analysis of archaeological samples is the complete hydrolysis of the protein content. All hydrolyses were carried out using 6 M hydrochloric acid. If the aim is the determination of the enantiomeric ratio, it is very important to keep the extent of racemisation at the lowest possible level. The effect of the reaction times and temperatures on the extent of the hydrolysis and racemisation have been carefully investigated.

1.4. Hydrolysis of proteins with reduced racemisation

The following materials were used for testing the racemisation during hydrolysis: bovine ribonuclease, lysozyme, cytochrome *c*, fossil bone sample, and individual free amino acids as follows: L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-threonine, L-alanine, L-valine, L-phenylalanine, L-histidine and L-tryptophan. The classical Moore and Stein [15] method using 6 M hydrochloric acid medium for 24 h at 110°C was compared with hydrolysis in the same medium but at higher temperature (160–180°C) with shorter reaction times (15–60 min) using closed Pyrex tubes as reaction vessels. The use of a microwave oven was also attempted. The method of Einarson et al. [16] was used to monitor the racemisation (HPLC column: Kromasil C8 5 μm , 250 $\times$ 5.6 I.D.; eluent: gradient system A = 40% methanol in 9.5 mM phosphate buffer at pH 7.05, B = acetonitrile; precolumn derivatisation reagent: *o*-phthalaldehyde/2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside (OPA/TATG)).

The following results were obtained:

- In contrast to 24 h at 110°C much shorter reaction times are necessary to achieve complete hydrolysis (splitting even the most stable bonds adjacent to Val, Ile and Leu): 60 min at 160°C, 45 min at 170°C, and 30 min at 180°C.
- The rate of the racemisation in the course of the hydrochloride acid-catalysed protein hydrolysis decreases in the following order: aspartic acid, glutamic acid, threonine, phenylalanine, alanine, valine, histidine, as shown in Fig. 1 with the example of bovine ribonuclease and in Table 1 with the examples of lysozyme, cytochrome and bone sample. Tryptophan was almost completely decomposed under the examined conditions [18, 21].
- The rate of racemisation of peptide-bound amino acids in 6 M hydrochloric acid between 110 and 170°C is 4–7 times higher than that of the free amino acids.
- Microwave-promoted hydrolysis is advantageous if racemisation is of no importance. It is, however, definitely disadvantageous if the aim is to keep racemisation as low as possible.
- As seen in Table 1, the racemisation at high temperatures and short reaction times is 20–55% lower than at 110°C for 24 h. It is especially advantageous to run the hydrolysis at 160°C for 60 min or at 170°C for 45 min. These conditions have

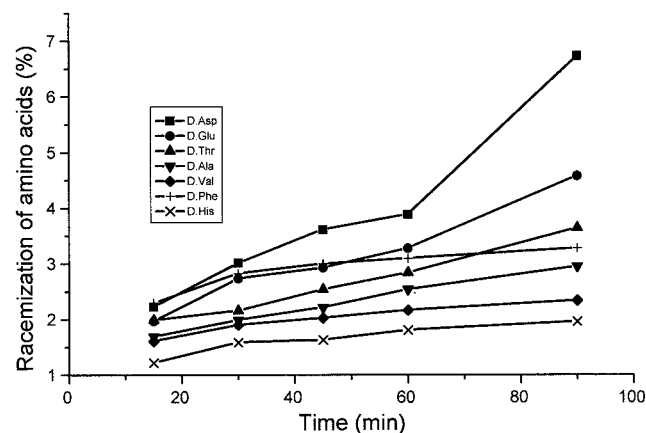


Fig. 1. D-Amino acid content of bovine ribonuclease hydrolysed by 6 M HCl at 170°C.

been selected for the age determination experiments.

2. Age determinations of fossil bones

2.1. Epimerisation of isoleucine

The bone samples were washed in running distilled water, dried in a vacuum drying oven and ground to produce powder material as fine as flour. Apolar contaminants were removed with petroleum ether in a Soxhlet extractor. The free amino acids were extracted by 0.1 M HCl solution for 16 h. The nitrogen content of the residue was determined by a Kjeld-Foss nitrogen

analyser. Sample size (200–2000 mg residual material containing approx. 10–20 mg protein) was dependent on nitrogen content. Samples were weighed and hydrolysed with 6 M HCl at 170°C for 30 min. The sample was then lyophilised, the residue was dissolved in water, and the precipitated silicate compounds were separated from the liquid containing free amino acids by centrifugation. The solution was alkalisied to pH 9 and the precipitated metal hydroxides were filtered off. The hydrolysed solution was neutralised and evaporated to dryness by lyophilisation. An aliquot of hydrolysed material was dissolved in a citrate buffer solution of pH 2.2, and isoleucine and D-allo isoleucine were determined by LKB 4101 type amino acid analyser as described by Csapó et al. [17].

Table 1
D-Amino acid content of lysozyme (A), cytochrome (B) and fossil bone (C) hydrolysed by 6 M hydrochloric acid at different temperatures for different times

Amino acid	110°C for 24 h			160°C for 60 min			170°C for 45 min			180°C for 30 min		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Asp	6.62	7.01	7.89	3.27	3.42	4.15	3.29	3.57	4.42	3.84	3.99	4.67
Glu	4.58	4.61	5.93	2.79	2.84	3.61	2.81	2.89	3.74	3.51	3.63	3.92
Thr	3.62	3.74	4.38	2.29	2.31	3.14	2.11	2.23	3.04	2.87	3.14	3.42
Ala	2.99	3.21	4.02	1.69	1.65	2.13	1.72	1.77	2.11	2.81	2.89	3.04
Val	2.11	2.24	2.53	1.69	1.84	2.33	1.71	1.82	2.27	2.54	2.57	2.82
Phe	3.31	3.42	3.64	3.19	3.37	3.57	2.89	3.11	3.60	2.97	2.83	3.20
His	1.83	1.89	2.38	1.64	1.67	2.01	1.52	1.60	1.99	1.79	1.93	2.11

The values refer to the percentage of racemisation expressed as the ratio $[D/(D+L)] \times 100$. Each value is the mean of triplicate determinations.

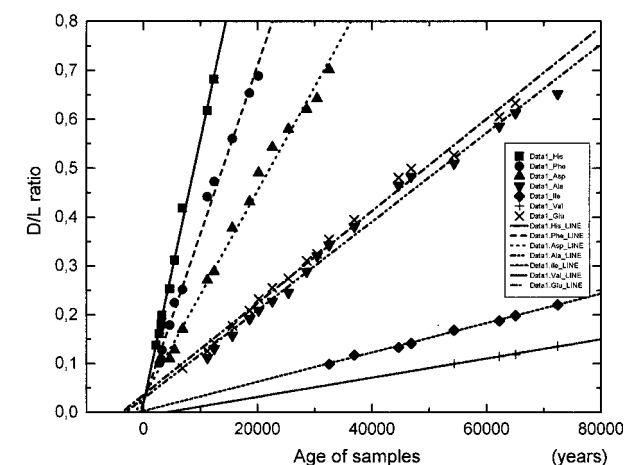


Fig. 2. D/L ratios for various amino acids in fossil samples as a function of their ages determined by the radiocarbon method.

2.2. Racemised amino acids determined with HPLC

The other D- and L-amino acids were separated by the method of Einarsson et al. [16]. The data obtained from the analyses of 24 fossil bone samples of known age from various Hungarian museums are summarised in Fig. 2. As is seen, a linear relationship was found between the D/L ratio and the age of the samples determined by the radiocarbon method. Seven amino acids (His = histidine, Phe = phenylalanine, Asp = aspartic acid, Glu = glutamic acid, Ala = alanine, Ile = isoleucine, Val = valine) were investigated. These may be considered the most suitable for age determination because some of them show very fast racemisation (His, Phe, Asp), while others show medium (Glu and Ala) and very slow racemisation (Ile, Val). Analytical data for other amino acids analysed are not presented in Fig. 2 in order to make it more synoptic. None of the ratios lower than 0.1 or higher than 0.7 are presented in Fig. 2 because, in these cases, the accuracy of the age determination was doubtful. The half-life of amino acid racemisation, i.e. the time required for the ratio of D- to L-amino acids to reach 0.333, was calculated by interpolation or extrapolation from the data of Fig. 2 and is presented in Table 2. The temperature of the samples during burying was approximately 11°C, while the pH of the soil in the surroundings of the bone was between 5.5 and 6.8.

From the data of Table 2 and Fig. 2 it is evident that D-His, D-Phe, D-Asp, D-Glu and D-Ala contents can be used for the age determination of samples which are 2000–12 000, 3000–20 000, 5000–35 000, 8000–70 000 and 10 000–80 000 years old, respectively. The age of samples older than 30 000 and 50 000 years can be determined on the basis of Ile and Val content, respectively. Data presented in Fig. 2 were corrected (reduced) with the D-amino acid content of fresh pig bone to eliminate the errors of analysis. Con-

Table 2
Half-lives of racemisation and epimerisation of various amino acids found in Hungarian fossil bone samples

Amino acid	Half-life (years)
Histidine	5 500
Phenylalanine	8 500
Tyrosine	8 600
Aspartic acid	13 500
Serine	16 500
Threonine	17 000
Glutamic acid	28 500
Alanine	32 000
Isoleucine	110 000
Leucine	140 000
Valine	180 000

The half-life of amino acid racemisation, i.e. the time required for the ratio of D- to L-amino acids to reach 0.333, was calculated from the data in Fig. 2. The temperature of the samples during burying was approximately 11°C, while the pH of the soil in the surroundings of the bone was between 5.5 and 6.8.

centrations of the D-form of the other amino acids were negligible. However, all analyses were corrected for the small concentrations present in fresh pig bone.

Studying the calibration curves, it can be concluded that when the D/L ratio is lower than 0.1, the D-amino acid content is too low and age determination is uncertain. It is obvious that the calibration curves can be used for age determination most satisfactorily in the linear range between 0.1 and 0.5 (where D-amino acids are present in easily detectable amounts). The optimum D/L ratio for each sample can be found by analysing the amino acids best suited for age determination: e.g. for fossil bone samples of 11 200 years of age the D/L ratios for His, Phe, Asp and Ala are 0.682, 0.473, 0.271 and 0.112, respectively. In this case the D/L ratios of Phe and Asp are recommended for determining the age of samples; however, the D/L ratios of His and Ala can be used to confirm the estimate based on the ratios of Phe and Asp.

The applicability of calibration curves is presented finally. As an example, one bone sample, the age of which was unknown and originating from the end of the Neolithic Age or the beginning of the Copper Age according to the archaeologists, was analysed for L- and D-amino acids and the following results were obtained (the unknown sample was excavated from a depth of 1.85 m and the pH of the soil was 6.50):

L-His: 0.0697 mg, D-His: 0.0289 mg,
D/L_{His} = 0.428.

Age calculated from calibration curve:
7100 years; S.E.M. = 337.

L-Phe: 0.0543 mg, D-Phe: 0.0138 mg,
D/L_{Phe} = 0.254.

Age calculated from calibration curve:
6950 years; S.E.M. = 191.

L-Asp: 0.1346 mg, D-Asp: 0.0245 mg,
D/L_{Asp} = 0.182.

Age calculated from calibration curve:
6900 years; S.E.M. = 465.

The estimated age of the sample is the mean value of the above estimates, or 6980 years. This mean value has a standard error of 202 years and the 95% confidence interval would be 6554–7406 years.

Of course the described method includes the analytical error of age estimation by the ¹⁴C method, but the effects on AAR of temperature, pH and the com-

position of soil have been eliminated. The D/L ratio for two to four amino acids should be determined for each sample, and the mean value of estimated ages based on calibration curves is considered the best estimate of age of the fossil sample. We have utilised this method very successfully for dating fossil bone samples from Hungary. The difference between the data from the calibration curve and those from ¹⁴C dating was generally negligible. However, our calibration curves should not be used in other environments, due to different conditions (temperature, pH). However, based on these results, other calibration curves can be formulated for each environment on the basis of the methods described here.

The great advantage of this method compared to the other methods is the very small size of sample required: a 2–10-mg sample size containing 0.1–1.0 mg protein is sufficient for age determination based on AAR. The radiocarbon age determination method can be used only for those samples which are more recent than 80 000 years. By means of AAR (especially Ile, Leu and Val) the age of samples can be estimated up to 300 000–500 000 years.

3. Age estimation of old carpets based on cystine and cysteic acid content

In accordance with the statements above the age of old textiles (100–1800 years) is too low to use the amino acid racemisation methods for the dating. In this case, the other method outlined in Section 1, based on the estimation of the age-dependent degree of oxidative degradation of some of the amino acids in their proteins, can be used.

Samples of Copt textiles and wool carpets were procured from the Hungarian National Museum and the Hungarian Museum of Applied Arts. Samples from contemporary wool carpets originate from the Domus furniture and furnishing store in the city of Kaposvár. New wool of Hungarian Merino sheep was obtained directly from our experimental farm.

After the removal of mechanical impurities the wool fibres were washed three times with 40–60°C b.p. petroleum ether and following this, after the removal of the solvent in nitrogen current, with three portions of distilled water. The samples were then dried again in nitrogen current and stored in airtight containers until the time of analysis.

In contrast to the age determination based on amino acid racemisation, in this case it is not important to minimise the racemisation during the hydrolysis. It

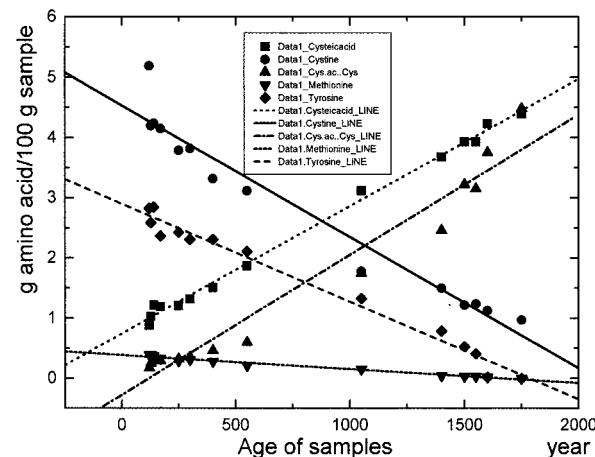


Fig. 3. The content of some amino acids in old textiles as a function of their ages.

is, however, most important to avoid the oxidation of the amino acids. Therefore the hydrolysis with 6 M hydrochloric acid was carried out at 110°C with the complete exclusion of atmospheric oxygen. Careful optimisation of the reaction conditions has shown that the usual hydrolysis of 24 h is not sufficient and a reaction time of 48 h is necessary to achieve complete hydrolysis of the proteins in the textiles. The hydrolysis of the samples (20 mg in the case of contemporary wool and carpets and down to 6 mg in the case of ancient wool carpets) was carried out in reusable Pyrex hydrolysis tubes (8 mm I.D.) in 5 ml of 6 M hydrochloric acid. Before the tubes were sealed, nitrogen was bubbled through them for 5 min with the aid of a glass capillary. After the hydrolysis the pH of the solution was adjusted to 2.2 using 4 M sodium hydroxide under cooling with salt/ice mixture. The resulting solution was diluted with citrate buffer of pH 2.2 and analysed with an LKB 4101 automatic amino acid analyser [17].

Fig. 3 shows the correlation between the content of some of the amino acids, amino acid oxidation products, their ratio and the age of the wool sample. The linear relationship is suitable to serve as the basis for the age estimation of unknown samples. An important difference between Figs. 2 and 3 is that in the case of the former the age on the x-axis was determined by the radiocarbon method, while in the latter case the age of 13 samples was presented by archaeologists who knew the origin of the objects from which the samples had

been taken. Note that in the case of fabric originating from ancient clothing or decorations, due to the limited sample size available for the analysis only single determinations could be carried out while in the case of carpet samples we had adequate amounts of sample for duplicate determinations.

It is also evident from Fig. 3 that as age increased cysteic acid content increased and cystine content decreased. When compared with contemporary wool, the cysteic acid contents were approximately 10, 20 and 30 times as great at 500, 1000 and 1700 years, respectively. Cystine content decreased to less than 50% in 120–140 years, to 35% in 500 years and to 10% in 1600–1700 years. The differences are even greater when expressed as a ratio of cysteic acid/cystine. The 1600–1700-year-old samples had a ratio more than 100 times as great as that of modern carpets.

Both methionine and tyrosine contents decreased with age. In the 1750-year-old wool fibre and one of the 1600-year-old wool fibres we were unable to detect the presence of either tyrosine or methionine. The methionine content of the samples decreased to 85% of the original level in 100–140 years, to 55% in 400–500 years and to almost nil in 1600–1700 years. Tyrosine decreased by 10–15% in 100–140 years, by 30% in 400–500 years, and was almost completely decomposed at 1600–1700 years.

Linear regression equations, correlations and standard errors of estimate for the regressions of age on amino acid contents were calculated. Based on the



Analytica Chimica Acta 300 (1995) 313–320

ANALYTICA
CHIMICA
ACTA

Age estimation of old carpets based on cystine and cysteic acid content

János Csapó ^{a,*}, Zsuzsanna Csapó-Kiss ^a, Truman G. Martin ^b, Staffan Folestad ^c,
Owe Orwar ^c, Anna Tivesten ^c, Sándor Némethy ^d

^a PANNON Agricultural University, Faculty of Animal Science, P.O. Box 16, Dénesmajor 2, H-7401 Kaposvár, Hungary

^b Department of Animal Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA

^c Department of Analytical and Marine Chemistry, University of Göteborg and Chalmers University of Technology, S-412 96 Göteborg, Sweden

^d Department of Marine Geology, University of Göteborg and Chalmers University of Technology, S-412 96 Göteborg, Sweden

Received 19 January 1994; revised manuscript received 8 August 1994

Abstract

A method for the evaluation of the age of wool carpets and textiles was developed based on the age dependent alteration of amino acid composition of proteins. Samples of 23 wool carpets and textiles of known age, obtained from the Hungarian Museum of Industrial Arts and the Hungarian National Museum were analysed for amino acid content. Results were compared with data obtained for contemporary, untreated wool and wool carpet. The cysteic acid content of wool increases with age. The contemporary wool carpet contained 0.31 g of cysteic acid in 100 g of protein. Comparable figures were 1.87 g for a 550-year old carpet and 4.01–4.39 g for the 1600–1750 year old wool carpets. The cystine content decreased with age, the corresponding figures being 7.88, 3.12 and 1.19–0.97 g/100 g, respectively. Corresponding contents of methionine were 0.43, 0.21 and 0.20–0.00 g/100 g and for tyrosine 3.07, 2.11 and 0.20–0.00 g/100 g. Prediction equations were developed as linear regressions of the age of wool on cysteic acid, cystine and tyrosine contents. The 95% confidence intervals of estimates for two samples of unknown age were estimates plus or minus 30 and 38 years.

Keywords: Age estimation; Cysteic acid; Cystine; Methionine; Tyrosine; Wool

1. Introduction

Earlier publications [1,2] report on the investigation of racemization of amino acids, and it was found that samples whose protein contents were less than 2000–3000 years of age (mostly bones) were unsuitable for age determination using racemization. Examination of the amino acid composition of these samples revealed that the majority of cystine had decomposed or oxidised

to cysteic acid while tyrosine and methionine had all but disappeared from these ancient samples. Based on these findings, it was assumed that there must be a correlation between the age of the ‘recent’ bone samples and their cystine, cysteic acid, methionine and tyrosine contents. After analysing some 50 bone samples, it was realised that the main protein constituent of bone (collagen) has a low concentration of sulphur-containing amino acids and that this method cannot be used for age estimation. Following this conclusion, the amino acid contents of various wool carpets and textiles

* Corresponding author.

314

J. Csapó et al. / *Analytica Chimica Acta* 300 (1995) 313–320

of known age were examined to investigate possible links between amino acid contents (cystine, cysteic acid, methionine, tyrosine) and age. In a review of publications found in archaeometry journals, no references to the use of amino acid composition for the determination of age were found.

The basis for using the amino acids for age determination is that the two sulphur containing amino acids are sensitive to oxidation both in the free state and when bound in peptide. Further, depending on environmental conditions, cystine may decompose into alanine, homocystine and glycine [3] or it may transform into homocysteine, homocystine and glycine [4]. Methionine may also be considerably degraded by being oxidised to methionine sulfone and sulfoxide [5]. In order to eliminate analytical problems due to the facts outlined above, a method was devised [6–8] for the determination of the two sulphur-containing amino acids in the oxidised state. This method has yielded considerably better results than determinations in the unoxidised state.

2. Experimental

2.1. The analysed materials

Samples of copt textiles and wool carpets of various ages were procured from the Hungarian National Museum and the Hungarian Museum of Industrial Arts. The samples are described in Tables 1 and 2. Taking care not to damage the textiles or carpets, portions of 20–100 mg were removed from the fabric for analysis. New wool of Hungarian merino sheep was obtained from our experimental farm. The new wool was untreated and was obtained directly from the sheep. The composition of the contemporary wool carpets was studied on carpets originating from the Domus Supermarket from the city of Kaposvár. The carpets were scratched with the fingernails until we collected ca. 2–3 g of sample per carpet.

The wool samples were treated in the following manner. After having cleaned the samples (both ancient and contemporary) from mechanical impurities, the wool fibres were washed three times with 40–60°C b.p. petroleum ether. During each washing the samples were left to soak in the ether for 20 min. Following this procedure, the samples were dried in a nitrogen current

(15 min), and then washed three times with distilled water. The samples were left to soak for 20 min during each washing cycle. Following washing with distilled water, the samples were dried again in a nitrogen current. The dry samples were stored in airtight containers until the time of analysis.

2.2. Hydrolysis and processing of the hydrolysate

Hydrolysis of the samples was performed in reusable Pyrex hydrolysis tubes (Pierce, Rockford, IL). The tubes had an internal diameter of 8 mm and could accommodate 8 ml of hydrolysing agent so that the liquid was not in contact with the PTFE sealing ring. In the case of contemporary wool and carpets, 20 mg samples were introduced into the hydrolysing tube. In the case of samples coming from ancient wool carpets minimal sample size was 6.2 mg. Prior to use, the Pyrex hydrolysing tubes were washed twice with 6 M hydrochloric acid and distilled water. After introducing the sample to be analysed, 5 ml of 6 M HCl was added and nitrogen was bubbled through the tubes with the aid of a glass capillary for 5 min. Immediately after bubbling, the tubes were sealed and hydrolysis was begun at 110°C. After hydrolysis, the tubes were allowed to cool to room temperature. After the tubes were opened, pH of the hydrolysate was adjusted to a value of 2.2, using 4 M NaOH. During pH adjustment, a salt/ice cooling mixture was used to maintain the temperature below 30°C. The resulting samples were diluted with a citrate buffer of pH 2.2. Samples were filtered and stored at –25°C until the time of analysis.

From preliminary experiments, it seemed that the normal period of 24 h was not sufficient for complete hydrolysis of wool proteins. After only 24 h of hydrolysis, there were several ninhydrin positive peaks which were difficult to assign, but appeared to be the result of incomplete hydrolysis. In a preliminary experiment wool samples were hydrolysed for 24, 48, 72, 96 and 120 h with 6 M HCl. The results were used to establish hydrolysis time for the main experiment.

2.3. Analysis of amino acids

Samples were analysed with the LKB 4101 (LKB Biochrom) automatic amino acid analyser. The amino acid standard and cysteic acid were obtained from Merck (Darmstadt). The analysis conditions were as

Table 1
Wool threads of copt textiles and carpets from the Hungarian Applied Arts Museum

Sample No.	Inventory number	Nature of sample	Period (century AD)	Age of the sample (years)	Origin of the sample
1.1.	7436	cloth	3(?)	1750	unknown
1.2.	7429	cloth	4–5	1600	from Baron Weisenbach (blue)
1.3.	7429	cloth	4–5	1600	from Baron Weisenbach (red)
1.4.	7414	cloth	4–5	1600	Forrer collection
1.5.	7469	gobelin	4–5	1600	from Becker F.
1.6.	7441	gobelin	5	1550	Forrer collection
1.7.	7475	gobelin	5	1550	Forrer collection
1.8.	7475	gobelin	5	1550	Forrer Collection (flax fibre?)
1.9.	7434	decoration of cloth	5–6	1500	Forrer collection
1.10.	9013	cloth	6–8	1400	Forrer collection (imitation?)
1.11.	7417	decoration of cloth	6–8	1400	Forrer collection
1.12.	8642	gobelin	6–8	1400	Forrer collection
1.13.	7416	decoration of cloth	6–8	1400	from Szavai E.
1.14.	843161	cloth	10	1050	unknown
1.15.	14940	carpet	15	550	Anatolia
1.16.	13751	carpet	16–17	400	Anatolia
1.17.	5025	carpet	19	140	Turkmen
1.18.	15440	gobelin	unknown	unknown	unknown

follows. Ion-exchange column: length 55 cm, diameter 6 mm; temperature, 55°C for 30 min, and 70°C to the end of the analysis. Ion-exchange resin: Chromex UA-8. Buffer A: pH 3.28, 0.2 M [Na⁺], 25 min. Buffer B: pH 4.25, 0.2 M [Na⁺], 30 min. Buffer C: pH 6.45, 1.2 M [Na⁺], 55 min. Sodium hydroxide: 0.4 M, 10 min. Equilibration: buffer A, 30 min.

The flow rates of the buffers were 50 ml/h, and the flow rate of ninhydrin was 25 ml/h. The other parameters were those recommended by the manufacturer of the amino acid analyser for amino acid analysis. The analysis of amino acids was performed according to the method described previously [9].

Table 2
Carpets from the Hungarian National Museum

Sample No.	Inventory number	Nature of sample	Period (century AD)	Age of the samples (years)	Origin of the samples
2.19.	69/9158	carpet	end of 16	400	Transylvania
2.20.	19487	carpet	end of 17	300	from Teleki M.
2.21.	—	carpet	middle of 18	250	from China (Ningxia)
2.22.	—	carpet	beginning of 19	170	Anatolia, Balikesir
2.23.	—	carpet	from 1865	128	—
2.24.	—	carpet	2nd half of 19	120	Caucasus
2.25.	—	carpet	unknown	unknown	unknown

2.4. Preliminary comparison of modern and older wool samples

Five samples each of modern wool, modern carpet and 550 year old carpet were subjected to amino acid analysis. The complete amino acid profile was determined on each of these samples. The contrasts of means

$$\frac{\text{Wool} + \text{Modern Carpet}}{2} - \text{Old Carpet}$$

were tested by the *t*-test.

Table 3
Amino acid composition (g amino acid/100 g protein) of wool samples of Hungarian Merino sheep after various hydrolysis times

Amino acids	Hydrolysis time (hours)				
	24 ^a	48 ^a	72 ^a	96 ^a	120 ^a
Cysteic acid	0.15	0.15	0.16	0.16	0.19
Aspartic acid (Asp)	7.3	7.4	8.0	8.3	8.3
Threonine (Thr)	6.2	5.9	6.0	6.1	6.2
Serine (Ser)	7.5	7.6	7.1	7.1	7.2
Glutamic acid (Glu)	11.3	12.7	15.0	15.4	15.5
Proline (Pro)	6.0	6.5	6.6	6.9	7.2
Glycine (Gly)	4.9	4.6	4.6	5.0	4.8
Alanine (Ala)	4.5	4.5	4.4	4.9	4.4
Cystine (Cys)	12.0	10.2	8.0	7.6	7.1
Valine (Val)	6.8	7.0	7.0	7.3	7.3
Methionine (Met)	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4
Isoleucine (Ile)	3.3	3.6	3.7	3.5	3.2
Leucine (Leu)	7.8	8.2	8.2	7.9	8.4
Tyrosine (Tyr)	3.5	2.9	2.4	1.4	1.2
Phenylalanine (Phe)	4.2	4.2	4.0	4.0	4.1
Lysine (Lys)	3.5	3.2	3.2	3.3	3.5
Histidine (His)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Arginine (Arg)	7.7	7.7	7.8	7.8	8.1
Ammonia	2.3	2.4	2.2	2.2	2.3

^a Number of the samples = 3.

2.5. Statistical analysis of the data

Based on the hypothesis that carpet age can be estimated from amino acid analysis, known age (*y*) was regressed on cysteic acid, cystine, methionine and tyrosine contents and on the ratio cysteic acid/cystine. The accuracies of the functions were measured by correlation between predicted age ($\hat{y}$) and actual age (*y*) and by the standard deviation of the difference (*y* – $\hat{y}$) designated as *s_{y,x}*.

3. Results and discussion

3.1. The influence of hydrolysis time on the amino acid composition of wool

The amino acid contents of the wool of Hungarian merino sheep, after being subjected to various hydrolysis times, are shown in Table 3. It may seem, from the data, that cystine is the only amino acid undergoing significant change as a result of changing hydrolysis times. However, regression analysis showed that there

were significant (*P* < .05) increases in levels of aspartic acid, glutamic acid, proline and valine associated with increased hydrolysis time. Significant (*P* < .05) decreases were seen for cystine and tyrosine. The very large decrease in cystine content (85% after 48 h, 72% after 72 h and 59% after 120 h) did not seem to be due to oxidation since cysteic acid content increased by only 27% in 120 h.

The trends of amino acids which changed with increased time of hydrolysis would suggest that as much as 72 h hydrolysis may be desirable. However, the ninhydrin positive peaks observed after 24 h were not observed after 48 h of hydrolysis. The decision was made to use 48 h hydrolysis in the remainder of this study.

3.2. Reliability of the analytical method

Considering the enormous difficulties encountered in obtaining samples and the high value of the material to be subjected to analysis, a preliminary trial was conducted to assess the reliability and accuracy of analytical methods. The amino acid compositions of contemporary wool, a contemporary wool carpet and a 550 year old wool carpet are shown in Table 4. Examining the amino acid compositions of contemporary wool and carpet, it is interesting to note that the fibres originating from the modern carpet contained twice as much cysteic acid and only 78% as much cystine as the virgin, untreated wool. The comparable differences with respect to the other amino acids were small. The situation changes substantially when we compare the composition of wool fibres from a 550 year old carpet with the mean composition of contemporary wool and carpet. The cysteic acid content of the ancient sample is strikingly higher than that in contemporary fibres (ca. 9 times). Also striking is the low cystine content, which is ca. one-third that of contemporary wools. The ancient wool fibre also contains more serine and glycine than contemporary samples. This may be correlated with the decomposition of cystine. Also worth mentioning are the lower tyrosine, methionine and lysine contents of the ancient wool. Another indicator of the partial decomposition of amino acids is the high ammonia content in the older carpet. With respect to the other amino acids, the three examined samples were very similar.

Table 4
Amino acid composition of Hungarian Merino sheep's wool, modern wool carpet and 550 year old carpet samples

Amino acid content (g AA/100 g protein)	Wool ^a		Modern carpet ^a		Old carpet ^{a,b}	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Cysteic acid	0.150	0.009	0.312	0.026	1.854 ^c	0.212
Asp	7.36	0.34	7.44	0.39	7.74	0.68
Thr	5.93	0.31	6.11	0.29	5.75	0.34
Ser	7.55	0.27	7.77	0.34	8.93 ^c	0.43
Glu	12.53	0.29	12.12	0.27	12.80	0.31
Pro	6.43	0.25	6.44	0.37	6.45	0.62
Gly	4.68	0.21	5.23	0.19	5.46 ^c	0.28
Ala	4.52	0.19	4.84	0.20	5.19	0.34
Cys	10.18	0.27	7.90	0.26	3.09 ^c	0.27
Val	7.02	0.33	7.27	0.41	7.23	0.52
Met	0.47	0.04	0.43	0.05	0.21 ^c	0.07
Ile	3.73	0.21	3.91	0.28	3.66	0.24
Leu	8.10	0.39	8.37	0.41	8.07	0.43
Tyr	3.02	0.27	3.14	0.30	2.08 ^c	0.38
Phe	4.22	0.35	4.36	0.41	4.28	0.49
Lys	3.29	0.21	3.49	0.26	2.72 ^c	0.37
His	0.76	0.18	0.68	0.10	0.51	0.15
Arg	7.68	0.63	7.94	0.72	7.84	1.03
Ammonia	2.38	0.21	2.25	0.24	6.15 ^c	0.49

^a Number of the samples = 5.

^b Estimated age = 550 years.

^c Significance of (wool + modern carpet/2) – old carpet has $P > 0.99$.

Comparison of the coefficients of variation (CV) for the three types of samples would indicate greater variability among samples of the older carpet than in the modern wools. However, virtually all of the increased CVs are associated with significant decreases in the means and relatively constant standard deviations. As a result, we can conclude that analytical precision is essentially equal for both type of samples.

3.3. Relationship of age of sample with cysteic acid, cystine, methionine and tyrosine contents

After the optimisation of hydrolysis time and the examination of reliability of the analytical method, samples obtained from the Hungarian Industrial Art Museum (Table 1) and the Hungarian National Museum (Table 2) were analysed. We often had only a few milligrams of fabric originating from ancient clothing or decorations. As a consequence, the data

shown in Table 5 for such materials are the result of a single analysis. In the case of carpet samples, adequate amounts of sample were available and the table shows the average result of duplicate determinations.

Data in Table 5 show that, as the age increased the cysteic acid content increased and the cystine content decreased (Fig. 1). When compared with contemporary wool, the cysteic acid contents were approximately 10, 20 and 30 times as great at 500, 1000 and 1700 years, respectively. The cystine content decreased to less than 50% in 120–140 years, to 35% in 500 years and to 10% in 1600–1700 years. The differences are even greater when expressed as a ratio of cysteic acid/cystine. The 1600–1700 year old samples had a ratio more than 100 times as great as that of modern carpets.

Both the methionine and tyrosine content decreased with age (Fig. 2). In the 1750 year old wool fibre and

Table 5
Amino acid composition of wool carpets and wool threads of copt textiles of different ages

Sample No.	Age of the samples (years)	Amino acids (g amino acid/100 g protein)				
		Cysteic acid	Cys.	Cysteic acid/Cys.	Met.	Tyr.
1.1.	1750	4.39	0.97	4.48	0.00	0.00
1.2.	1600	4.30	1.03	4.17	0.00	0.00
1.3.	1600	4.27	1.21	3.53	0.02	0.15
1.4.	1600	4.33	1.10	3.93	0.02	0.20
1.5.	1600	4.01	1.19	3.37	0.01	0.20
1.6.	1550	3.99	1.22	3.27	0.03	0.30
1.7.	1550	3.97	1.33	2.98	0.03	0.38
1.8.	1550	3.82	1.19	3.21	0.02	0.54
1.9.	1500	3.93	1.22	3.22	0.03	0.53
1.10.	1400	3.81	1.53	2.49	0.03	0.75
1.11.	1400	3.54	1.50	2.36	0.04	0.77
1.12.	1400	3.72	1.54	2.42	0.04	0.73
1.13.	1400	3.65	1.43	2.55	0.05	0.89
1.14.	1050	3.12	1.78	1.75	0.15	1.33
1.15.	550	1.87	3.12	0.60	0.21	2.11
1.16.	400	1.49	3.21	0.46	0.28	2.32
2.19.	400	1.53	3.43	0.45	0.27	2.29
2.20.	300	1.32	3.82	0.35	0.31	2.31
2.21.	250	1.21	3.79	0.32	0.29	2.43
2.22.	170	1.19	4.15	0.29	0.33	2.37
1.17.	140	1.22	4.24	0.29	0.38	2.85
2.23.	128	1.03	4.20	0.25	0.40	2.59
2.24.	120	0.88	5.19	0.17	0.39	2.83
1.18.	unknown	1.92	3.24	0.59	0.24	1.99
2.25.	unknown	1.44	3.91	0.37	0.34	2.38

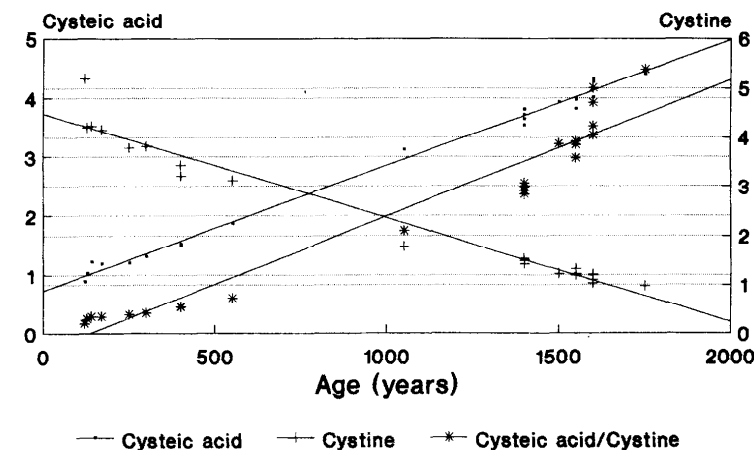


Fig. 1. Age estimation of wool based on cysteic acid and cystine content.

one of the 1600 year old wool fibres, we were unable to detect the presence of either tyrosine or methionine. The methionine content of the samples decreased to 85% of the original level in 100–140 years, to 55% in 400–500 years and to almost nil in 1600–1700 years. Tyrosine decreased 10–15% in 100–140 years, 30% in 400–500 years, and was almost completely decomposed at 1600–1700 years.

Regressions of age on amino acid content were based on analyses of the 23 samples having known ages

(Table 5) which were described in Tables 1 and 2. The amino acid contents of the modern carpet were not included in the estimation of regression due to curvilinearity introduced by including that sample. These curvilinear functions resulted in large differences between known age (y) and predicted age ($\hat{y}$) at the extreme ages. Since we cannot extrapolate regressions beyond the range of the data, equations developed in this study can be expected to apply to wool samples 120 to 1700 years of age.

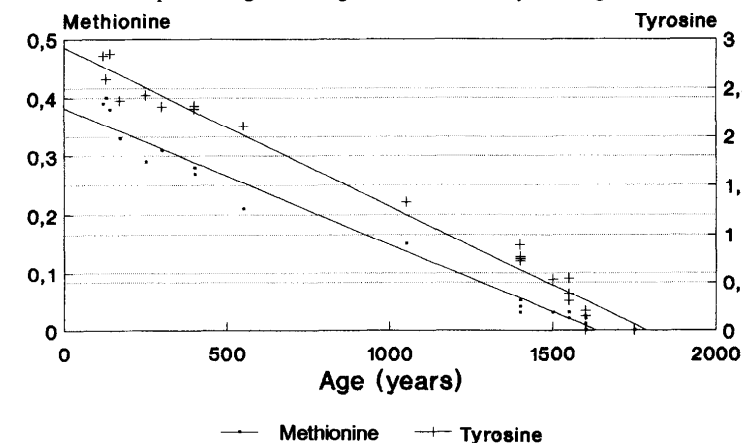


Fig. 2. Age estimation of wool based on methionine and tyrosine content.

Table 6

Equations, correlation coefficients (r_{xy}) and errors of estimate ($s_{y,x}$) for linear regressions of age on amino acid contents of wool carpets and wool threads of copt textiles of different ages

Independent variable	Equation ($a + bx$)	r_{xy}	$s_{y,x}$ (years)
Cysteic acid (x_1)	$\hat{y} = -335 + 467x_1$	0.996	55.3
Cystine (x_2)	$\hat{y} = 2068 - 453x_2$	-0.981	124.9
Tyrosine (x_3)	$\hat{y} = 1770 - 599x_3$	-0.988	100.4
Methionine (x_4)	$\hat{y} = 1539 - 3601x_4$	-0.855	334.5
Cysteic acid/cystine (x_5)	$\hat{y} = 366 + 401x_5$	0.974	146.1

Linear regression equations, correlations and standard errors of estimate ($s_{y,x}$) for the regressions of age on amino acid contents are shown in Table 6. Based on the correlations and errors of estimate, cysteic acid content was the most accurate estimator followed by the tyrosine and cystine contents. The cysteic acid/cystine ratio was a less accurate predictor than either of the components of the ratio and the methionine content was clearly the least accurate predictor.

Correlations among the various amino acid contents were extremely high. Considering the three most accurate estimators, the correlation coefficients were -0.980 for cysteic acid and cystine, -0.990 for cysteic acid and tyrosine, and +0.970 for cystine and tyrosine. As a result of these high values between independent variables, very little could be gained by using multiple regression. However, the average of estimates based on cysteic acid, cystine and tyrosine was found to have a standard error of approximately the same size as that based on cysteic acid alone. Use of the average

of estimates allows compensation for errors of analysis for individual amino acids.

The standard error for a given estimate of age can be calculated for

$$s_{\hat{y}} = s_{y,x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{SSx}}$$

where n = number of observations on the sample (23 in this case), x = observed value of amino acid content in the unknown sample, $\bar{x}$ = mean amino acid content of the 23 samples and SSx = sum of $(x - \bar{x})^2$ for the 23 samples.

The standard error of the mean of three estimates

$$\left(\frac{\hat{y}_1 + \hat{y}_2 + \hat{y}_3}{3} \right)$$

can be calculated as

$$\sqrt{\frac{s_{y1}^2 + s_{y2}^2 + s_{y3}^2 + 2r_{x1x2}s_{y1}s_{y2} + 2r_{x1x3}s_{y1}s_{y3} + 2r_{x2x3}s_{y2}s_{y3}}{9}}$$

Confidence limits calculated as $\hat{y} \pm (t_{21 \text{ d.f.}, 0.05}) (s_{\hat{y}})$ (d.f. = degrees of freedom) can be placed on each estimate. Standard errors and 95% confidence limits for estimates of age of samples 1.18 and 2.25 are shown in Table 7. Sample 1.18 estimates vary from 562 to 600 years and average 580 years. All four sets of confidence limits overlap, indicating that the estimates are not significantly different ($P < 0.05$). It is 95% certain that sample 1.18 is between 550 and 610 years of age. Estimates for sample 2.25 range from 297 to 344 years and average 326 years. All confidence limits overlap, and

Table 7

Estimates and confidence limits for the ages of two carpets of unknown age

Sample No.	Amino acid	Content (g/100 g protein)	$\bar{x}$	SSx	$\hat{y}$ (years)	$s_{\hat{y}}$ (years)	95% C.L.* (years)	
							L.L.	U.L.
1.18.	Cysteic acid	1.92	2.90	39.70	562	14.4	532	592
	Cystine	3.24	2.32	41.03	600	31.6	534	666
	Tyrosine	1.99	1.26	23.70	578	25.8	524	632
	Mean	—	—	—	580	14.2	550	610
2.25.	Cysteic acid	1.44	2.90	39.70	337	17.2	301	373
	Cystine	3.91	2.32	41.03	297	40.5	213	381
	Tyrosine	2.38	1.26	23.70	344	31.2	279	409
	Mean	—	—	—	326	18.1	288	364

Lower and upper values of the 95% confidence limit.

it is 95% certain that the sample 2.25 is between 288 and 364 years of age.

Increasing the cysteic acid and decreasing the cystine and tyrosine contents associated with increasing the age of wool samples have been shown to provide an accurate basis for estimating the age of wool carpet or cloth. However, caution should be exercised in using the prediction equations presented in this paper. A different laboratory working with wool fabric of a different origin should analyse some samples of known age to either verify the applicability of these equations or to develop a set of equations appropriate for their samples.

Acknowledgements

The financial support of the Hungarian Research Fund (OTKA T 6653) is gratefully acknowledged. S.

Folestad acknowledges support from the Swedish Natural Science Research Council.

References

- [1] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, L. Költő and I. Pap, *Archaeometry*, 90 (1990) 627.
- [2] J. Csapó, I. Pap and L. Költő, *Anthropologia Hungarica*, 1 (1988) 67.
- [3] T. Yoritaka and T. Ono, *Nagasaki Iggakai Zassi*, 29 (1954) 400.
- [4] K. Osono, I. Mukai and F. Tominaga, *Nagasaki Iggakai Zassi*, 39 (1955) 156.
- [5] A.J.P. Martin and R.L.M. Synge, *Adv. Protein Chem.*, 2 (1945) 1.
- [6] E. Schram, S. Moore and E.I. Bigwood, *J. Biol. Chem.*, 57 (1954) 33.
- [7] S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 235.
- [8] C.H.W. Hirs, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 611.
- [9] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss and I. Tóth-Pósfai, *Acta Alimentaria*, 1 (1986) 3.

Quantitative determination of protein of bacterial origin

J. Csapó*, Zs. Csapó-Kiss

University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Guba S. u. 40, H-7400 Kaposvár, Hungary

J. Schmidt

West-Hungarian University, Faculty of Agricultural Science, Mosonmagyaróvár, Hungary

T.G. Martin

Purdue University, West Lafayette, IN, USA

Several methods have been developed for the determination of the proportion of nitrogen-containing substances of microbial origin in the digestive tracts of cattle. These include assays that use nucleic acids and adenosine triphosphate as indicators, radioisotopes ^{35}S , ^{15}N , ^{32}P and ^{33}P incorporated into bacterial protein and phospholipids, duodenal amino acid composition with amino-ethylphosphonic acid, diaminopimelic acid and D-alanine (D-Ala) contents as indicators. On the basis of the data in the literature on D-amino acid content of milk and milk products the authors came to the conclusion that D-glutamic acid (D-Glu) and D-aspartic acid (D-Asp) can be considered as markers for proteins of bacterial origin. To demonstrate this, experiments have been carried out and some of the results are reported here. ©2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: D-Glutamic acid; D-Aspartic acid; Protein of bacterial origin; Diaminopimelic acid (DAPA); Bacterial protein

1. Introduction

In cattle, about 70% of dietary protein is reduced to amino acids in the rumen, the first large compartment of the stomach where cellulose is broken down. If not used directly, these amino acids may be incorporated in protein or broken down to provide ammonia for the construction of microbial

body proteins. Excess ammonia is absorbed from the rumen and converted into urea via the ornithine cycle in the liver.

New protein evaluation systems for cattle nutrition often judge protein content of feeds based on the quantity of amino acids absorbed in the small intestine. The two major sources of amino acids are microbial protein synthesized in the rumen and dietary protein not broken down in the rumen (by-pass protein). The quantity of microbial protein produced in the rumen must be established in order to determine the proportion of by-pass protein in the diet.

Microbial protein in the duodenal chyme, the semifluid mass of partly digested food expelled by the stomach into the duodenum, must be separable from the dietary by-pass protein and any endogenous protein in order to determine the quantity of microbial protein synthesized in the rumen. This is possible only if components characteristic solely of microbial protein can be identified in the total protein.

In recent years, several methods have been developed for the estimation of microbial-origin, nitrogen-containing substances that pass from the rumen into the abomasum, the true digestive stomach of a ruminant. These methods are based on the analysis of components believed to be only of microbial origin or very closely related to protein of microbial origin. Investigations have been based on incorporation of ribonucleic acids (RNA), adenosine triphosphate (ATP), sulphur 35 (^{35}S) and nitrogen 15 (^{15}N) in bacterial protein, and incorporation of phosphorus 32 (^{32}P) in bacterial phospholipids. Duodenal amino acid composition and duodenal content of amino-ethylphosphonic acid (AEP), diaminopimelic acid (DAPA), D-ala-

nine (D-Ala), D-aspartic acid (D-Asp) and D-glutamic acid (D-Glu) have been used as indicators.

The aim of this article is to summarize the methods used for the determination of protein of microbial origin, supplemented by some recent experimental data to demonstrate the usefulness of D-Asp and D-Glu as markers for proteins of microbial origin.

2. Early methods

2.1. RNAs

The ratio of RNA to total nitrogen was proposed as an indicator of bacterial and protozoan protein synthesis [1]. Determination of RNA is complicated and tedious and this method assumes that all RNA of dietary origin is degraded in the rumen. The procedure is thought to overestimate the quantity of microbial protein with overestimation being substantial with dietary protein of high nucleic acid content or protein that has been heat-treated to reduce protein solubility [2,3]. It was stated that the ratio of RNA to total nitrogen is dependent upon both the quality of the diet and environmental conditions. However, a substantial proportion of the RNA content of the diet may not undergo ruminal degradation, resulting in overestimation. A method that partially eliminates these errors determines the purine:nitrogen ratio of mixed bacteria isolated from the rumen to estimate the quality of rumen-synthesized protein [4].

2.2. ATP

ATP has been proposed as a good marker for microbes because the quantity of ATP present in all microbes is very similar, and its determination is a relatively simple and reliable procedure [5]. However, great variability was found in the ATP content of similarly prepared samples. It was established that the ATP content of biomass varies between 0.07% and 0.25% and is dependent on the quality of dietary protein. This method is thus not applicable to routine quantitative analysis of protein of microbial origin.

2.3. Incorporation of the ^{35}S isotope

A widely used radioisotope method [6] uses the ^{35}S isotope as a microbial marker. Based on the

concept that all sulphur-containing amino acids of bacterial protein are synthesized via hydrogen sulphide, which originates from Na_2^{35}S , and that the quantity of sulphur-containing amino acids can be determined on the basis of ^{35}S content, Na_2^{35}S has been used in an in vitro experiment to measure microbial-origin protein. Walker and Nader [7] developed a procedure based on continuous delivery of inorganic sulphate labelled with ^{35}S into the rumen. This method does not use labile sodium sulphide and does not require that all sulphur-containing amino acids of bacterial protein originate from ^{35}S . Modifications of this method have been described, however they are expensive and laborious to perform.

2.4. Incorporation of the ^{15}N isotope

In an attempt to introduce ^{15}N into bacterial protein ($^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [8] and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ [9] have been used. These methods do not account for the fact that a proportion of the proteins is constructed directly from amino acids or peptides. In addition to the high cost of this procedure, determination using ^{15}N also entails a substantial source of error. The method is suitable for the study of dynamics of nitrogen metabolism occurring in the rumen.

2.5. Incorporation of labelled phosphorus

There is a close correlation between phosphorus in microbial phospholipids and the degree of protein synthesis occurring in the rumen [10]. The degree of microbial growth was estimated using ^{32}P [11]. When results obtained using isotope markers (^{15}N , ^{35}S and ^{32}P) were compared [12], substantial levels of various exchange mechanisms and of different degradation processes in the rumen were found. A method which involves the determination of ^{32}P incorporation in the microbial nucleic acids [3] established that RNA labelled with ^{32}P amounted to approximately 85% of total RNA.

2.6. Amino acid composition

Amino acid composition of chyme [13] was used to determine the proportions of amino acids of dietary and microbial origin. The procedure works on the assumption that the quality of microbial protein is constant and that individual components of the diet exert the same effect as if they were present singly. A comparison between this method and

*Corresponding author.
E-mail: csapo@atk.kaposvar.pate.hu

the DAPA method showed a very close correlation between results [13].

2.7. DAPA and AEP

DAPA has been used to estimate the magnitude of bacterial protein synthesis [14]. DAPA is a component of the majority of peptidoglycans in the bacterial cell wall, is present in almost every bacterium and does not occur in animal feeds. Traces of DAPA may also be detectable in protozoa. The quantity of nitrogen of bacterial origin in the chyme is estimated from DAPA:nitrogen ratios in mixed bacteria and intestinal contents.

The ratio of DAPA to total bacterial protein does not vary under constant dietary conditions [15]. However, the quantity of DAPA present in the cell wall is strongly dependent on the species of bacteria. In comparative experiments, DAPA can be used satisfactorily to determine the proportion of protein of bacterial origin in the contents of the intestine. Sources of error are the variation of DAPA content with growth of bacteria or changes in physical dimensions; greater size results in a reduction in the proportion of DAPA [16]. The DAPA:protein ratio varies in relation to time elapsed after feeding, even when the same animal and the same diet are involved [17]. DAPA may occur not only in bacteria but also in animal feeds.

Protozoa can contain substantial quantities of DAPA as a consequence of either the procedure used to separate bacteria from protozoa or due to including DAPA engulfed by the protozoa and not yet digested. Rapid degradation of the protoplasm of bacteria which have died in the rumen may lead to larger amounts of DAPA leaving the rumen and overestimation of the quantity of protein synthesized by bacteria [16].

A critical evaluation of DAPA and RNA as markers to estimate rumen pools and duodenal flows of bacterial and protozoal nitrogen was performed [18]. A novel mathematical procedure utilizing DAPA and RNA to estimate rumen pool sizes and intestinal flows of bacterial and protozoal N did not provide biologically plausible estimates. In a methodological study on microbial protein synthesis in the rumen DAPA, RNA, ^{15}N , D-Ala and amino acid composition were compared as markers [19]. Reproducibility was best with the D-Ala method, followed by ^{15}N , with agreement for identical isolation sites. RNA values achieved this level when microorganisms were isolated from the duodena.

Horiguchi and Kandatsu [20] were the first to isolate AEP from ciliate unicellular organisms. AEP was thought not to occur in ruminant feed substances. DAPA was used to determine the quantity of protein of bacterial origin and AEP, which can be detected in the lipid fraction of protozoa, to estimate the quantity of protein synthesized by protozoa [21]. Protozoan nitrogen was also estimated by measuring AEP and bacterial nitrogen by measuring DAPA [15].

However, as with DAPA, it was found that the quantity of AEP varies among species of ciliate unicellular organisms. It was also established that AEP occurs both in ruminal bacteria and in animal feed substances, e.g. fishmeal contains AEP originating from phytoplankton.

An automated amino acid analyzer can be used to determine DAPA by exploiting the characteristic of DAPA that, in contrast to other amino acids but similarly to proline, it gives a yellow color with acidic ninhydrin solution with the maximum light absorption value at a wavelength of 420 nm [22]. DAPA can be separated from the proline in an anion exchange column and determined with acidic ninhydrin [15].

DAPA was determined in an hydrolysate from the ruminal fluid by application of a two-column method using an automated amino acid analyzer [23]. Samples that were oxidized with performic acid prior to protein hydrolysis had the disturbance effects of methionine eliminated [24]. DAPA, even if present only in trace quantities, could be determined accurately. Subsequently a fast method was developed for the determination of DAPA alone by means of ion exchange column chromatography [25].

During the last 10 years different high performance liquid chromatographic (HPLC) methods were elaborated for determination of DAPA and separation of stereoisomers of DAPA as well. The total and separate stereoisomers of DAPA in rumen bacteria were determined by HPLC after derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine-amid [26,27]. Chiral HPLC was used to separate three stereoisomers of DAPA without derivatization [28]. The DAPA content in biological materials was determined using HPLC [29–31].

3. Use of D-amino acids

3.1. General considerations

Like DAPA, D-Ala occurs only in peptidoglycans in the bacterial cell wall [32]. Hence, this compound is suitable for the quantification of proteins of bacterial origin. The amount of nitrogen of bacterial origin was determined by measuring the quantity of D-Ala in ruminal fluid [33]. In a comparison of the accuracy of DAPA and D-Ala as indicators of nitrogen of bacterial origin, it was concluded that D-Ala was a better indicator [34].

Gas chromatography (GC)–mass spectrometry analysis of DAPA stereoisomers and amino acid enantiomers in rumen bacteria has been described [35]. Capillary GC with electron capture or selected ion monitoring detection has been used for the determination of muramic acid (another potential bacterium marker), DAPA and the ratio of D/L-Ala in bacteria [36].

In a series of experiments [37] it was confirmed that both DAPA and D-Ala are suitable for determining the quantity of protein of bacterial origin. No difference was observed between the two substances with respect to error, either in the analytical determination or in the estimation of protein of bacterial origin. Examination of DAPA and D-Ala contents of bacteria taken from the rumens of cattle, goats and sheep revealed no significant differences among the three species. Other D-amino acids, including in addition to D-Ala also D-Asp and D-Glu have been used for estimating bacterial activity occurring in foodstuffs [38] and the possibility of using D-Glu as a marker for microbial nitrogen was also mentioned [39].

3.2. What constitutes a genuinely good marker?

Analysis of the relevant literature indicates that a truly effective marker for bacterial protein has not been identified. Some markers involve a cumbersome analytical procedure, others occur in both bacteria and protozoa, and animal diets may also contain marker substances. It appears that, for the present, analytical solutions have been found with respect to DAPA, with even trace quantities of the compound being determinable. While investigating the D-amino acid content of foodstuffs, particularly milk and milk products [40–45], it could be concluded that, in addition to D-Ala, other D-amino acids such as D-Asp and D-Glu can also be

detected in similar quantities, primarily in products which have links with bacterial activity. This gave rise to the idea of examining the DAPA, D-Asp and D-Glu concentrations in bacteria extracted from the rumen of cattle and in chyme from the same cattle. Relationships existing among these three components and of these components with protein of bacterial origin could provide additional estimators of the quantity of bacterial protein.

3.3. D-Asp and D-Glu

Investigations were performed using three Hungarian Pied × Holstein Friesian crossbred growing bulls of 480–500 kg body weight, each fitted with ruminal and duodenal fistulae. The objective was to investigate the applicability of D-Glu and D-Asp as markers of bacterial protein synthesis. The experiment consisted of a 10-day adaptation period and a 4-day trial period. On days 1 and 4 of the experimental period, samples of duodenal chyme were taken through the duodenal fistula every 2 h, on day 2 of the experimental period samples of ruminal fluid were taken through the ruminal fistula 3 h after morning feeding.

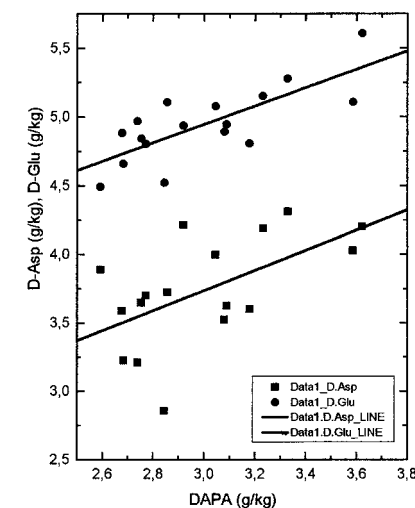


Fig. 1. Linear regressions of D-Asp and D-Glu on DAPA in ruminal bacteria.

The samples of ruminal fluid were centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min in order to separate the feed particles from the infusorians. The bacterial mass was then separated by centrifugation of the fluid phase at $10\,000 \times g$ for 20 min; this mass was subsequently dried by means of lyophilization. The chyme samples taken from the duodenum were also lyophilized.

DAPA content was determined, by means of the procedure developed by Csapó et al. [25,46]. Determination of D-amino acids requires hydrolysis of protein and racemization should be minimized during protein hydrolysis. Several methods have been developed for the suppression of racemization during protein hydrolysis, but these have proven to be rather lengthy and cumbersome. Excellent results have been obtained with hydrolysis performed for a short period at high temperature [47,48]. In the method [49] used in this study the protein was hydrolysed with 6 M hydrochloric acid for a short time period (30 min) at high temperature (170°C).

Separation and determination of enantiomers was performed by means of HPLC using the method described by Einarsson et al. [50]. For derivative formation *o*-phthalaldehyde and 2,3,4,6-tetra-*O*-

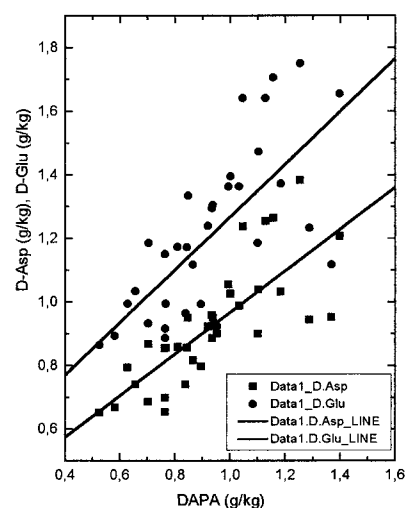


Fig. 2. Linear regressions of D-Asp and D-Glu on DAPA in chyme.

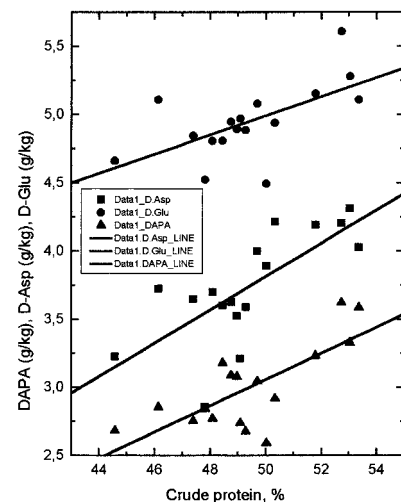


Fig. 3. Linear regressions of D-Asp and D-Glu content on crude protein content of ruminal bacteria.

acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside were used. Determination was restricted to D-Asp and D-Glu and their enantiomers. By means of this procedure, D-Asp and D-Glu present even in very small quantities can be detected and determined alongside L-amino acids present in large quantities.

Fig. 1 illustrates the relations of D-Glu and D-Asp with DAPA in ruminal bacteria samples, Fig. 2 in chymus, while Fig. 3 displays regression of DAPA, D-Asp and D-Glu on crude protein content of ruminal bacteria.

In both chyme and ruminal bacteria samples, there were high correlations among DAPA, D-Asp and D-Glu contents. The *r* value for DAPA and D-Glu contents of the chyme was the lowest ($r=0.70$) and the highest ($r=0.81$) was for DAPA and D-Glu in ruminal bacteria. Correlations between D-Asp and D-Glu (Fig. 4) were even higher ($r=0.95$ for chyme and $r=0.83$ for ruminal bacteria). In ruminal bacteria, correlations of crude protein with DAPA, D-Asp and D-Glu were 0.74, 0.73 and 0.61, respectively.

Based on linear regression parameters, the crude protein content of ruminal bacteria was estimated to be 49.1%, 49.3% and 49.9%, respectively, based on D-Asp, DAPA and D-Glu. Crude protein content of chyme was estimated to be 24.9%, 24.6%, 24.3%,

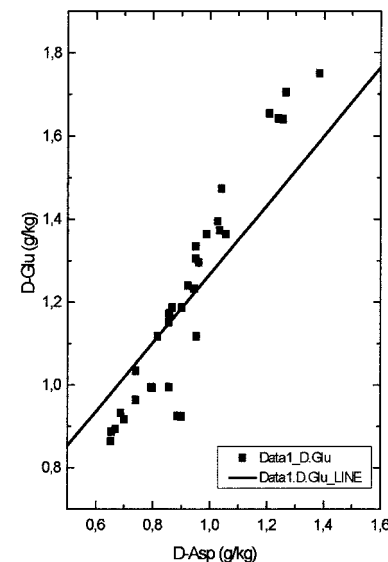


Fig. 4. Correlation between D-Asp and D-Glu in chyme.

respectively, based on D-Asp, DAPA and D-Glu. DAPA, D-Asp and D-Glu contents of protein of ruminal bacteria were found to be 0.61, 0.74 and 0.99% (expressed as g/100 g bacterial protein). It was not possible to compare the values for D-Asp and D-Glu because we are not aware of other evaluations of these as components of bacterial protein. The value of 0.61% obtained for DAPA is lower than the value of $1.0 \pm 0.25\%$ reported for bacterial protein in the literature, but this could be due to differences in the quality of diets fed to the experimental livestock. This relative deviation of DAPA content from data in the literature does not influence the results obtained for D-Asp and D-Glu in this study.

After analysis of ruminal bacteria, and having data on crude protein content, we calculated multiplication factors to enable estimation of the proportion of protein of bacterial origin in an unknown sample based on DAPA, D-Asp and D-Glu contents. The factors were $100/0.61=164$, $100/0.74=135$ and $100/0.99=101$, respectively, for DAPA, D-Asp and D-Glu. The proportion of protein synthesized by ruminal bacteria is obtained by multiplying the DAPA, D-Asp or D-Glu content by the appropriate multiplier.

Analyses performed on samples of known bacterial protein content indicated that D-Asp and D-Glu provided results which were practically identical to each other, and both produced values very close to the theoretical (calculated) values. Results obtained using these bacteria markers produced estimates 10% lower than those obtained using DAPA. This was not due to error attributable to the new markers but rather to the unreliability of determination using DAPA.

4. Conclusions

Determination of bacterial protein based on D-Asp and D-Glu can be carried out with precision by means of HPLC. When compared to D-amino acid analysis, determination of bacterial protein by DAPA analysis requires more time and more chemical agents and is therefore more expensive. With the application of the fast procedure developed by the authors, the determination of the quantity of D-Asp and D-Glu can be completed in a quarter of the length of time required for ion exchange column chromatography analysis of DAPA.

The problem in the determination of D-amino acids is the racemization occurring during protein hydrolysis. Due to racemization, greater quantities of D-Asp and D-Glu will be measured, leading to overestimation of the amount of protein of bacterial origin. This source of error can be eliminated by use of the described hydrolysis procedure, which allows only a very low degree of racemization to take place. This error can also be eliminated by using the chosen method to measure D-Asp and D-Glu contents of bacteria obtained from the rumen, and calculating multiplication factors to estimate the quantity of protein of bacterial origin. In the latter method, racemization occurring during protein hydrolysis will be regarded as a constant error, both in the calculation of multiplication factors and in the analysis of real samples, and it will exert no substantial influence on the accuracy of the determination procedure.

Acknowledgements

The financial support of the National Fund for Scientific Research (OTKA T 6653, OTKA T 14916, OTKA T 32411) and the Ministry of Education (MKM-15) is gratefully acknowledged.

References

- [1] R.H. Smith, A.B. McAllan, Br. J. Nutr. 24 (1970) 545.
- [2] P.J. Buttery, D.J.A. Cole, Proc. Nutr. Soc. 36 (1977) 211.
- [3] R.H. Smith, A.B. McAllan, D. Hewitt, P.E. Lewis, Agric. Sci. Camb. 90 (1978) 557.
- [4] G.A. Broderick, N.R. Merchen, J. Dairy Sci. 75 (1992) 2618.
- [5] C.W. Forsberg, K. Lamm, Appl. Environ. Microbiol. 33 (1977) 528.
- [6] H. Henderickx, Arch. Int. Physiol. Biochim. 69 (1961) 449.
- [7] D.J. Walker, C.J. Nader, Aust. J. Agric. Res. 26 (1975) 689.
- [8] A.F. Pilgrim, F.V. Gray, R.A. Weller, C.B. Belling, Br. J. Nutr. 24 (1970) 589.
- [9] G.W. Mathison, L.P. Milligan, Br. J. Nutr. 25 (1971) 351.
- [10] H.F. Buchholz, W.G. Bergen, Appl. Microbiol. 25 (1973) 504.
- [11] C.J. Van Nevel, D.I. Demeyer, Br. J. Nutr. 38 (1977) 101.
- [12] H. Harmeyer, H. Holler, H. Martens, C. von Grabe, Tracer Studies on Nonprotein Nitrogen for Ruminants III, FAO/IAEA, 1976, p. 69.
- [13] R.A. Evans, R.F.E. Axford, N.V. Offer, Proc. Nutr. Soc. 34 (1975) 65A.
- [14] R.A. Weller, F.V. Gray, A.F. Pilgrim, Br. J. Nutr. 12 (1958) 421.
- [15] W.J. Czerkawski, J. Sci. Food Agric. 25 (1974) 45.
- [16] J.R. Ling, in: S. Hoshino, R. Onodera, H. Minato, H. Itabashi (Editors), The Rumen Ecosystem. The Microbial Metabolism and its Regulation, Springer-Verlag, New York, 1990.
- [17] J.R. Ling, P.J. Buttery, Br. J. Nutr. 39 (1978) 165.
- [18] P.H. Robinson, J.G. Fadel, M. Ivan, Can. J. Anim. Sci. 76 (1996) 587.
- [19] U. Schonhosen, J. Voigt, F. Kreienbring, F. Teuscher, Arch. Anim. Nutr. 48 (1995) 147.
- [20] M. Horiguchi, M. Kandatsu, Nature (Lond.) 184 (1959) 901.
- [21] E.A. Ibrahim, J.R. Ingalls, J. Dairy Sci. 55 (1972) 971.
- [22] K. Hutton, F.J. Bailey, E.E. Annison, Br. J. Nutr. 15 (1971) 165.
- [23] R.W. Edols, J. Chromatogr. 329 (1985) 199.
- [24] J. Csapó, S. Gombos, Z. Henics, I. Tóth-Pósfai, Acta Aliment. 2 (1988) 159.
- [25] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, E. Csordás, T.G. Martin, S. Folestad, A. Tivesten, S. Némethy, Anal. Lett. 28 (1995) 2049.
- [26] A.M. El Waziry, Y. Tomita, J.R. Ling, R. Onodera, J. Chromatogr. 677 (1996) 53.
- [27] M. Zanol, L. Gastaldo, J. Chromatogr. 536 (1991) 211.
- [28] T. Nagasawa, J.R. Ling, R. Onodera, J. Chromatogr. A653 (1993) 336.
- [29] R. Puchala, H. Prior, G.W. Kulasek, J.A. Shelford, J. Chromatogr. 623 (1992) 63.
- [30] M.E.R. Dugan, W.C. Sauer, K.A. Lien, T.W. Fenton, J. Chromatogr. 582 (1992) 242.
- [31] M. Czauderna, J. Kowalczyk, J. Anim. Feed. Sci. 8 (1999) 273.
- [32] K.H. Schleifer, O. Kandler, Bacteriol. Rev. 36 (1972) 407.
- [33] I.E. Garrett, R.D. Goodrich, J.C. Meiske, Protein Requirements for Cattle, Symposium, Oklahoma State University, 1982, MP-109.
- [34] I.E. Garrett, R.D. Goodrich, J.C. Meiske, Can. J. Anim. Sci. 67 (1987) 735.
- [35] A. Schieber, H. Brückner, J.R. Ling, Biomed. Chromatogr. 13 (1999) 1.
- [36] A. Tunlid, G. Odham, J. Microbiol. Methods 1 (1983) 63.
- [37] J. Csapó, Z. Henics, Acta Agron. Hung. 1-2 (1991) 159.
- [38] H. Brückner, S. Haasman, M. Langer, T. Westhauser, R. Wittner, J. Chromatogr. 666 (1994) 259.
- [39] H.A. Greife, J.A. Rooke, D.G. Armstrong, Br. J. Nutr. 54 (1985) 483.
- [40] A. Albertini, T. Mentasti, V.M. Moretti, F. Bellegamba, U. Luzzana, F. Valfre, Milchwissenschaft 51 (1996) 127.
- [41] H. Brückner, M. Hausch, Milchwissenschaft 45 (1990) 357.
- [42] H. Brückner, M. Hausch, Milchwissenschaft 45 (1990) 421.
- [43] J. Csapó, T.G. Martin, Zs. Csapó-Kiss, J. Stefler, S. Némethy, J. Dairy Sci. 78 (1995) 2375.
- [44] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, E. Csordás, P.F. Fox, L. Wágner, T. Tálos, Tejipar. 57 (1997) 25.
- [45] I. Gandolfi, G. Palla, L. Delprato, F. DeNisco, R. Marchelli, C. Salvadori, J. Food Sci. 57 (1992) 377.
- [46] J. Csapó, S. Gombos, Z. Henics, I. Tóth-Pósfai, Acta Aliment. 15 (1986) 159.
- [47] S.H. Chiou, K.T. Wang, Chromatographia 448 (1988) 404.
- [48] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, S. Folestad, A. Tivesten, Anal. Chim. Acta 289 (1994) 105.
- [49] J. Csapó, Zs. Csapó-Kiss, S. Folestad, A. Tivesten, S. Némethy, L. Wágner, T. Tálos, T.G. Martin, Anal. Chim. Acta 339 (1997) 99.
- [50] S. Einarsson, S. Folestad, B. Josefsson, J. Liq. Chromatogr. 10 (1987) 1589.



Int. Dairy Journal (1994) 445-458
 © 1994 Elsevier Science Limited
 Printed in Great Britain. All rights reserved
 0958-6946/94/\$7.00

Composition of Colostrum from Goats, Ewes and Cows Producing Twins

J. Csapó, Z. Csapó-Kiss, T.G. Martin,* J. Szentpeteri & G. Wolf

PANNON Agricultural University, Faculty of Animal Science, Kaposvár, Dénesmajor 2, H-7401 Hungary

(Received 18 November 1992; revised version accepted 29 June 1993)

ABSTRACT

Colostrum from 11 single- and 7 twin-lambing Hungarian merino ewes, 6 single- and 4 twin-dropping Hungarian white goats and 32 single- and 32 twin-calving Hungaro-Friesian and Holstein-Friesian cows were analysed for dry matter, total protein, true protein, whey protein, true whey protein, immunoglobulin-G, casein, amino acid composition, biological value, micro- and macro elements and non-protein nitrogen content as a function of time post-partum. The first milked colostrum of the twin-producing animals contained significantly more dry matter, total protein, true protein, whey protein, true whey protein and immunoglobulin-G than that of mothers with single progeny. For cows, the biological value of protein was higher in colostrum samples from twin-bearing cows than in those from single-bearing cows. The NPN content was higher in the colostrum from cows producing a single calf. There were no differences in casein content or contents of macro- and micro-elements for any of the three species. Twenty-four hours after parturition, no differences in composition of colostrum were found. Furthermore, the sex of progeny of twin-calving cows had no influence on the composition of colostrum.

INTRODUCTION

Earlier studies on the colostrum, post-colostral milk and milk of various genotypes of cattle (Csapó *et al.*, 1982a, b; Csapó & Csapó-Kiss, 1984a), goat (Csapó *et al.*, 1987) and ewe (Csapó *et al.*, 1986a) showed that the

*Present address: Department of Animal Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.

colostrum of dams producing twins differed somewhat in composition from that of dams producing a single progeny. The difference, which was considerable immediately after parturition, soon disappeared. Since, at that time, colostrum was available from only a few dams with twins, the results were not published. The present paper describes the results of a study designed to re-examine the relationship between twinning and colostrum composition.

The new-born calf, kid or lamb obtains passive immunity from its dam via colostral immunoglobulins (Roy, 1980). During the pre-partum period, immunoglobulin G (IgG) is transported from blood into the udder without alteration (Murphy *et al.*, 1964) and the higher protein concentration in the colostrum at parturition is mainly from accumulation of IgG during the prepartum period (Larson *et al.*, 1980). Kiddy *et al.* (1969) showed that the concentration of IgG varies among quarters of the same cow and decreases in concentration just before parturition to 30–40% of the level obtained 6 weeks pre-partum.

A number of publications (Grieb, 1968; Porter, 1972; Oyeniyi & Hunter, 1978; Larson *et al.*, 1980) have shown a high protein concentration in the first colostrum post-partum and a rapid decline in protein concentration at each subsequent milking following initial extraction. The concentration of IgG in colostrum, similar to total protein, is high at parturition and decreases at each successive milking post-partum (Bush *et al.*, 1971; Newstead, 1976; Oyeniyi & Hunter, 1978).

Many factors that influence colostral content of IgG and the immune response in calves have been reviewed (Warner & Braunstein, 1976; Bush & Staley, 1980; Roy, 1980;). The two main factors that influence the colostral IgG concentration are breed and lactation number. Some studies indicate that breeds may differ in colostral IgG concentration (Tennant *et al.*, 1969; Kruse, 1970; Newstead, 1976; Oyeniyi *et al.*, 1977; Halliday *et al.*, 1978; Oyeniyi & Hunter, 1978; Losonczy *et al.*, 1979) and in IgG concentration of blood serum in calves (Tennant *et al.*, 1969; Halliday *et al.*, 1978; Losonczy *et al.*, 1979).

Kruse (1970) and Oyeniyi and Hunter (1978) showed that the concentration of IgG tends to increase with advancing lactation number, although IgG concentrations were similar for the first three parities of Holstein cows but higher for older cows. Oyeniyi and Hunter (1978) reported a gradual increase in colostral IgG of Holstein with increasing lactation number.

According to the above authors, IgG is most densely concentrated in the first milking (40–140 mg/ml). It decreases rapidly until the 5th day (1.8–6.4 mg/ml) and this decrease continues until the middle of lactation (0.8–1.3 mg/ml) but, towards the end of lactation, the mean values

increase again to 2.0 mg/ml. The total protein content of the first milking varies between 6.65 and 22.65% (Grieb, 1968; Voightlander & Glasser, 1974; Kvapilik *et al.*, 1975; Csapó, 1984) and the whey protein content between 10.02 and 12.79% (Csapó, 1984).

The total protein content of goat's colostrum at the first milking post-partum is 5.8–17.99% (Singh *et al.*, 1972; Parkash & Jenness, 1976; Maraval & Vignon, 1982; Csapó & Csapó-Kiss, 1984b), but the IgG content is between 100.3 and 118.6 mg/ml (Csapó & Csapó-Kiss, 1984b). The total protein content of the first ewe's colostrum is 15.03–23.90%, the whey protein content is 8.86–14.98%, and the IgG content is 88.7–106.8 mg/ml (Csapó *et al.*, 1986).

Before determination of the composition of cow's, goat's and ewe's colostrum, the relevant literature was surveyed, but no reference was found as to whether twin-pregnancy had an influence on the composition of colostrum. Since the aim of this present work was to compare the colostrum of dams producing a single offspring or twins, it was not necessary to review the literature on goat's, ewe's and cow's colostrum, because single- or twin-producing status was not indicated.

MATERIALS AND METHODS

Goats

The experiments were carried out with 4 twin- and 6 single-dropping Hungarian white goats. This breed is characterised by white colour, short hair, absence of horns and excellent milking capacity. The annual milk production was 700–800 kg over an average lactation of 300 days. In the course of the experiments, the mother goats were kept in a group of 30, with 3 m² area for each mother goat. Colostrum samples were taken immediately after parturition, then between 20 and 28 h, after 48 h and on the 3rd day after parturition. Post-colostral milk and milk samples were taken on the 5th and 7th day after parturition, respectively. The colostrum samples (50–100 ml) were milked by hand, while the milk samples were collected using an Alfa Laval milking machine. During the experimental period, the animals consumed wheat-, barley-, pea- and vetch straw and good quality maize silage *ad libitum*, occasionally supplemented with fodder cabbage or meadow and leguminous hay.

Ewes

The 11 single- and 7 twin-lambing Hungarian merino ewes were chosen on the basis of the average milk and wool production from a flock of 450,

reared on the Experimental Farm of the PANNON Agricultural University, Faculty of Animal Science, Kaposvár. Colostrum samples were taken immediately after lambing, between 20 and 28 h and on the 3rd day after lambing; post-colostral samples were taken on the 4th and 5th days and milk samples on the 10th, 20th and 30th days of lactation. Samples were taken by hand in each case. During the experimental period, the animals were on pasture and in addition consumed about 0.4 kg/ewe/day of a mixture of farm grains.

Cows

The composition of colostrum from 17 single- and 17 twin-calving cows sired by Holstein-Friesian bulls (62.5% Holstein-Friesian + 25% Jersey + 12.5% Hungarian red spotted) was determined. This population was under summer feeding conditions based chiefly on grass. Of the 17 cows calving twins, there were 5 male-male, 5 female-female and 7 mixed-sex twin sets. Eight of the 17 cows examined were in the 2nd lactation and 9 in the 3rd lactation. Of the 17 control cows calving single calves, there were 10 and 7, respectively, in the 2nd and 3rd lactations.

At the same time, colostrum of 15 single- and 15 twin-calving Hungaro-Friesian cows were collected. Of the 15 Hungaro-Friesian cows calving twins, there were 4 male-male, 3 female-female and 8 mixed-sex twin sets. All of the twin-calving and control cows were in their first lactation. Since, for goats and ewes, it was found that only the colostrum milked immediately after parturition showed differences in composition, colostrum samples were taken after calving (within 30–60 min), and no further samples were collected. When taking samples, about 1.5–2 litres of colostrum were milked by hand.

Chemical analysis of samples

The milk samples were filtered through gauze, and then stored at -25°C until processed. The dry matter content was determined by drying the samples to constant weight according to Hungarian Standard No. 3744–67. The protein content and protein fractions of the samples were determined using the Kjeld-Foss 16200 nitrogen analyser. The protein fractions were separated as described by Csapó *et al.* (1982a). The nitrogen content of the fractions was multiplied by 6.38 to convert to protein content. The IgG content of the colostrum was determined by the single radial immunodiffusion method described by Mancini *et al.* (1965). The anti-goat IgG rabbit serum, the anti-sheep IgG rabbit serum and the anti-cattle IgG rabbit serum, as well as the goat, sheep and cattle IgG standards were

obtained from the Human Vaccine Production and Research Institute (Gödöllő, Hungary).

The concentrations of micro- and macro-elements in the colostrum and milk were determined by UNICAM SP-191 type atomic absorption spectrophotometer, as described by Csapó and Csapó-Kiss (1984b) while determination of the amino acid composition was by the method of Moore and Stein (1951), as described by Csapó and Csapó-Kiss (1986) with an LKB 4101 type amino acid analyser. The biological value of colostrum protein was calculated on the basis of amino acid composition by the method of Morup and Olesen (1976). The mean value and standard deviation of the results were calculated, and the mean values were compared by the Student *t*-test.

RESULTS AND DISCUSSION

Changes in the dry matter content and protein fractions of colostrum from ewes producing singles and twins, as a function of time after lambing, are shown in Table 1, while the changes in goats colostrum are shown in Table 2. Changes in the IgG content of the colostrum of ewes and goats

TABLE 1
Changes in the Dry-Matter Content and Protein Fractions of Ewe's Colostrum in Response to Twinning

Components (%)	Time after lambing (h)					
	0.5–1.5		22–26		44–52	
	Single	Twins	Single	Twins	Single	Twins
<i>n</i>	11	7	11	7	11	7
Dry matter	26.51	30.28**	22.11	22.88	19.64	19.62
SD	2.12	1.78	2.43	2.29	1.83	1.79
Total protein	16.98	20.14**	9.72	10.40	6.28	6.36
SD	1.63	1.82	1.12	1.23	1.01	1.05
True protein	16.58	19.71***	9.36	10.02	6.03	6.11
SD	1.54	1.70	1.06	1.16	0.094	0.097
Whey protein	11.08	14.81***	6.38	6.52	3.31	3.36
SD	0.99	1.00	0.51	0.54	0.049	0.047
True whey protein	10.68	14.38***	6.03	6.14	3.06	3.11
SD	0.84	0.97	0.43	0.47	0.046	0.045
Casein	5.89	5.63	3.34	3.88	2.97	3.00
SD	0.49	0.53	0.29	0.32	0.33	0.31
NPNx6-38	0.401	0.432	0.362	0.385	0.252	0.253
SD	0.043	0.042	0.041	0.041	0.039	0.038

** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

TABLE 2

Changes in the Dry-Matter Content and Protein Fractions of Goat's Colostrum in Response to Twinning

Components (%)	Time after dropping (h)					
	0.5-1.5		22-26		44-52	
	Single	Twins	Single	Twins	Single	Twins
<i>n</i>	6	4	6	4	6	4
Dry matter	26.38	32.25**	19.81	20.45	18.08	18.20
SD	2.98	3.21	2.62	2.51	1.65	1.58
Total protein	15.28	18.65**	7.50	7.73	5.94	5.99
SD	1.83	1.92	1.43	1.52	0.98	0.99
True protein	14.92	18.20***	7.28	7.51	5.75	5.80
SD	1.54	1.64	1.34	1.38	0.84	0.77
Whey protein	9.01	12.68***	3.13	3.28	1.83	1.81
SD	1.02	1.10	0.65	0.69	0.54	0.51
True whey protein	8.58	12.26***	2.93	3.06	1.63	1.62
SD	0.83	0.88	0.62	0.57	0.49	0.50
Casein	5.61	6.08	4.41	4.38	4.17	4.12
SD	0.51	0.48	0.38	0.41	0.32	0.35
NPNx6.38	0.385	0.420	0.211	0.22	0.182	0.179
SD	0.069	0.067	0.051	0.062	0.049	0.047

** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

TABLE 3

Changes in the Immunoglobulin-G Content of Ewe's and Goat's Colostrum in Response to Twinning (mg/cm³)

Species	Time after parturition (h)					
	0.5-1.5		22-26		44-52	
	Single	Twins	Single	Twins	Single	Twins
Ewes						
<i>n</i>	11	7	11	7	11	7
Mean	98.7	118.4**	22.4	23.1	6.1	5.8
SD	9.8	12.1	6.5	8.1	2.2	2.4
Goats						
<i>n</i>	6	4	6	4	6	4
Mean	112.2	132.4**	24.1	24.8	5.9	6.3
SD	8.7	11.2	5.9	7.2	2.9	2.1

** $P \leq 0.01$.

producing singles and twins are summarised in Table 3. Table 4 shows the biological value of the ewe's and goat's colostrum calculated on the basis of the amino acid composition, while Table 5 contains the changes of macro- and micro-elements. Dry matter and protein fractions of first-milked

TABLE 4

Biological Value^a of Colostrum of Ewes and Goats Producing Single or Twin Offspring

Species	Time after parturition (h)					
	0.5-1.5		22-26		44-52	
	Single	Twins	Single	Twins	Single	Twins
Ewes						
<i>n</i>	11	7	11	7	11	7
Mean	108.55	115.62	101.24	112.45	89.99	90.63
SD	11.71	12.38	12.35	11.25	9.13	7.63
Goats						
<i>n</i>	6	4	6	4	6	4
Mean	127.55	137.76	113.85	124.43	110.39	110.17
SD	12.85	10.79	13.74	11.22	11.05	8.45

^aDetermined by the method of Morup and Olesen (1976).

TABLE 5

Concentration (mg/kg) of Macro- and Micro-elements in Colostra of Ewes and Goats Producing Single or Twin Offspring

Species	Time after parturition (h)					
	0.5-1.5		22-26		44-52	
	Single	Twins	Single	Twins	Single	Twins
Ewes						
<i>n</i>	11	7	11	7	11	7
Potassium	1481	1503	1352	1384	1341	1329
Sodium	949	967	699	674	670	675
Calcium	2437	2398	1977	1982	1889	1894
Phosphorus	1829	1842	1538	1497	1482	1439
Magnesium	235	241	163	174	148	142
Manganese	0.302	0.315	0.167	0.172	0.143	0.149
Goats						
<i>n</i>	6	4	6	4	6	4
Potassium	1514	1602	1516	1524	1539	1562
Sodium	601	684	485	497	433	496
Calcium	2303	2330	1933	1862	1815	1901
Phosphorus	2095	2002	1576	1491	1380	1415
Magnesium	294	289	167	173	125	129
Manganese	0.119	0.123	0.095	0.097	0.081	0.079

colostrum samples collected from Holstein-Friesian sired cows are shown in Table 6, and the results of analyses of samples collected from Hungaro-Friesian cows are in Table 7. In Table 8 the data of the two genotypes are summarised, Table 9 shows changes in the biological value of colostrum

TABLE 6

Dry-Matter Content and Protein Composition of First-Milked Colostrum from Cows Sired by Holstein-Friesian Bulls Producing Single or Twin Calves

Components (%)	Twining ^a			Twining average (n = 17)	Single calving (n = 17)
	B + B (n = 5)	H + H (n = 5)	B + H (n = 7)		
Dry matter	29.48	29.36	29.80	29.58	24.73***
SD	1.97	2.53	1.72	1.93	2.31
Total protein	16.88	18.00	17.16	17.32	14.72
SD	1.45	1.34	1.41	1.39	1.62
True protein	16.54	17.53	16.74	16.89	14.19***
SD	1.48	1.37	1.40	1.40	1.44
Whey protein	12.76	13.60	12.71	12.99	10.22***
SD	1.37	1.74	0.99	1.32	1.43
True whey protein	12.33	13.15	12.29	12.56	9.71***
SD	1.40	1.76	0.99	1.34	1.28
Casein	4.12	4.38	4.44	4.33	4.50
SD	0.27	0.89	0.80	0.69	0.91
NPNx6.38	0.43	0.45	0.42	0.43	0.52
SD	0.056	0.069	0.067	0.173	0.094
IgG (mg/cm ³)	128.61	132.74	124.73	128.15	104.51***
SD	17.12	12.40	12.90	18.81	14.50

^aB = Bull, H = heifer.

****P* ≤ 0.001.

calculated on the basis of amino acid composition, while in Table 10 the macro- and micro element contents are presented.

The results in Table 1 reveal that, immediately after parturition, the colostrum of ewe's lambing twins contained 3.8% more dry matter, 3.2% more total protein and true protein, 3.7% more whey protein and true whey protein, 0.06% more NPN and 0.26% less casein than the colostrum of those producing one lamb. The differences were significant (*P* ≤ 0.01) for dry matter and total protein contents and (*P* ≤ 0.001) for the true protein, whey protein and true whey protein contents. With regard to casein- and NPN-content of the two groups, no significant differences were identified. At 24 and 48 h after parturition, there were no detectable differences in composition of colostrum.

The analyses of the goats colostrum led to the same conclusions (Table 2). Immediately after parturition, the colostrum of goats dropping twins contained about 5.9% more dry matter, 3.4% more total protein, 3.7% more whey protein and true whey protein, 0.5% more casein and 0.06% more non-protein nitrogen (NPN) than the colostrum of those dropping a single kid. The differences in dry matter and total protein were significant

TABLE 7

Dry-Matter Content and Protein Composition of First-Milked Colostrum from Hungarian Friesian Cows Producing Single or Twin Calves

Components (%)	Twining ^a			Twining average (n = 15)	Single calving (n = 15)
	B + B (n = 4)	H + H (n = 3)	B + H (n = 8)		
Dry matter	30.45	30.80	30.24	30.41	25.32***
SD	1.46	1.44	1.87	1.60	1.24
Total protein	15.80	16.77	16.29	16.25	14.29***
SD	0.96	0.92	0.87	0.80	0.60
True protein	15.41	16.36	15.89	15.85	13.81***
SD	0.87	0.84	0.87	0.80	0.82
Whey protein	12.18	12.80	12.14	12.28	9.98***
SD	0.71	0.76	0.62	0.56	0.31
True whey protein	11.78	12.39	11.74	11.88	9.50***
SD	0.69	0.67	0.62	0.57	0.28
Casein	3.63	3.97	4.15	3.97	4.31
SD	0.85	0.55	0.95	0.84	0.83
NPNx6.38	0.39	0.41	0.40	0.40	0.48*
SD	0.082	0.075	0.076	0.099	0.104
IgG (mg/cm ³)	133.12	131.80	138.47	135.71	108.64***
SD	16.43	17.17	21.32	22.48	12.18

^aB = Bull, H = heifer.

****P* ≤ 0.001, **P* ≤ 0.05.

TABLE 8

Dry Matter Content and Protein Composition of First-Milked Colostrum from Cows Producing Single or Twin Calves (summarised data of the two genotypes)

Components (%)	Twining (n = 32)	Single calving (n = 32)	Difference T-S	SE in difference
Dry matter	30.00	25.03	4.97***	0.45
Total protein	16.79	14.50	2.29***	0.30
True protein	16.37	14.00	2.37***	0.29
Whey protein	12.64	10.10	2.54***	0.26
True whey protein	12.22	9.61	2.61***	0.25
Casein	4.15	4.41	-0.26	0.21
NPNx6.38	0.42	0.50	-0.08**	0.03
IgG (mg/cm ³)	131.93	106.58	25.35***	4.35

P* ≤ 0.01, *P* ≤ 0.001.

(*P* ≤ 0.01), while the true protein, whey protein and true whey protein differences were significant (*P* ≤ 0.001). With regard to casein and NPN, no significant differences between the two groups were identified. At 24 and 48 h after parturition, these differences were not present, and no

454 J. Csapó, Z. Csapó-Kiss, T. G. Martin, J. Szentpeteri, G. Wolf

TABLE 9
Effect of Twin Pregnancy on Changes in the Biological Value^a Calculated from the Amino Acid Composition of First Milked Colostrum

Biological value	Twin-calving			Twinning average	Single calving	Difference T-S	SE in difference
	B + H	H + H	B + H				
Holstein-Friesian							
n	5	5	7	17	17		
Mean	119.4	121.3	124.4	122.1	112.7	9.4*	4.03
SD	12.12	11.04	10.63	12.10	11.40		
Hungaro-Friesian							
n	4	3	8	15	15		
Mean	121.9	128.3	126.7	125.7	116.3	9.4*	4.21
SD	11.79	12.63	9.88	13.09	9.71		
Across-breed average	120.5	123.9	125.6	123.8	114.4	9.4**	2.91

^aDetermined by the method of Morup and Olesen (1976).* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

TABLE 10
Concentration (mg/kg) of Macro- and Micro-elements in the First-Milked Colostrum of Cows Producing Twin or Single Calves

Components (mg/kg)	Twin calving			Twinning average (n = 32)	Single calving (n = 32)	Difference
	B + B (n = 9)	H + H (n = 8)	B + H (n = 15)			
Potassium	2244	2169	2099	2157	1988	169
Sodium	1363	1299	1411	1370	1245	125
Calcium	3054	3196	3062	3093	2963	130
Phosphorus	2455	2526	2314	2407	2117	290
Magnesium	415	429	398	411	382	29
Zinc	31.5	28.2	29.3	29.6	26.4	3.2
Iron	4.96	5.14	5.31	5.17	4.54	0.63
Copper	0.632	0.617	0.587	0.607	0.597	0.01
Manganese	0.131	0.122	0.132	0.129	0.114	0.015

significant differences in the composition of colostrum could be detected.

First-milked colostrum contained 19.7 and 20.2 mg/ml more IgG, respectively, for ewes and goats producing twins than for those producing a single offspring. Both differences were significant ($P \leq 0.001$). At 24 h after parturition, no differences in the IgG contents of colostrum from the two groups of either species could be identified (Table 3). The biological value of the colostrum, both immediately after parturition and 24 h later, was higher for goats and ewes producing twins than for those giving birth to a single progeny, but the differences were not statistically significant. The differences in the biological value may represent a true difference, but

Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins

455

the numbers of goats and ewes involved were too small for this difference to be conclusive. The higher biological value can be explained by the higher ratio of whey protein in the colostrum after twin-birth, because it is well known that the biological value of whey protein is higher than that of casein. Moreover, 48 h after parturition, the mean values were practically identical (Table 4).

Analyses of the data in Table 5 indicate identical values for the contents of macro- and micro-elements in colostrum from dams producing one lamb or twins.

The observed differences between the first milking post-partum colostrum, post-colostral milk and milk are in agreement with the findings of other authors (Newstead, 1976; Oyeniyi & Hunter, 1978; Bush & Staley, 1980; Csapó & Csapó-Kiss, 1984b). The total protein-, whey protein- and IgG contents at the first milking of goats and ewes were a little higher than those reported by Singh *et al.* (1972) and Parkash and Jenness (1976), and were similar to those reported by Maraval and Vignon (1982) and Csapó and Csapó-Kiss (1984b).

Since previous investigations (Tennant *et al.*, 1969; Kruse, 1970; Newstead, 1976; Oyeniyi *et al.*, 1977; Halliday *et al.*, 1978; Oyeniyi & Hunter, 1978; Losonczy *et al.*, 1979; Csapó, 1984) unequivocally showed that, in the colostrum of different genotypes, significant breed-dependent differences occurred, the cows examined were of the same genotype, and only colostrum from single- and twin-calving cows kept under identical conditions in the same farm were compared.

Analyses of the data in Tables 6 and 7 revealed that the colostrum from cows of both genotypes that produced twins had higher ($P \leq 0.001$) dry matter, total protein, true protein, whey protein and true whey protein contents than did that of cows producing a single calf. Differences between the breeds for these compositional traits were small and there was no evidence of birth-type by genotype interaction. These data are summarised across breeds in Table 8 and the twin birth minus single birth differences in percentages ($P \leq 0.001$) were 4.97 ± 0.45 , 2.29 ± 0.30 , 2.37 ± 0.29 , 2.54 ± 0.26 and 2.61 ± 0.25 , respectively, for dry matter, total protein, true protein, whey protein and true whey protein. The NPN protein equivalent of colostrum was lower in twin-bearing cows ($P \leq 0.05$ in Hungaro-Friesian cows and $P \leq 0.01$ in the pooled analysis) than in cows producing a single calf. Neither birth type nor breed caused a significant difference in casein content of colostrum.

The total protein-, whey protein- and IgG-content at the first-milking of cows post-partum were a little higher than those reported by Grieb (1968), Porter (1972), Oyeniyi and Hunter (1978), Larson *et al.* (1980), and were similar to those of Losonczy *et al.* (1979) and Bush and Staley (1980).

The colostrum of the two groups of cows calving twins contained 23.64 and 27.07 mg/ml more IgG, respectively, than did that of cows with a single calf. The average difference shown in Table 8 was 25.35 ± 4.35 and all of these differences were significant ($P \leq 0.001$). During the last two weeks pre-partum there is an accumulation of immunoglobulins in the udder by selective transport from the blood (Murphy *et al.*, 1964; Butler, 1971; Newstead, 1976; Larson *et al.*, 1980) and this transport results in a higher concentration of immunoglobulins in first milked colostrum of dams producing twins.

According to the data in Table 9, the biological value of the protein in cow's colostrum calculated on the basis of amino acid composition was higher by 9.4 for cows with twins than for those with a single calf for both the Holstein-Friesian and Hungaro-Friesian genotypes. These differences were significant ($P \leq 0.05$ in the breed analyses and $P \leq 0.01$ in the pooled analysis). The higher biological value can be explained by the higher whey protein content of the colostrum from cows producing twins. The differences found between the two groups in the biological value of milk protein on the first day of lactation may indicate a true difference, but the number of cows involved was too small for this difference to be conclusive. There was no difference in the biological value of the colostrum from cows calving bulls, heifers or twins with mixed sex. As seen in Table 10, there was no difference in the macro- and micro-element content of the colostrum between twin- and single-calving cows.

In summary, it can be established that in the case of each species the first-milked colostrum of dams producing twins contained significantly more dry matter, total protein, whey protein and IgG than that of dams giving birth to a single progeny. In milk samples collected later from goats and ewes, this difference could not be identified. Significant differences in the casein and macro- and micro-element contents could not be detected even in the first-milked colostrum, despite occasional differences in the mean values. Differences in NPN content and biological value were detected only in samples from cows where larger numbers were available. The biological value of colostrum protein from twin-producing cows was higher than that of colostrum from cows having single calves. The NPN content of colostrum was higher for cows producing a single calf. Since IgG is a part of the whey protein, and the latter is a part of the total protein content, it seems that the differences found in the first colostrum were due primarily to the immunoglobulin G. Hence it follows that since the quantity of first colostrum is limited, the mother, by increasing the concentration of immunoglobulins in the same volume of colostrum, tries to satisfy the requirements of twins and to provide them with passive immunity.

REFERENCES

- Bush, L.J. & Staley, T.E. (1980). Absorption of colostral immunoglobulins in new-born calves. *J. Dairy Sci.*, **63**, 672–80.
- Bush, L.J., Aquilera, M.A., Adams, G.D. & Jones, E.W. (1971). Absorption of colostral immunoglobulins by new-born calves. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1547–9.
- Butler, J.E. (1971). Review of the bovine immunoglobulins. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1315–26.
- Csapó, J. (1984). Composition of colostrum and milk in cattle of different genotype. PhD dissertation. PANNON Agricultural University Faculty of Animal Science, Kaposvár, Hungary, p. 119.
- Csapó, J. & Csapó-Kiss, Z. (1984a). Effect of the criss-cross method used for the Hungaro-Friesian, Jersey and Holstein-Friesian cattle on the composition of colostrum and normal milk. *Szaktanacsok*, **1**, 32–7.
- Csapó, J. & Csapó-Kiss, Z. (1984b). Protein content, protein composition, macro- and micro elements in goat's milk. *Tejipar*, **33**, 69–73.
- Csapó, J. & Csapó-Kiss, Z. (1986). Optimisation of hydrolysis and determination of amino acid content of food and feed products. *Acta Alimentaria*, **15**, 3–21.
- Csapó, J., Horvath, A.M. & Makay, B. (1982a). Comparison of the dry matter-, crude protein-, whey protein-, casein- and non protein nitrogen content of colostrum and postcolostral milk from Holstein-Friesian, Hungarian red spotted and Holstein-Friesian $\times$ Hungarian red spotted (F1) cows. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **37**, 411–4.
- Csapó, J., Terlaky-Balla, E., Csapó, Z. & Makay, B. (1982b). Amino acid composition of colostrum, postcolostral milk and milk protein and their changes in Holstein-Friesian, Hungarian red spotted and Holstein-Friesian $\times$ Hungarian red spotted (F1) cows after calving. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **37**, 415–9.
- Csapó, J., Csapó-Kiss, Zs. & Lengyel, A. (1986). Composition of ewe's milk and colostrum. *Tejipar*, **35**, 11–24.
- Csapó, J., Csapó-Kiss, Zs. & Nemeth, K. (1987). Composition of goats milk and colostrum. *Tejipar*, **36**, 35–45.
- Grieb, G. (1968). Untersuchungen über die Kolostrumperiode des Kalbes über den Eiweiss- und Vitamin-A Gehalt der Kolostralmilch sowie der Milch in den ersten 30 Laktationstagen. 1. Mitteilung: Der Eiweissgehalt der Kolostralmilch und Milch. *Arch. Tierzucht*, **11**, 151–63.
- Halliday, R., Russel, A.J. F., Williams, M.R. & Peart, J.N. (1978). Effect of energy intake during late pregnancy and of genotype on immunoglobulin transfer to calves in suckler herds. *Res. Vet. Sci.*, **24**, 26–34.
- Kiddy, C.A., McCann, R., Maxwell, C., Rock, C., Pierce, E. & Butler, J.E. (1969). Changes in levels of immunoglobulins in serum and other body fluids immediately after parturition. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1325–27.
- Kruse, V. (1970). Yield of colostrum and immunoglobulin in cattle at the first milking after parturition. *Anim. Prod.*, **12**, 619–26.
- Kvapilík, J., Suchanek, B. & Brauner, J. (1975). Premena mleziva na mlekozrálne se zamerením na jeho chemické a technologicke vlastnosti. *Zivocisna Vyroba*, **20**, 169–82.
- Larson, B.L., Heary, H.L. & Devery J.E. (1980). Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **63**, 665–71.

458 J. Csapó, Z. Csapó-Kiss, T. G. Martin, J. Szentpeteri, G. Wolf

- Losonczy, S., Pethes, Gy., Frenyo, V.L., Antal, T. & Szabo, I. (1979). Quick physiological test to control optimal colostrum uptake by calves in large scale management. I. Pre- and postcolostral serum IgG concentration of calves. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **34**, 371–75.
- Mancini, G., Carbonara, A. & Heremans, J.F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immuno-diffusion. *Immunochemistry*, **2**, 235–54.
- Maraval, B. & Vignon, B. (1982). Entwicklung der Mineralzusammensetzung von Ziegenmilch zu Beginn der Laktation. *Milchwissenschaft*, **37**, 464–6.
- Moore, S. & Stein, C.H. W. (1951). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **192**, 663–81.
- Morup, K. & Olesen, E.S. (1976). New method for prediction of protein value from essential amino acid pattern. *Nutr. Rep. Int.*, **13**, 355–65.
- Murphy, F.A., Aalund, O., Osebold, J.W. & Carroll, E.J. (1964). Gamma globulins of bovine secretions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 230–9.
- Newstead, D.F. (1976). Carotene and immunoglobulin concentrations in the colostrum and milk of pasture-fed cows. *J. Dairy Res.*, **43**, 229–37.
- Oyeniyi, O.O. & Hunter, A.G. (1978). Colostral constituents including immunoglobulins in the first three milkings postpartum. *J. Dairy Sci.*, **61**, 44–8.
- Oyeniyi, O.O., Hunter, A.G. & Dunshee, M. (1977). Protein changes in colostrum from the first three milkings. Univ. Minnesota Dairy Day Report, p. 31.
- Parkash, S. & Jenness, R. (1976). The composition and characteristics of goat's milk: A review. *Dairy Sci. Abstr.*, **30**, 67–87.
- Porter, P. (1972). Immunoglobulins in bovine mammary secretions. Quantitative changes in early lactation and absorption by the neonatal calf. *Immunology*, **23**, 225–38.
- Roy, J.H. B. (1980). Factors affecting susceptibility of calves to disease. *J. Dairy Sci.*, **63**, 650–8.
- Singh, N.P., Sachdeva, K.K. & Sengar, O.P. S. (1972). A study on the nitrogen distribution in goat's milk. *Milchwissenschaft*, **27**, 165–7.
- Tennant, B., Harrold, M., Reina-Guerra, M. & Laben, C. (1969). Neonatal alteration in serum gamma globulin levels of Jersey and Holstein-Friesian calves. *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 345–54.
- Voigtlander, K.H. & Glasser, H.L. (1974). Die Veränderungen der Zusammensetzung von Kolostralmilch und Transitorischer Milch. *Arch. Tierzucht.*, **17**, 107–18.
- Warner, R.G. & Brownstein, M.T. (1976). Factors affecting the immune response in calves and its relationship to subsequent performance. *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, p. 26.



Int. Dairy Journal 5 (1995) 393–402
 © 1995 Elsevier Science Limited
 Printed in Ireland. All rights reserved
 0958-6946/95/\$9.50 + .00

0958-6946(94)00008-5

Composition of Mares' Colostrum and Milk. Fat Content, Fatty Acid Composition and Vitamin Content

J. Csapó, J. Stefler, T. G. Martin*, S. Makray & Zs. Csapó-Kiss

Pannon Agricultural University, Faculty of Animal Science, Kaposvár H-7401,
 Dénesmajor 2, Hungary

(18 October 1993; revised version accepted 25 April 1994)

ABSTRACT

Changes in the fat content, fatty acid composition and vitamin content of mares' colostrum and milk during the first 45 days of lactation were studied. Milk samples (300–800 cm³) from 29 lactating mares were collected daily at the beginning of lactation and weekly from 5 to 45 days post-partum. Colostrum and early milk samples were obtained by hand, without oxytocin administration, while the foal nursed. Later milk samples were from mixed milk of the totally-milked udder. Each sample was analysed for total solids, fat content, fatty acid composition and vitamin content by conventional methods and gas chromatography.

The total solids and the fat contents, respectively, of the colostrum and milk were 24.25–26.28% and 2.85–2.93% on the first day of lactation, 12.15–12.78% and 2.05–2.17% on days 2–5 and 10.37–10.61% and 1.04–1.32% on days 8–45 of lactation. The concentrations of octanoic, decanoic, dodecanoic, myristic and palmitoleic acids increased over time while stearic, oleic, linoleic and linolenic acids decreased. The fatty acid composition of mares' milk fat was very different from that of cows' milk fat. Mares' milk fat contained octanoic, decanoic, dodecanoic, linoleic, linolenic, stearic, myristic and palmitic acids, respectively, in ratios of approximately 9.6, 3.1, 2.1, 4.4, 224, 0.2, 0.6 and 0.5 times those of the concentrations in cows' milk. On the basis of the differences in fatty acid composition, a new method was developed to determine the amount of cows' milk mixed with mares' milk.

Contents of vitamins A, D₃, K₃ and C in colostrum (0.88, 0.0054, 0.043, 23.8 mg kg⁻¹) were found to be 1.4–2.6 times the levels in normal milk (0.34, 0.0032, 0.029, 17.2 mg kg⁻¹). No significant difference was found between the vitamin E contents of colostrum and milk (1.342 and 1.128 mg kg⁻¹). Vitamin contents of mares' milk were very similar to those in cows' milk.

*Visiting Professor and Fulbright Lecturer. Present address: Department of Animal Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.

INTRODUCTION

The relative importance of the horse industry in Hungary has changed greatly in recent years due to mechanisation in agriculture. In 1991, there were 74,000 horses in Hungary, with most of the industry being associated with sport horses and slaughter horses. Currently, there is considerable interest in the use of mares' milk for human consumption in Western Europe. It has been suggested that mares' milk may be a curative agent for metabolic and allergic diseases and, consequently, the price paid for mares' milk has increased greatly. This suggests a new possibility for producing income from the horse industry. It also suggests that research is needed to evaluate mares' milk as a human food. Most of the earlier research on the composition of mares' milk was directed toward evaluating the value of milk as related to nutrition of the foal.

Duration of lactation has been reported to be 5–8 months (Tyler, 1972; Feist & McCullough, 1976) and estimated milk production of mares was 2000–3000 kg (Neuhaus, 1959). During a single milking, composition of the milk changes, so the mixed milk of the totally-milked udder must be sampled (Linton, 1937; Csapó, 1984). Butterfat content undergoes the largest change (Neuhaus, 1959; Doreau *et al.*, 1986), and can be 10–20 times more at the end than that at the beginning of milking (Dittrich, 1938; Dyusembin, 1972; Doreau *et al.*, 1986). Sampling method and milking interval (Martin-Rosset *et al.*, 1978; Gibbs *et al.*, 1982) also influence the composition of milk. Most authors suggest that foals should be present at sampling (Neseni *et al.*, 1958; Johnston *et al.*, 1970; Linzell, 1972; Aschraft & Tyznik, 1976; Bouwman & Van der Schee, 1978; Gibbs *et al.*, 1982; Ofledal *et al.*, 1983; Zimmermann, 1985; Miraglia *et al.*, 1986; Boulot, 1987), others advise an injection of oxytocin (Linzell, 1972; Ofledal *et al.*, 1983).

Mares' colostrum has been analysed by several authors (Johnston *et al.*, 1970; Rouse & Ingram, 1970; McGuire *et al.*, 1972). The colostrum period of mares was found to be much shorter than that of cows, and the colostrum showed significant differences from normal milk only on the first day after foaling (Neseni *et al.*, 1958; Ullrey *et al.*, 1966; Johnston *et al.*, 1970). The dry matter content of mares' milk decreased drastically from colostrum to normal milk, due primarily to a decrease in protein content (Neseni *et al.*, 1958; Intrieri & Minieri, 1970); the fat content and fatty acid composition of milk fat showed much smaller changes over time (Intrieri & Minieri, 1970; Base & Zadrazil, 1982).

The fat content of mares' milk is very low (Jenness, 1974; Doreau & Boulot, 1989). However, it can be influenced by environment and ranged from 0 to 7.9% (Neseni *et al.*, 1958; Neuhaus, 1959). Analysis of the fatty acid composition of butterfat of mares' milk showed (Intrieri & Minieri, 1970; Base & Zadrazil, 1982; Jaworski *et al.*, 1982; Kulisa, 1986) that it contains very small quantities of stearic and palmitoleic acids, and high quantities of linolenic and linoleic acids. This could be explained by the fact that unsaturated fatty acids are not hydrogenated in the digestive system and horses consume a very large amount of forage, which is rich in unsaturated fatty acids.

Among the factors influencing milk composition, stage of lactation is the most important, but the stage of lactation may (Intrieri & Minieri, 1970) or may not (Jaworski *et al.*, 1982) influence the fatty acid composition of milk fat. Most authors (Neseni *et al.*, 1958; Kulisa, 1977) have reported that breed does not affect milk composition, but Boulot (1987) reported a significant effect of breed.

Increasing the fat content of feed did not increase the quantity of milk and caused no change in milk composition (Zimmerman, 1985), which differed from effects on cows' milk (Doreau *et al.*, 1988). Others found a higher milk fat content to be associated with higher fat input (Davison *et al.*, 1987).

Holmes *et al.* (1946) and Kulisa (1986) published data on the concentration of water soluble vitamins in mares' milk. No estimates of fat soluble vitamins in mares' milk were found in the literature.

Based on the fact that data on the fatty acid composition of mares' milk are limited and that there are virtually no data comparing the fatty acid composition of mares' milk with cows' milk in the same trial, a study was initiated at the Pannon Agricultural University to evaluate the composition of mares' and cows' milk simultaneously. Additional objectives of the experiment were to evaluate changes in milk composition from foaling to 45 days post-partum and to obtain more detailed information on the concentrations of polyunsaturated essential fatty acids in mares' milk.

MATERIALS AND METHODS

In the spring of 1991, the experiments were initiated and milk samples from 29 mares (16 Hungarian Draughts, 4 Haflingers, 6 Bretons and 3 Boulonnais) were collected and analysed. Mares were on pasture of relatively good quality (1 ha per mare-foal pair), from spring to autumn; supplemental feeding, when needed, was 3 kg oats per day. Winter feeding was 3 kg hay, 2 kg concentrate and a further amount of straw daily.

Mares were milked according to the following schedule: they were driven in the stable at 06:00 hours. Each mare and foal were tied. First milking was started at 09:00 and finished at 11:00 hours. During milking, foals were released, but retied following milking. The second milking was between 11:15 and 12:30 hours. The foals were not retied after the second milking because mares and foals were returned to the pasture until 06:00 hours the following day. Milking of mares was undertaken with a Westfalia milking machine (model RPSZ 400).

Colostrum and milk samples (80–100 cm³) were taken directly after foaling and on the second and third days of lactation by hand milking. On days 5, 10, 30 and 45 of lactation, the mixed milk of the totally-milked udder was sampled. Colostrum and milk samples were frozen and stored at –25°C. At the time of analysis, the frozen material was thawed and mixed. Dry matter of colostrum and milk samples was determined by Hungarian Standard No. 3744-67 by drying to constant weight at 105°C. Fat content was determined by the Gerber method, according to Hungarian Standard No. 3703-78.

The composition of cow's milk was determined on samples from 32 cows by the same methods as were used for mare's milk. The cows were under summer feeding conditions, based principally on grass. The sample consisted of 17 Holstein-Friesian sired crossbred cows (62.5% Holstein-Friesian, 25% Jersey and 12.5% Hungarian red spotted) which were in second or third lactation and 15 Hungaro-Friesian cows in first lactation.

The fatty acid profiles of the milk fat were determined as fatty acid methyl esters by a Packard 419 type gas chromatograph, a flame ionisation detector and a Hewlett-Packard 33900 type electronic integrator. For quantitative evaluation,

the weight percentage proportions of the methyl esters were regarded as equal to the proportions of the corresponding peaks in the chromatogram (Csapó *et al.*, 1986).

To determine vitamins A-, D₃- and E-contents of milk, samples (5 cm³) were saponified by alcoholic pyrogallol solution and 2.5 cm³ 80% KOH. The resulting material was extracted into alcohol-*n*-hexane. The extract was distilled and diluted in 200 µL methanol; 20 µL of the solution was injected into a 250 × 5 mm column packed with 10 µm granulation Partisil ODS, and the vitamin concentrations determined using a Pye UNICAM LC-XP HPLC. Elution was with a methanol:water (85:15) solution at a flow rate of 1.4 cm³ min⁻¹. The basis for quantitative evaluation was vitamin standards from MERCK. Vitamin K₃ was determined on a solution obtained by a chloroform extraction of an alkaline substrate. The extracted vitamin K was detected at 251 nm. The vitamin C content of milk samples was determined by the method of Radeff (1938).

RESULTS AND DISCUSSION

The dry matter content and changes associated with stage of lactation (colostrum to 45 days) for mares of the four breeds are shown in Table 1. Changes in the fat content of colostrum and milks for the same period are given in Table 2. Table 3 shows fatty acid contents of milk fat, expressed as relative percentages of fatty acid methyl esters and time changes. Comparison of the fatty acid composition of mares' milk, cows' milk and blends are summarized in Table 4.

The dry matter content of colostrum immediately after foaling ranged from 14.65 to 29.35%. The mean and standard deviation (S.D.) were 25.57 and 4.10%. Due to the large variation, breed differences were not significant ($p > 0.25$). Dry matter content decreased quickly following foaling, and values found on day 2 differed only slightly from those obtained 5 days after foaling. The dry matter content of transition milk, days 2-5 of lactation, averaged 12.55%. The dry matter content of normal milk obtained on days 8-45 averaged 10.42% with

TABLE 1
Dry Matter Contents of the Colostrum and Milk of Mares (g/100 g milk)

Breed	No. of mares	Days post-partum		
		0-0.5	2-5	8-45
Haflinger	4	24.25	12.87	10.61
S.D.		4.34	1.49	2.12
Breton	6	24.65	11.93	10.39
S.D.		6.38	2.05	1.24
Boulonnais	3	25.42	12.15	10.37
S.D.		4.12	2.22	1.73
Hungarian Draught	16	26.28	12.78	10.40
S.D.		3.16	1.64	1.57
Mean	29	25.57	12.55	10.42
S.D.		4.10	1.32	1.54

TABLE 2
Fat Content of the Colostrum and Milk of Mares (g/100 g milk)

Breed	No. of mares	Days post-partum		
		0-0.5	2-5	8-45
Haflinger	4	2.87	2.05	1.04
S.D.		0.462	0.183	0.610
Breton	6	2.91	2.10	1.32
S.D.		0.381	0.214	0.483
Boulonnais	3	2.85	2.17	1.29
S.D.		0.294	0.331	0.390
Hungarian Draught	16	2.93	2.16	1.26
S.D.		0.455	0.163	0.540
Mean	29	2.91	2.13	1.25
S.D.		0.431	0.189	0.499

TABLE 3
Mean and Standard Deviations for the Fatty Acid Composition of the Lipids in Colostrum and Milk of Mares (Relative Percentages of the Fatty Acid Methyl Esters)

Fatty acids	Days post-partum							
	Mare						Cow	
	0-0.5		2-5		8-45		5-270	
	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.
Octanoic	1.39	0.18	2.56	0.94	2.79	0.91	0.29	0.022
Decanoic	5.41	0.47	8.59	2.89	8.05	2.25	2.61	0.219
Dodecanoic	7.90	1.57	9.89	3.19	8.97	2.10	4.35	0.362
Myristic	6.30	0.26	9.67	1.89	8.72	1.97	14.00	0.998
Palmitic	21.32	1.58	25.63	2.99	23.28	3.58	44.06	2.10
Palmitoleic	2.80	1.97	5.07	1.14	3.96	1.52	2.08	1.009
Stearic	2.36	0.53	1.63	0.51	1.55	0.79	7.94	1.001
Oleic	17.12	0.21	13.77	5.38	13.72	2.58	17.25	1.533
Oleic (ω 6)	0.78	0.29	0.74	0.21	0.69	0.24	*	
Linoleic	9.78	0.83	6.40	0.90	7.53	1.47	1.72	0.198
γ -Linolenic (ω 6)	0.75	0.13	0.51	0.03	0.61	0.19	*	
Linolenic	24.11	2.57	15.53	1.99	20.12	4.12	0.09	0.02

* Not determined

398

J. Csapó et al.

TABLE 4
Fatty Acid Composition of Mare's Milk Blended with Different Proportions of Cow's Milk (Calculated Values)

Fatty acid	Percentage of cow's milk in the blend (relative percentages of fatty acid methyl esters)						Cow milk
	Mare milk	1	5	10	25	50	
Octanoic	2.79	2.73	2.45	2.23	1.62	0.98	0.29
Decanoic	8.05	7.92	7.28	6.82	5.42	4.07	2.61
Dodecanoic	8.97	8.88	8.29	7.93	6.39	5.62	4.35
Myristic	8.72	8.87	9.24	9.94	11.21	12.56	14.00
Stearic	1.55	1.70	2.29	3.00	4.55	6.20	7.94
Linoleic	7.53	7.38	6.71	6.21	4.80	3.31	1.72
Linolenic	20.12	19.61	17.40	15.55	10.71	5.56	0.09
<i>f</i> -values							
Mean	2257	1840	816	390	57	5.3	0.005
S.D.	112	62.4	16.2	12.8	4.45	0.44	0.0007
99% confidence limits for <i>f</i> [Mean $\pm$ 3.25 (S.D.)]:							
Upper limit	2612	2043	869	432	72	6.7	0.007
Lower limit	1893	1778	763	348	43	3.9	0.003

$$f = \frac{\text{octanoic} \times \text{decanoic} \times \text{dodecanoic} \times \text{linoleic} \times \text{linolenic}}{\text{myristic} \times \text{stearic}}$$

S.D. = 1.54. There were no significant differences among breeds ($p > 0.25$) in the dry matter content of their colostrum or milk samples.

The fat content of colostrum immediately after foaling averaged 2.91% while that of transition and normal milks, averaged 2.13 and 1.25%, respectively. There were no significant differences ($p > 0.25$) among breeds in the fat content of their colostrum, transition milk or normal milk. These changes in the fat content of colostrum and milk over time after foaling confirm results of other authors (Linton, 1931; Johnston *et al.*, 1970). Those authors who reported an increase in the fat content of colostrum to 48 h (Ullrey *et al.*, 1966) or to day 7 of lactation (Forsyth *et al.*, 1975) probably made a sampling mistake due to the fact that the udder cannot easily be completely milked immediately after foaling and the fat content increases dramatically during milking. No relationship was found between milk quantity and fat content.

Comparison of the fatty acid composition of butterfat from colostrum and milk showed that the fat of colostrum contained less octanoic, decanoic, dodecanoic, myristic, palmitic and palmitoleic acids than that from normal milk. On

Composition of mares' colostrum and milk

399

the other hand, the fat of normal milk contained less stearic, linoleic and linolenic acids than that of colostrum. There were no significant differences among breeds regarding fatty acid content, and data shown in Table 3 represent the arithmetic averages of 29 mares, ignoring breed.

Results of these analyses were in agreement with the data in the literature. Exceptions were linoleic acid which was significantly less and linolenic acid, which was significantly higher than data in the literature. These differences can be explained by the composition of the diet of mares. The fatty acid composition of feedstuffs was a greater influence on the fatty acid composition of milk fat in horses than in ruminants. Microbial action in the rumen results in greater modification of dietary fats than would occur in the horse.

When comparing the fatty acid composition of milk fat of mares at day 45 of lactation with cows, it can be stated that the fat of mares' milk contains 2.1 times as much dodecanoic acid, 3.1 times as much decanoic acid, 4.9 times as much linoleic acid, 9.6 times as much octanoic acid and 224 times as much linolenic acid as cows' milk fat. On the other hand, the fat of mares' milk contains only 0.62 times as much myristic acid, 0.53 times as much palmitic acid and 0.2 times as much stearic acid as cows' milk fat. The fatty acids which are higher in mares' milk are unsaturated or short chain fatty acids which suggests that mares' milk fat is a more desirable dietary constituent than cows' milk fat. This large difference between the fatty acid contents of the milk fat of the two species suggests that fatty acid composition could be used to detect the presence of cows' milk in a blend of milks from the two species.

The fatty acid content of cows' milk and mares' milk are shown in the first and last columns of Table 4. A ratio of fatty acid contents, designated as the *f*-factor, was calculated as the product of fatty acids higher in mares' milk divided by the product of fatty acids higher in cows' milk.

$$f = \frac{(\text{octanoic} \times \text{decanoic} \times \text{dodecanoic} \times \text{linoleic} \times \text{linolenic})}{(\text{myristic} \times \text{stearic})}$$

Based on the averages, the *f*-value for mares' milk was 2257 and that of cows' milk was 0.005. Using day 45 milk of 10 mares and milk from 10 individual cows, *f*-values were calculated for each individual and the standard deviations were calculated as 112 and 0.0007, respectively, for mares and cows.

Assuming the fat contents of mares' and cows' milk to be 1.5 and 4.0%, respectively, the fatty acid contents of various blends were calculated and are shown in Table 4. The *f*-values for 1, 5, 10, 25 and 50% cows' milk were 1840, 816, 390, 57, and 5.3, respectively. Mare-cow pairs were formed randomly at each blend and 10 *f*-values were calculated for each blend. These values were used to calculate the standard deviations for each blend, which are shown in Table 4. The *t*-value for nine degrees of freedom and probability of 0.01 ($t = 3.25$) was used to calculate the 99% confidence band for each blend. Confidence limits = mean $\pm$ 3.25 (S.D.). The confidence limits are shown at the bottom of Table 4 and it can be seen that we could not be 99% certain of detecting traces of cows' milk at a level of 1%, but we could be 99% certain of detecting cows' milk at a level of 5%.

All of the above results were based on calculations. The method was tested by creating five blended samples from individual mares and cows at the level of 5%

TABLE 5
Vitamin Content of Mare's Colostrum and Milk

Vitamin (mg/kg)	Days post-partum		
	Mare		Cow
	0-0.5	8-45	5-270
A	0.88	0.34	0.352
D ₃	0.0054	0.0032	0.0029
E	1.342	1.128	1.135
K ₃	0.043	0.029	0.032
C	23.8	17.2	15.32

cows' milk. The *f*-values ranged from 763 to 824 and, when compared with the calibration curve developed from the calculated values, predicted 4.95% cows' milk. Based on the results, the *f*-value can be used as a means of detecting small quantities of cows' milk blended with mares' milk and the level of dilution can be predicted quite accurately.

The analysed vitamin contents of colostrum and milk (Table 5) showed that colostrum contained 2.6, 1.7, 1.4 and 1.5 times as much vitamins A, D₃, C and K₃, respectively, as mares' milk between days 8 and 45 of lactation. Vitamin E contents of colostrum and milk were similar. Mares' milk contained practically the same amounts of vitamins A, D₃ and K₃ as cows' milk, but vitamin C content was slightly higher.

Since the fat content of cows' milk is 2.5-3.0 times as high as that of mares' milk, the concentrations of liposoluble vitamins in milk fat is much higher in mares' milk fat than in cows' milk fat. The values given in Table 5 appear to be the first reported for contents of vitamins A, D₃, E and K₃. Vitamin C has been reported to be 14.7 mg kg⁻¹ (Holmes et al., 1946) which is slightly lower than the 17.2 mg kg⁻¹ in Table 5.

ACKNOWLEDGEMENT

The financial support of Hungarian Research Fund (OTKA T 12769) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Aschraft, A. & Tyznik, W. J. (1976). Effect of diet on volume and composition in mare's milk. *J. Anim. Sci.*, **43**, 248 (Abstract).
 Base, J. & Zadrazil, K. (1982). Fatty acid of milk fat in mare's milk. *Proc. XXI Int. Dairy Congr.*, Moscow, pp. 621-2.
 Boulot, S. (1987). L'ingestion chez la jument. Etude de quelques facteurs de variation au cours du cycle gestation-lactation. Implications, nutritionnelles et métaboliques. Thèse Doct. Ing., ENSA Rennes, Univ. Rennes I, France.
 Bouwman, H. & Van der Schee, W. (1978). Composition and production of milk from

- Dutch warm-blooded saddle horse mares. *Z. Tierphysiol. Tierern. u. Futtermittelk.*, **40**, 39-53.
 Csapó, J. (1984). Colostrum and milk composition of several genotypes of cattle. PhD thesis, PATE, Kaposvár.
 Csapó, J., Sugár, L., Horn A. & Csapó Z. (1986). Chemical composition of milk from red deer, roe and fallow deer kept in captivity. *Acta Agron. Hungarica*, **3-4**, 359-72.
 Davison, K. E., Potter, G. D., Greene, L. W., Evans, J. W. & McMullan, W. C. (1987). Lactation and reproductive performance of mares fed added dietary fat during late gestation and early lactation. *Proc. 10th Eq. Nutr. Physiol. Symp.*, Colorado State University, pp. 87-92.
 Dittrich, H. (1938). A study of the composition of mare's milk. *Milchwirtschaftliche Forschungen*, **19**, 406-12.
 Doreau, M. & Boulot, S. (1989). Methods of measurement of milk yield and composition in nursing mares: A review. *Le Lait*, **69**, 159-61.
 Doreau, M., Boulot, S., Martin-Rosset, W. & Dubroeuq, H. (1986). Milking lactating mares using oxytocin. *Reprod. Nutr. Dev.*, **26**, 1-11.
 Doreau, M., Bruhat, J. P. & Martin-Rosset, W. (1988). Effects du niveau des apports azotés chez la jument en début de lactation. *Ann. Zootechn.*, **37**, 21-30.
 Dyusembin, K. (1972). Uneven distribution of major milk components in consecutive portions of a milking in farm animals. *Trudy Inst. Fiziol. Alma-Ata*, **17**, 42-5.
 Feist, J. D. & McCullough, D. (1976). Behaviour patterns and communication in feral horses. *Z. Tierpsychol.*, **41**, 337-71.
 Forsyth, I. A., Rossdale, P. D. & Thomas, C. R. (1975). Studies on milk composition and lactogenic hormones in the mare. *J. Reprod. Fert.*, **23**, 631-5.
 Gibbs, P. D., Potter, G. D., Blake, R. W. & McMullan, W. C. (1982). Milk production of quarter horse mares during 150 days of lactation. *J. Anim. Sci.*, **54**, 496-9.
 Holmes, A. D., McKey, B. V., Wertz, A. W., Lindquist, H. G. & Parkinson, L. R. (1946). The vitamin content of mare's milk. *J. Dairy Sci.*, **29**, 163-71.
 Intrieri, F. & Minieri, L. (1970). Composition of milk of Hafling mares. *Dairy Sci. Abstr.*, **32**, 665.
 Jaworski, J., Jaworska, H., Tomczynski, R. & Smoczynski, S. (1982). Skład kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka klaczy w okresie laktacji. *Zesz. Nauk. Akad. Roln. Tech. Olsztynie*, **17**, 85-94.
 Jenness, R. (1974). The composition of milk. In: *Lactation of Mare, Comprehensive Treatise. Vol III. Nutrition and Biochemistry of Milk*, ed. B. L. Larson & V. R. Smith. Academic Press, London, pp. 3-107.
 Johnston, R. H., Kamstra, L. D. & Kohler, P. H. (1970). Mare's milk composition as related to foal heat scours. *J. Anim. Sci.*, **31**, 549-53.
 Kulisa, M. (1977). The composition of mare's milk in three horse breeds with reference to *N*-acetylneuraminic acid. *Acta Agrar. Silv. Ser. Zootech.*, **27**, 25-37.
 Kulisa, M. (1986). Selected amino acids, fatty acids and *N*-acetylneuraminic acid in mare milk. *Proc. 37th Ann. Meet. EAAP*, Budapest, p. 442.
 Linton, R. G. (1931). The composition of mare's milk. *J. Agric. Sci.*, **21**, 669-88.
 Linton, R. G. (1937). The composition of mare's milk. *J. Dairy Sci.*, **8**, 143-72.
 Linzell, J. L. (1972). Milk yield, energy loss in milk and mammary gland weight in different species. *Dairy Sci. Abstr.*, **34**, 351-60.
 Martin-Rosset, W., Doreau, M. & Cloix, J. (1978). Etude des activités d'un troupeau de poulinières de trait et de leurs poulains au paturage. *Ann. Zootech.*, **27**, 33-45.
 McGuire, T. C., Crawford, T. B. & Henson, J. B. (1972). The isolation, characterization and functional properties of equine immunoglobulin classes and subclasses. *3rd Int. Conf. Equine Infectious Diseases*, pp. 364-81.
 Miraglia, N., Quintavalla, F., Mariani, P. & Catalano, A. L. (1986). Plasma biochemistry changes in mares and foals in relation to nutritional aspects. Preliminary trials. *Proc. 37th Ann. Meet. EAAP*, Budapest, p. 11.

- Neseni, R., Flade, E., Heidler, G. & Steger, H. (1958). The yield and composition of mare's milk throughout lactation. *Archiv für Tierzucht*, **1**, 91–129.
- Neuhaus, U. (1959). Milch und Milchgewinnung von Pferdestuten. *Z. Tierzucht.*, **73**, 370–92.
- Oftedal, O. T., Hintz, H. F. & Schryver, H. F. (1983). Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. *J. Nutr.*, **113**, 2196–206.
- Radeff, T. (1938). Eine Methode zur Bestimmung des Vitamin-C in der Milch. *Milchw. Forsch.*, **19**, 187–92.
- Rouse, B. T. & Ingram, D. G. (1970). The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. *Immunology*, **19**, 901–7.
- Tyler, S. (1972). The behaviour and social organisation of New-Forest ponies. *Anim. Behav. Monogr.*, **5**, 85–196.
- Ullrey, D. E., Sruther, R. D., Hendricks, D. G. & Brent, B. E. (1966). Composition of mare's milk. *J. Anim. Sci.*, **25**, 217–22.
- Zimmerman, R. A. (1985). Effect of ration on composition of mare's milk. *Proc. 9th Eq. Nutr. Physiol. Symp.*, Michigan State University, pp. 96–102.



0958-6946(94)00014-X

Int. Dairy Journal **5** (1995) 403–415
 © 1995 Elsevier Science Limited
 Printed in Ireland. All rights reserved
 0958-6946/95/\$9.50 + .00

Composition of Mares' Colostrum and Milk. Protein Content, Amino Acid Composition and Contents of Macro- and Micro-elements

Zs. Csapó-Kiss, J. Stefler, T. G. Martin*, S. Makray & J. Csapó

Pannon Agricultural University, Faculty of Animal Science, Kaposvár H-7401,
 Dénesmajor 2, Hungary

(Received 18 October 1993; revised version accepted 25 April 1994)

ABSTRACT

Changes in the protein content, protein fractions and amino acid composition of mare's colostrum and milk, and the biological value of milk protein during the first 45 days of lactation were studied. Milk samples (averaging 300–800 cm³) from 29 lactating mares were collected daily at the beginning of lactation and weekly from the 5th to 45th days post-partum. Colostrum samples were obtained by hand milking without oxytocin administration, while the foals nursed, and milk samples were obtained from the mixed total daily production. Each sample was analysed for total protein, true protein, whey protein, true whey protein, casein and non-protein nitrogen (NPN) content using a Kjell-Foss nitrogen analyser and for amino acid composition using a LKB amino acid analyser. The biological value of the milk protein was calculated on the basis of amino acid composition by the method of Morup and Olesen (1976). The contents of ash and macro- and micro-elements in colostrum and milk were also determined.

The total protein, whey protein, casein and NPN contents, respectively, were 16.41, 13.46, 2.95 and 0.052% for colostrum immediately after parturition; 4.13, 2.11, 2.02 and 0.043% for milk between the 2nd and 5th days and 2.31, 1.11, 1.20 and 0.031% for milk on the 8th to 45th days of lactation. The ratios of true protein and whey protein to total protein decreased, while the comparable ratios of casein and NPN increased from foaling to 45 days. The amino acid contents of colostrum and milk decreased during the first 45 days of lactation. Most of the essential amino acids (threonine, valine, cystine, tyrosine, lysine) decreased, while glutamic acid and proline increased in the milk protein after parturition. Therefore, the biological

*Visiting Professor and Fulbright Lecturer. Present address: Department of Animal Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.

value of the milk protein was highest (132.3) immediately after parturition due to very high levels of threonine and lysine. This value decreased in the course of 5 days to 119.7 and to 107.9 on the 45th day of lactation. The essential amino acid composition and biological value of mare's milk protein was much higher than that of bovine milk proteins.

The ash content of colostrum (0.592%) was significantly higher than that of normal milk (0.405%). Calcium content was lowest immediately after foaling (747.7 mg/kg) and reached a maximum at day 5 (953.7 mg/kg). Zinc and copper contents decreased after reaching a maximum on day 5, while manganese content increased to day 5 and maintained that level. The concentrations of macro- and micro-elements (mg/kg) in colostrum and milk, respectively, were: potassium, 928.6 and 517.2; sodium, 320.0 and 166.6; calcium, 747.7 and 822.9; phosphorus, 741.7 and 498.8; magnesium, 139.7 and 65.87; zinc, 2.95 and 1.99; iron, 0.996 and 1.209; copper, 0.606 and 0.249 and manganese, 0.0447 and 0.0544.

INTRODUCTION

The first report in this series (Csapó et al., 1994) reviewed the reasons for initiating studies on the composition of mare's milk and reported dry matter and fat contents of mare's colostrum and milk and the fatty acid composition of milkfat. This report concerns contents of protein and protein fractions in colostrum and milk, amino acid composition of milk and milk protein, biological value of mare's milk protein and concentrations of macro- and micro-elements in colostrum and milk.

Mare's colostrum was reported to contain more than 10% protein and almost 80% of the protein content was immunoglobulins (Deskur et al., 1978; Intrieri and Minieri, 1970; Neseni et al., 1958). Those concentrations decreased rapidly after foaling. Most foals are born with agammaglobulinaemia or hypogammaglobulinaemia, and colostrum with a high immunoglobulin content is needed as soon as possible to endow passive immunity (Conti et al., 1984; McGuire et al., 1972, 1975).

Following the colostrum period, the total protein content of mare's milk ($N\% \times 6.38$, Neseni et al., 1958) was 1.7–3% (Bouwman and Van der Schee, 1978; Doreau et al., 1990; Gibbs et al., 1982; Kulisa, 1977, 1986; Minieri and Intrieri, 1970; Miraglia et al., 1986; Neseni et al., 1958; Smoczynsky and Tomczynski, 1982; Ullrey et al., 1966). Casein, as a proportion of total protein, was less than 50% in most cases, while whey protein was more than 50%. In mare's milk, the percentage of non-protein nitrogen (NPN) was surprisingly high compared with other farm animal species, and may represent 10% of total nitrogen. The NPN fraction contains a lot of free amino acids (Doreau et al., 1988). The proteose-peptone fraction of mare's milk was reported to be 0.16–0.19% (Storch, 1985; Urbinisov et al., 1981). After the colostrum period, the whey protein fraction of mare's milk contains 11–21% immunoglobulin, 2–15% serum albumin, 26–50% α -lactalbumin and 28–60% β -lactoglobulin (Minieri and Intrieri, 1970; Senft and Meyer, 1980; Urbinisov et al., 1981; Ustinova et al., 1983).

There are few reliable data on the amino acid composition of colostrum and milk of mares. The amino acid composition of protein showed little change during the colostrum period and was similar to that of ruminants with the excep-

tion of arginine and threonine, and was very similar to that of sow's milk (Sarkar et al., 1953). Others (Duisembaev, 1973; Kulisa, 1986; Peltonen, 1980) reported that the amino acid composition of mare's milk differed significantly from that of other farm animals due to higher cystine and glycine contents. Mare's milk contains a lot of free serine and glutamic acid but is low in methionine.

Among factors which influence the protein composition of mare's milk, stage of lactation is the most important. The protein content of mare's milk decreases rapidly to the second week of lactation and continues to decrease slowly to the end of the second month (Bouwman and Van der Schee, 1978; Gibbs et al., 1982; Lukas et al., 1972). NPN content did not change during the first two months of lactation (Ofstedal et al., 1983). After the colostrum period, stage of lactation had no significant effect on either the ratio of milk protein fractions (Deskur et al., 1978; Kulisa, 1977; Minieri and Intrieri, 1970; Miraglia et al., 1986), or the total amino acid composition (Doreau et al., 1990).

Most authors (Deskur et al., 1978; Duisembaev and Akimbekov, 1982; Kulisa, 1977; Neseni et al., 1958) reported no breed effect on milk composition, but Boulot (1987) reported a significant effect. Though there were considerable individual variations (Balbierz et al., 1975; Boulot, 1987; Johnston et al., 1970; Ofstedal et al., 1983), there was a low correlation between milk yield and milk composition.

The protein content of mare's milk decreased when the energy content of the feed increased (Doreau et al., 1990), which differs from results experienced with cattle (Rémond, 1985). Several authors (Gibbs et al., 1982; Peltonen et al., 1980) have not found a relationship between the nitrogen content of feed and the total protein content of mare's milk, while others reported a dramatic decrease in the levels of protein and NPN in milk if the nitrogen content of the feed was reduced (Doreau et al., 1988).

Most authors only determined the main components of the protein of mare's milk and very few of them determined the total and free amino acid composition of milk. There is very little information on how protein content and amino acid composition of milk protein change after parturition and during lactation. There are very few data concerning the free amino acid content of mare's milk and the amino acid composition and biological value of mare's milk protein in comparison with cows' milk and bovine milk protein determined at the same time and by the same method.

Mineral content of mare's milk has been reported to be lower than that of milk of other farm animals. Ash content (Table 1) was generally reported to be 0.3–0.5%, with extremes of 0.2 and 0.7%. The concentration of macro-elements, expressed as mg/kg, also varied greatly among the various reports in the literature (Table 1) with ranges of 485–1350 for calcium, 216–1205 for phosphorus, 29–118 for magnesium, 75–237 for sodium and 303–990 for potassium. Mare's milk was found to have 61% of calcium, 31% of phosphorus and 16% of magnesium in colloidal form (Davies et al., 1983). Reports on trace elements in mare's milk (Table 2) are limited in number and the reported concentrations are extremely variable.

Bouwman and Van der Schee (1978) reported that ash, calcium and phosphorus content of milk increased from day two to day three of lactation and then decreased to the 28th day of lactation. Calcium content was reported to decline between the 7th and 56th days of lactation (Doreau et al., 1990). Ash content,

TABLE 1
Concentration (mg/kg) of Macro-elements in Mare's Colostrum and Milk

Author	Time after foaling (day)	Ash %	Potassium	Sodium	Calcium	Phosphorus	Magnesium
Doreau <i>et al.</i> (1990)	7 28 56	— — —	— — —	— — —	1350 1180 970	460 420 360	— — —
Holmes <i>et al.</i> (1947)	28 112	— —	790 640	— —	1060 1020	710 630	112 90
Kulisa (1986)	—	0.295	—	—	—	394	29
Linton (1937)	28 112	0.35 0.26	— —	— —	1265 945	1205 865	— —
Oftedal <i>et al.</i> (1983)	—	0.42	—	—	—	—	—
Neseni <i>et al.</i> (1958)	28 112	0.45 0.30	624 303	112 75	847 485	580 467	— —
Schryver <i>et al.</i> (1986)	7 28 105–119	0.61 0.45 0.32	664 469 341	237 161 115	1345 1070 700	943 659 540	118 86 43
Sutton <i>et al.</i> (1977)	1 30	— —	— —	— —	1000 1000–1200	900 500–600	— —
Ullrey <i>et al.</i> (1966)	28 112	0.46 0.27	580 370	186 161	1186 614	358 216	65 43

most macro-elements and some micro-elements were reported to decrease during lactation (Linton, 1937; Schryver *et al.*, 1986).

MATERIALS AND METHODS

Protein and protein fractions, amino acid composition and biological value of milk and milk protein of colostrum and milk produced up to the 45th day of lactation by 16 Hungarian Draught, four Haflinger, six Breton and three Boulonnais mares were determined. The feeding, milking and sampling techniques were described previously (Csapó *et al.*, 1994).

Milk samples, frozen to -25°C , were thawed in water of $+35^{\circ}\text{C}$ and blended. Total protein content and protein fractions of colostrum and milk were measured by the Kjeldahl nitrogen analyser (protein content = $\text{N}\% \times 6.38$). The separation of protein fractions was performed as described by Csapó, (1984). The amino acid composition of milk protein was measured by automatic amino acid analyser

TABLE 2
Concentration (mg/kg) of Micro-elements in Mare's Colostrum and Milk

Author	Time after foaling (day)	Zinc	Iron	Copper	Manganese
Kulisa (1986)	—	0.89	1.46	0.25	—
Lonnerdal <i>et al.</i> (1981)	—	1–2	0.3–1.0	0.2–0.4	—
Schryver <i>et al.</i> (1986)	7 28	3.1 2.2	— —	0.85 0.55	— —
Ullrey <i>et al.</i> (1974)	0 0.5 1 8 35 120	6.4 2.8 3.6 3.3 2.2 2.4	1.31 0.95 1.05 0.88 0.71 0.49	0.99 0.83 0.73 0.44 0.25 0.20	— — — — — —
Underwood (1981)	—	—	—	0.20–0.36	0.05

(type: LKB 4101). Protein was hydrolysed by 6M HCl, sulphur-containing cystine was determined in the form of cysteic acid and the tryptophan content of milk protein was determined by the barium-hydroxide hydrolysis method (Csapó *et al.*, 1986). The biological value of milk protein was calculated by the method of Morup and Olesen (1976) on the basis of amino acid composition.

Ash content was determined by the Hungarian Standard (MSZ-3926/2-76). The macro- and micro-elements, which were present in the ash as metallic oxides, were converted to chlorides by HCl and taken into solution. The metallic contents were determined by a UNICAM SP-191 type atomic absorption spectrophotometer. Phosphorus content was determined using a Spekol photometer by measuring the blue colour created by ammonium molybdenate.

The composition of cow's milk was determined on samples from 32 cows by the same methods as were used for mare's milk. The cows were under summer feeding conditions, based principally on grass. The sample consisted of 17 Holstein-Friesian sired crossbred cows (62.5% Holstein-Friesian, 25% Jersey and 12.5% Hungarian red spotted) which were in second or third lactation and 15 Hungaro-Friesian cows in their first lactation.

RESULTS AND DISCUSSION

The concentration of protein and protein fractions, their changes in mare's colostrum and milk to the 45th day of lactation and the distribution of protein fractions are shown in Table 3. Table 4 shows the free amino acid content of mare's colostrum and milk, while the total amino acid concentrations in mare's

TABLE 3

Means and Standard Deviations of Protein Content and Protein Fractions of Mare's Colostrum and Milk (g/100 g milk), and Distribution of Mare's Milk Protein Fractions as Percentages of Total Protein

Protein fractions	Days post-partum					
	0-0.5		2-5		8-45	
	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.
Total protein	16.41	3.21	4.13	0.77	2.31	0.50
True protein	16.08	2.98	3.86	0.72	2.11	0.48
Whey protein	13.46	2.63	2.11	0.61	1.11	0.32
True whey protein	13.13	2.41	1.84	0.50	0.91	0.25
Casein	2.95	0.34	2.02	0.26	1.20	0.14
NPN $\times$ 6.38	0.34	0.041	0.27	0.015	0.20	0.052
Protein fractions	Days post-partum					
	0-05		2-5		8-45	
Total protein	100		100		100	
True protein	97.96		93.44		91.38	
Whey protein	82.02		51.09		48.05	
True whey protein	79.98		44.53		39.43	
Casein	17.98		48.91		51.95	
NPN $\times$ 6.38	2.04		6.56		8.62	

colostrum and milk, expressed as g/100 g fluid and g/100 g protein, are shown in Table 5. Ash content and concentrations of macro- and micro-elements are shown in Table 6.

There were no significant differences among the four breeds with regard to the protein content of colostrum, transition milk or milk. Breed was found not to influence the distribution of protein fractions, amino acid composition, biological value of colostrum or milk protein or concentrations of ash, macro-elements and micro-elements. The results reported are for 29 individual draught mares.

The total protein content of colostrum immediately after foaling ranged from 13.2 and 22.0% and averaged 16.41%. This value decreased to 4.13% in transitional milk (2nd to 5th days) and to 2.13% in milk (8 to 45 days after foaling). Owing to the fact that the true protein content was calculated by subtraction of NPN from total protein, the changes in true protein coincided with those of total protein. There were similar large changes in whey protein and true whey protein contents over time. These two components, respectively, decreased from 13.5 to 13.1%, measured immediately after foaling, to 2.1 and 1.8% days 2-5 and to 1.1 and 0.9% days 8-45.

Corresponding changes in casein and NPN contents were much smaller. The casein content of colostrum was 2.95% immediately after foaling, 2.02% on days 2-5 and to 1.20% on days 8-45. The NPN content of colostrum was about 20% higher than that of transition milk and 40% higher than that of normal milk.

The distribution of protein fractions, expressed as percentages of total protein (Table 3), changed over time. The true protein content decreased from 97-98%

TABLE 4

Free Amino Acid Content of Mare's Colostrum and Milk

Amino acid	Free amino acid content			
	mg free amino acid/100 g milk colostrum	mg free amino acid/100 g milk	g free amino acid/100 g free AA colostrum	g free AA milk
Aspartic acid	2.90	0.60	4.6	1.9
Threonine	2.90	3.57	4.6	11.5
Serine	5.59	8.97	8.8	28.8
Glutamic acid	9.21	9.92	14.5	31.8
Proline	2.50	1.61	3.9	5.2
Glycine	4.01	1.01	6.3	3.2
Alanine	3.68	0.66	5.8	2.1
Cystine	0.53	0.06	0.8	0.2
Valine	9.21	1.67	14.5	5.4
Methionine	0.39	0.03	0.6	0.1
Isoleucine	1.84	0.16	2.9	0.5
Leucine	3.75	0.35	5.9	1.1
Tyrosine	1.38	0.28	2.2	0.9
Phenylalanine	1.51	0.57	2.4	1.8
Lysine	6.32	0.88	9.9	2.8
Histidine	6.38	0.66	10.0	2.1
Arginine	1.58	0.19	2.5	0.6
Totals	63.68	31.19	100.2	100.0

for colostrum to 91% for milk. Contents of whey protein and true whey protein, respectively, decreased from 80 and 82% to 39 and 48%, while casein and NPN contents, respectively, increased from 18 to 52% and from 2.0 to 8.6% during the 45 days after foaling. Most of the observed changes occurred during the first 24 h after foaling, and the remainder of the changes from colostrum to milk occurred gradually over the first 5 days.

The composition of milk secreted after the 5th day of lactation was almost identical to that of milk on the 45th day of lactation. Very few data have been previously published on colostrum, and these data had much greater standard deviations than we observed. The range of 4.8-25.0% for the protein content of colostrum reported by Linton (1937) and the range of 10.6-25.0% reported by Rouse and Ingram (1970) indicated great differences among individual mares. The smaller range in the present study (13.2-22.0%) was probably due to use of consistent sampling methods. We considered first milked colostrum to be only that sample which was taken immediately after foaling before the foal could suckle. If the foal suckles prior to sampling, the sample will be diluted due to initiated milk secretion and the composition is altered significantly. Precise timing of the first sample is much more important for mares than for cows because the quantity of colostrum is much less than that in the mammary gland of cows; therefore, the dilution after sucking is much greater. The value of 16.41% for the total protein content of first-milked colostrum measured by was 2.5% lower than

TABLE 5

Amino Acid Composition of Mare's Colostrum and Milk, Amino Acid Composition of Colostrum and Milk Proteins and Amino Acid Composition of Cow's Milk and Cow's Milk Proteins

Amino acid	Days post-partum						Cow's milk g AA/100 g milk	Cow's milk protein g AA/100 g protein
	0-0.5	2-5	8-45	0-0.5	2-5	8-45		
	g AA/100 g milk or colostrum			g AA/100 g protein				
Aspartic acid	1.543	0.404	0.246	9.3	9.7	10.4	0.26	7.8
Threonine	1.132	0.235	0.101	6.9	5.7	4.3	0.15	4.5
Serine	1.444	0.306	0.147	8.7	7.4	6.2	0.16	4.8
Glutamic acid	2.281	0.702	0.474	13.8	16.9	20.1	0.77	23.2
Proline	1.346	0.339	0.197	8.1	8.2	8.4	0.32	9.6
Glycine	0.558	0.124	0.045	3.4	3.0	1.9	0.06	1.8
Alanine	0.673	0.157	0.076	4.1	3.8	3.2	0.10	3.0
Cystine	0.164	0.033	0.014	1.0	0.8	0.6	0.02	0.6
Valine	0.853	0.198	0.097	5.2	4.8	4.1	0.16	4.8
Methionine	0.213	0.054	0.035	1.3	1.3	1.5	0.06	1.8
Isoleucine	0.492	0.132	0.090	3.0	3.2	3.8	0.14	4.2
Leucine	1.444	0.388	0.229	8.7	9.3	9.7	0.29	8.7
Tyrosine	0.771	0.182	0.101	4.7	4.4	4.3	0.15	4.5
Phenylalanine	0.738	0.200	0.111	4.5	4.8	4.7	0.16	4.8
Lysine	1.444	0.351	0.189	8.7	8.4	8.0	0.27	8.1
Histidine	0.492	0.116	0.056	3.0	2.8	2.4	0.10	3.0
Arginine	0.706	0.186	0.123	4.3	4.5	5.2	0.11	3.3
Tryptophan	0.229	0.054	0.028	1.4	1.3	1.2	0.05	1.5
Totals	16.523	4.161	2.359	100.1	100.3	100.0	3.33	100.0

that reported by Ullrey *et al.* (1966) and 5–8% higher than that measured by Sutton *et al.* (1977).

There are no previous reports concerning the protein fractions of colostrum. The results reported here for the protein fractions of milk are difficult to compare with data of authors cited earlier because they reported casein contents ranging from 41 to 65% of the total protein while we obtained a value of 49–52%. There are no reports on changes in protein fractions from the colostrum period to 45th day of lactation. Values observed for the NPN content of mare's milk were slightly higher than those discussed earlier.

The free amino acid content (Table 4) of colostrum, with the exception of threonine, serine and glutamic acid, were about twice as high as those of normal milk. When the composition of free amino acids is expressed in percentages, it is clear that colostrum contained approximately five times as much basic (histidine, lysine, arginine) amino acids, and only about 1/3 to 1/2 as much acidic amino acids as normal milk. The concentration of free amino acids in colostrum was 63.68 mg/100 g, which is 19.01% of NPN. These values for milk were 31.19 mg/100 g and 15.67%, respectively. Therefore, approximately 16–20% of the NPN in

TABLE 6

Ash, Macro-elements and Micro-elements of Mare's Milk and Cow's Milk

Analysis	Days post-partum							
	Mare						Cow	
	0-2		3-5		8-45		5-270	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Ash, %	0.592	0.091	0.526	0.019	0.405	0.063	0.753	0.031
Macro-elements (mg/kg)								
Potassium	928	75	709	138	517	65	1204	68
Sodium	320	86	177	44	167	72	504	34
Calcium	748	190	953	86	823	125	1287	143
Phosphorus	742	109	638	121	499	83	996	111
Magnesium	140	81	86	15	66	16	139	12
Micro-elements (mg/kg)								
Zinc	2.95	1.36	2.08	0.50	1.99	0.28	5.63	0.19
Iron	1.00	0.54	1.58	0.90	1.21	0.63	1.07	0.32
Copper	0.61	0.30	0.25	0.12	0.23	0.09	0.30	0.06
Manganese	0.045	0.025	0.053	0.022	0.054	0.029	0.093	0.013

colostrum and milk of mares is in the form of free amino acids. It has been reported (Kulisa, 1986) that mare's milk contains more free serine and glutamic acid than free methionine. The values in Table 3 would indicate that this statement could be expanded to say that the proportions of all other investigated free amino acids were greater than that for methionine. The sulphur-containing amino acids (methionine and cystine) represented much lower proportions of the free amino acids than any of the other amino acids investigated.

The amino acid compositions of colostrum and milk (Table 5) show that changes in amino acid content paralleled those of total protein content relative to time after foaling. It means that each amino acid decreases, without exception, from colostrum to milk (8–45 days). For example, threonine content declined from 1.13 g/100 g colostrum to 0.10 g/100 g milk and the corresponding change for glutamic acid was 2.28–0.47. When the amino acid composition was expressed as g AA/100 g protein, the changes were much less apparent. Threonine decreased from 6.9 to 4.3 g/100 g protein while glutamic acid increased from 13.8 to 20.1 g/100 g protein. The sum of five essential amino acids (threonine, valine, cystine, tyrosine and lysine) decreased from 26.4 to 21.3 g/100 g protein, while the total of two non-essential amino acids (glutamic acid and proline) increased from 21.9 to 28.5 g/100 g protein.

These results seem to contradict data reported by Doreau *et al.* (1990) who reported no change in the amino acid composition of mare's milk protein between the 7th and 56th day of lactation. However, they did not investigate the critical first 5 days after foaling when the largest changes occurred in our investigation. We did not find a publication which reported data on the amino acid composition of colostrum milked immediately after foaling.

Data for the amino acid composition of milk protein, with the exception of the two sulphur-containing amino acids, agree with results of Doreau *et al.* (1990) and Peltonen *et al.* (1980). In the case of some amino acids, our results differed from results reported by Kulisa (1986) and Sarkar *et al.* (1953).

The biological value of milk protein was calculated by the method of Morup and Olesen (1976) based on amino acid composition. The biological value of colostrum milked immediately after foaling (132.3) almost reached the maximum of the method (140), which was due to the very high threonine and lysine contents. During days 2–5, this value decreased to 119.7 due to the reduced quantities of essential amino acids. From the 8th to the 45th day, the biological value of milk protein was 107.9. This is a very high biological value compared to that of cow's milk which was 80.2 based on data in Table 3. These differences can be explained by the higher proportion of whey protein and higher quantities of essential amino acids, especially threonine, in mare's milk. There are no comparable data in the literature.

Ash content of mare's colostrum averaged 0.592% during the first 48 h of lactation with a range of 0.515–0.804% (Table 6). There were no literature values reported prior to day 7 (Table 1). Ash content decreased to 0.513% (range 0.499–0.542%) on days 3–5 and to 0.405% (range 0.301–0.479%) during the period 8–45 days. The latter value is comparable to the mean of literature values in Table 1. The values of 0.61% (Schyyver *et al.*, 1986) would seem to be high while values of 0.30% or lower (Ullrey *et al.*, 1966; Kulisa, 1986; Neseni *et al.*, 1958) would seem to be low.

All macro-elements except calcium decreased in the colostral period and at the beginning of lactation the decrease was most evident for magnesium, but significant decreases were also experienced for potassium and sodium. Phosphorus content showed little change prior to the 5th day of lactation. The calcium content of mare's colostrum was lowest right after foaling (747.7 mg/kg), reached a maximum of 953.7 mg/kg on the 5th day of lactation and then declined. Ullrey *et al.* (1966) observed maximum calcium content on the 8th day after foaling. The concentrations of macro-elements in mare's milk were in good agreement with literature values (Table 1).

Time trends for micro-element concentrations in mare's colostrum and milk showed that zinc and copper decreased continuously, iron decreased after reaching a maximum on the 5th day, manganese increased to the 5th day and then remained constant. Ullrey *et al.* (1974) published data on the micro-elements of mare's colostrum and reported higher zinc, iron and copper contents for colostrum than we observed in this study. Differences were negligible for later periods of the lactation. Comparison of micro-element concentrations in mare's milk (Table 6) with literature data shows that 1.99 mg/kg for zinc content agrees well with about half of the literature data, and is slightly lower than the others. Iron, copper and manganese contents were also in general agreement with values shown in Table 2.

Cow's milk contained almost twice as much ash, potassium, phosphorus, magnesium and manganese, 50% more calcium, iron and copper and almost three times as much sodium and zinc as mare's milk. The low sodium content of mare's milk is a particularly desirable attribute for a dietary component for cardiovascular and hypertension patients.

ACKNOWLEDGEMENT

The financial support of Hungarian Research Fund (OTKA T 12769) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Balbierz, H., Nikolajczuk, M., Poliwoda, A. & Ruda, M. (1975). Study of whey proteins of mares' colostrum and milk during nursing. *Polskie Archiwum Weterynaryjne*, **18**, 455–65.
- Boulot, S. (1987). L' ingestion chez la jument. Etude de quelques facteurs de variation au cours du cycle gestation-lactation. Implications, nutritionnelles et métaboliques. Thèse Doct. Ing., ENSA Rennes, Univ. Rennes I.
- Bouwman, H. & Van der Schee, W. (1978). Composition and production of milk from Dutch warm-blooded saddle horse mares. *Z. Tierphysiol. Tierern. u. Futtermittelk.*, **40**, 39–53.
- Conti, A., Godovac-Zimmerman, J., Liberatori, J. & Braunitzer, G. (1984). The primary structure of monomeric beta-lactoglobulin from horse colostrum. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **365**, 1393–1401.
- Csapó J. (1984). Colostrum and milk composition of several genotypes of cattle. Ph. D. Thesis. PATE, Kaposvár.
- Csapó, J., Stefler, J., Martin, T.G., Makray, S. & Csapó-Kiss, Zs. (1994). Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin contents. *Int. Dairy J.*, **5**, 393–402.
- Csapó, J., Tóth-Pósfai, I. & Csapó-Kiss, Zs. (1986). Optimization of hydrolysis at determination of amino acid content in food and feed products. *Acta Alimentaria*, **15**, 3–21.
- Davies, D.T., Holt, C. & Christie, W.W. (1983). The composition of milk. In *Biochemistry of Lactation*, ed. Mepharm, T. B. Elsevier, Amsterdam, pp. 71–117.
- Deskur, S., Leonhard-Kluz, I., Grochowalski, K. & Rychwalska-Nahlik, M. (1978). Występowanie białek u zębci w czasie rui pozbietnej klaczynki a skład białek serwatkowych mleka. *Rocz. Nauk. Roln.*, **5**, 115–27.
- Doreau, M., Bruhat, J.P. & Martin-Rosset, W. (1988). Effects du niveau des apports azotés chez la jument en début de lactation. *Ann. Zootechn.*, **37**, 21–30.
- Doreau, M., Boulot, S., Barlet, J.P. & Patureau-Mirand, P. (1990). Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences. *J. Dairy Res.*, **57**, 449–54.
- Duisembaev, H.I. (1973). Mare milk proteins. *Trudy Alama-Atinskogo Zooveterinarnogo Instituta*, **23**, 76–80.
- Duisembaev, K.I. & Akimbekov, B.R. (1982). Variation of milk yield and its relationship with milk composition of mares at a koumiss farm. Sborn. Nauch. Trudov. Kazakh. Nauch. Issled. Tekhnol. Inst. Ovtsev, 95–100. (in Russian), *Dairy Sci. Abstr.*, **46**, 652.
- Gibbs, P.D., Potter, G.D., Blake, R.W. & McMullan, W.C. (1982). Milk production of quarter horse mares during 150 days of lactation. *J. Anim. Sci.*, **54**, 496–99.
- Holmes, A.D., Spelman, A.F., Smith, C.T. & Hoznesk, J.W. (1947). Composition of mare's milk as compared with other species. *J. Dairy Sci.*, **30**, 385–95.
- Intrieri, F. & Minieri, L. (1970). Sul contenuto in acidi grassi della quota lipidica del colostro e del latte di cavalla. Indagini su soggetti di razza avelignese. *Acta Med. Vet. Napoli*, **16**, 89–98.
- Johnston, R.H., Kamstra, L.D. & Kohler, P.H. (1970). Mare's milk composition as related to foal heat scours. *J. Anim. Sci.*, **31**, 549–53.

- Kulisa, M. (1977). The composition of mare's milk in three horse breeds with reference to N-acetylneuraminic acid. *Acta Agrar. Silv. Ser. Zootech.*, **27**, 25–37.
- Kulisa, M. (1986). Selected amino acids, fatty acids and N-acetylneuraminic acid in mare milk. *Proc. 37th Annu. Meet. EAAP*, (Budapest), pp. 442.
- Linton, R.G. (1937). The composition of mare's milk. *J. Dairy Sci.*, **8**, 143–72.
- Lonnerdal, B., Keen, C.L. & Hurley, L.S. (1981). Iron, copper, zinc and manganese in milk. *Rev. Nutr.*, **1**, 149–74.
- Lukas, V.H., Albert, W.W., Owens, F.N. & Peters, A. (1972). Lactation of Shetland mares. *J. Anim. Sci.*, **34**, 350.
- McGuire, T.C., Crawford, T.B. and Henson, J.B. (1972). The isolation, characterization and functional properties of equine immunoglobulin classes and subclasses. 3rd Intern. Conf. *Equine Infectious Diseases*, pp. 364–81.
- McGuire, T.C., Poppie, M.J. & Banks, K.L. (1975). Hypogammaglobulinemia predisposing to infection in foals. *JAVMA*, **166**, 71–5.
- Minieri, L. & Intrieri, F. (1970). Ricerche elettroforetiche sulle frazioni proteiche del colostro e del latte di cavalle di razza avelignese, in rapporto alla distanza dal parto. *Acta Med. Vet. Napoli*, **16**, 73–88.
- Miraglia, N., Quintavalla, F., Mariani, P. & Catalano, A.L. (1986). Plasmabiochemistry changes in mares and foals in relation to nutritional aspects. Preliminary trials. *Proc. 37th Annu. Meet. EAAP*, (Budapest), p. 11.
- Morup, H. & Olesen, E.S. (1976). New method for prediction of protein value from essential amino acid pattern. *Nutr Reports Internal*, **13**, 355–65.
- Neseni, R., Flade, E., Heidler, G. & Steger, H. (1958). The yield and composition of mare's milk throughout lactation. *Archiv für Tierzucht*, **1**, 91–129.
- Oftedal, O.T., Hintz, H.F. & Schryver, H.F. (1983). Lactation in the horse: milk composition and feed intake by foals. *J. Nutr.*, **113**, 2196–2206.
- Peltonen, T., Kossila, V. & Huida, L. (1980). Effect of protein supplementation on milk composition of the mare and growth rate of their foals. *Proc. 31st Annu. Meet. EAAP*, (München), p. 6.
- Rémond, B. (1985). Influence de l'alimentation sur la composition du lait de vache. 2. Taux protéique: facteurs généraux. *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA*, **62**, 53–67.
- Rouse, B.T. & Ingram, D.G. (1970). The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. *Immunology*, **19**, 901–7.
- Sarkar, B.C.R., Rykala, A.J. & Duncan, C.W. (1953). The essential amino acid content of the proteins isolated from milk of the cow, ewe, sow, and mare. *J. Dairy Sci.*, **36**, 859–64.
- Schryver, H.F., Oftedal, O.T., Williams, J., Soderholm, I.V. & Kintz, H.F. (1986). Lactation in the horse: the mineral composition of mare milk. *J. Nutr.*, **116**, 2142–47.
- Senft, B. & Meyer, F. (1980). Changes in the concentration of protein fraction in the blood and milk of mares and in the blood of their foals. *Proc. 31st Annu. Meet. EAAP*, (München), p. 6.
- Smoczynsky, S. & Tomczynski, R. (1982). A study of chemical composition of mare milk. I. Chemical composition of mare milk in first ten days of lactation. *Zesz. Nauk. Akad. Rol. Tech. Olszt.*, **17**, 77–83.
- Storch, G. (1985). Untersuchungen über einige Inhaltsstoffe und Eigenschaften von Stutenmilch und Kumys unter besonderer Berücksichtigung diätetischer Fragestellungen. Thesis Univ. Giessen, *Dairy Sci. Abstr.*, **48**, 873.
- Sutton, E.I., Bowland, J.P. & Ratcliff, W.D. (1977). Influence of level of energy and nutrient intake by mares on reproductive performances and blood serum composition of the mares and foals. *Can. J. Anim. Sci.*, **57**, 551–8.
- Ullrey, D.E., Sruther, R.D., Hendricks, D.G. & Brent, B.E. (1966). Composition of mare's milk. *J. Anim. Sci.*, **25**, 217–222.

- Ullrey, D.E., Ely, W.T. & Covert, R.L. (1974). Iron, zinc and copper in mare's milk. *J. Anim. Sci.*, **38**, 1276–7.
- Urbinisov, Zh. K., Servetnik-Chalaya, G.K. & Izatullaev, E.A. (1981). Protein content of mare's milk. *Molochnaya Promyshlennost*, **2**, 45.
- Ustinova, V., Kazantseva, A., Baturina, R. & Dementeva, T. (1983). Siberian koumiss. *Konevodstvo Konnyi Sport*, **4**, 17.

Influence of Mastitis on D-Amino Acid Content of Milk

JÁNOS CSAPÓ,¹ ZSUZSANNA CSAPÓ-KISS, and JÓZSEF STEFLER
Pannon Agricultural University Faculty of Animal Science
H-7401 Kaposvár
Dénesmajor 2, Hungary

TRUMAN G. MARTIN
Department of Animal Science
Purdue University
West Lafayette, IN

SÁNDOR NÉMETHY
Department of Marine Geology
University of Göteborg
Göteborg, Sweden

ABSTRACT

The California Mastitis Test was used as an indicator of mastitis in this study. Five cows were chosen for each of the five test scores (from 0 = healthy to 4 = severe mastitis). Milk samples were analyzed for free AA and free D-AA. The contents of free AA, free D-AA, and the ratio of free D-AA to free AA increased significantly as the California Mastitis Test score increased. The free D-AA content of foremilk (first milk jets) from healthy cows (test score = 0) was approximately five times that in samples drawn later from the same udders. Contents of free AA and free D-AA were highly associated with test score and udder inflammation. Very low concentrations of free D-AA are normal for raw milk. Higher concentrations of free D-AA could be attributed to inclusion of foremilk and milk from cows having subclinical mastitis in the bulk tank milk.

(**Key words:** free amino acids, D-amino acids, mastitis, milk)

Abbreviation key: CMT = California Mastitis Test.

INTRODUCTION

Recently research has shown that foods contain considerable quantities of D-AA (1, 4,

9, 10, 13, 15, 18, 19) that are attributed to both processing technology and microbiological status of the foods. Milk and milk products reportedly (2, 3, 11, 20) contain significant amounts of D-AA, which are generally attributed to biological status rather than to processing technology. The pertinent literature does not explain the presence of D-AA in the raw milk of healthy cows.

The presence of D-AA in food products decreased digestibility of protein (4, 9, 13, 18) and bioavailability of essential AA. Some D-AA may provide the basis for the formation of toxic products (9, 18). Absorption rates of L-AA in the intestine were reportedly greater than absorption rates of respective D-enantiomers (7). Milk products produced by bacterial fermentation contained D-AA (18), and bacteria were implicated as a biological source of D-AA.

Because D-AA are often products of bacterial metabolism, and mastitis is an inflammation of the udder caused by bacteria, we investigated the influence of mastitis as a possible explanation for the D-AA content of raw milk. Cows produce leukocytes to counteract infection, and, in early studies, direct microscopic counts of leukocytes were used to measure the severity of mastitis. Schalm and Noorlander (21) utilized a chemical reaction test for mastitis that could be read in one of five classes (0 = healthy to 4 = severe mastitis) and was highly correlated with leukocyte count (17, 22). The California Mastitis Test (CMT) has been used in many studies. Electronic procedures have been used to count cells, and the SCC has also served as the measure of mastitis.

2376

CSAPÓ ET AL.

Harmon (12) stated that the primary factor influencing SCC testing or CMT is IMI from bacteria. He also reported that cows with mastitis, as indicated by high SCC, produced milk that differed in composition from milk produced by cows with healthy udders. High SCC was associated with reduced casein and increased concentrations of whey protein, albumin, and immunoglobulin (12). Another study (5) reported changes in mineral contents. Mastitic milk contained more sodium, chloride, calcium, iron, and manganese; normal milk was higher in potassium, phosphorus, zinc, and copper. The protein and mineral contents of mastitic milk were similar to those of colostrum. In related studies (8, 17), the foremilk from healthy cows was reported to have higher SCC or higher CMT scores than milk drawn later in the milking process.

The objectives of this research were 1) to determine the concentrations of free AA and free D-AA in milk from cows having different CMT scores and 2) to compare the D-AA contents of foremilk and milk drawn later from cows having a negative CMT.

MATERIALS AND METHODS

Assignment of Cows and Sampling Milk

The CMT, as described previously (14), was used for a herd of 1020 Holstein cows. Twenty-five individual cows were identified as having the same CMT score for all four udder quarters. Five cows were placed in each of the five groups, based on their CMT score of 0, 1, 2, 3, or 4. The California Mastitis Test reaction (21) is the disintegration of leukocytes when milk is mixed with the reagent (NaOH and an anionic surface active agent). In a negative sample (0 score), the mixture of milk and reagent remains liquid and produces no precipitate. As the score increases, the degree of precipitation increases, and, when the CMT score reaches 4, a distinct gel with central peak is formed. The CMT score is based on the number of leukocytes in milk, and mean SCC for scores 0, 1, 2, 3, and 4 were 67, 118, 401, 1737, and 6964×10^3 per ml, respectively (17).

At the time of sampling, the amount of milk needed to conduct a CMT on each quarter was drawn from each cow. For cows with a negative score (0), a well-mixed, complete milk sample from the udder was drawn, and the

remainder went to the bulk tank. For positive cows (CMT score of 1, 2, 3, or 4), a volume of 1 L was manually milked, mixed, and sampled; the remaining milk was milked from the udder but then discarded.

The comparison of D-AA contents of foremilk and later milk required the selection of 5 cows, each of which had a negative CMT score for all quarters. The foremilk sample consisted of two hand-milked jets from each of the four quarters of the udder. The udder was then milked completely, and a sample was drawn from the well-mixed remainder.

All milk samples for both experiments were cooled immediately in ice water and, within 2 h, were placed in a deep freeze at -25°C . The samples were stored at -25°C until preparations for AA analysis were initiated.

Preparation of Milk Samples for Analysis

After milk samples were defrosted and heated to 30°C , they were centrifuged at $5000 \times g$ at room temperature for 20 min to skim the milk and deposit particulate matter at the bottom of the centrifuge tube. To 50 ml of sample, 50 ml of a 25% trichloroacetic acid solution were added, and the mixture was allowed to stand for 20 min. The resulting precipitate was centrifuged at room temperature for 30 min at $10,000 \times g$. To determine total AA, pH of the supernatant was adjusted to 2.2 with 4 M sodium hydroxide. To conduct D-AA determinations, the pH was adjusted to 7. Using a 10°C hot plate, the solutions were lyophilized. For total AA determinations, the resulting solid material was dissolved in 10 ml of citrate buffer at pH 2.2, and, for determinations of D-AA, dissolution was in 1 ml of twice-distilled water. Prepared samples were stored at -25°C until analysis.

HPLC and Ion-Exchange Column Chromatography for the Determination of D-AA and Total Free AA

Instruments. The chromatographic system was assembled from ISCO 100 DM syringe pumps (Isco Inc., Lincoln, NE) and a Rheodyne injector (Berkeley, CA) equipped with a 20- μl loop. The separation process was monitored, and chromatograms were stored on an ISCO Chem Research System (Isco Inc.). The derivative formation and sample injection were performed manually. The excitation and obser-

Received December 28, 1994.

Accepted May 26, 1995.

¹To whom correspondence should be addressed.

MASTITIS EFFECT ON D-AMINO ACIDS OF MILK

2377

variation wavelengths were 325 and 420 nm, respectively.

Reagents. Acetonitrile and methanol were purchased from Rathburn Ltd. (Walkeburn, England). The AA standards, the *o*-phthalaldehyde, and the 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside were obtained from Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO). The buffers used for elution were prepared from mono- and disodium phosphate. The pH was adjusted with 4 *M* sodium hydroxide.

Synthesis of Derivatives. The reaction was carried out in a 120- μ l microvial, which was placed in another vial (vol, 1.8 ml) that had Teflon[®] coating, internal cover plate, and a screw cap. The sample (free AA or protein hydrolysate evaporated in a nitrogen atmosphere), dissolved in 90 μ l of borate buffer (.4 *M*; pH 9.5), was mixed with 15 μ l of reagent (8 mg of *o*-phthalaldehyde and 44 mg of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside dissolved in 1 ml of methanol). The mixture was then homogenized by bubbling through approximately 100 μ l of nitrogen and left standing for 6 min. Then, 25 μ l of the reaction mixture were injected into the analyti-

TABLE 1. The elution gradient, as a function of time, for the two components used to separate and quantitate the enantiomers.

Time (min)	A ¹	B ²
	(%)	
0	95	5
10	95	5
35	83	17
55	72	28
56	67	33
74	67	33
75	62	38

¹40% Methanol in phosphate buffer (9.5 mM; pH 7.05).

²Acetonitrile.

cal column. After injection, the system was rinsed three times with approximately 100 μ l of a 70:30 (vol/vol) acetone:water solution. Synthesis of derivatives was performed manually, and the mixture of reagent solution was performed with the aid of an IKA Vibro Fix instrument (IKA-WERK, Breisgau, Germany).

Separation and Quantitation of the Enantiomers. The enantiomers were separated ac-

TABLE 2. Mean free AA (D- and L-) contents of milk from cows with various California Mastitis Test (CMT) scores.

AA	CMT Score ¹					SEM
	0	1	2	3	4	
(mg/100 ml)						
Asp	.12 ^d	.89 ^c	1.13 ^b	1.38 ^a	1.45 ^a	.021
Thr	.12 ^b	.16 ^b	.18 ^{ab}	.20 ^{ab}	.24 ^a	.010
Ser	.23 ^b	.27 ^b	.31 ^b	.49 ^a	.52 ^a	.014
Glu	.96 ^d	2.53 ^c	3.19 ^b	4.63 ^a	4.71 ^a	.043
Pro	.05 ^d	.09 ^d	.42 ^c	.78 ^b	.89 ^a	.016
Gly	.04 ^c	.06 ^{bc}	.09 ^b	.19 ^a	.22 ^a	.006
Ala	.34 ^d	2.18 ^c	3.42 ^b	4.88 ^a	4.92 ^a	.113
Cys	.11 ^c	.17 ^b	.19 ^b	.26 ^a	.27 ^a	.009
Val	.67 ^b	.71 ^b	.74 ^b	.81 ^{ab}	.92 ^a	.025
Met	.01 ^b	.01 ^b	.02 ^{ab}	.03 ^a	.03 ^a	.002
Ile	.03 ^d	.29 ^c	.35 ^b	.42 ^a	.44 ^a	.010
Leu	.04 ^d	.21 ^c	.38 ^b	.69 ^a	.66 ^a	.014
Tyr	.09 ^c	.11 ^{bc}	.14 ^{ab}	.17 ^a	.18 ^a	.007
Phe	.10 ^d	.13 ^{cd}	.17 ^{bc}	.21 ^{ab}	.23 ^a	.008
Lys	.28 ^d	.49 ^c	.83 ^b	1.14 ^a	1.14 ^a	.017
His	.12 ^b	.25 ^b	.68 ^a	.71 ^a	.89 ^a	.061
Arg	.09 ^d	.19 ^c	.38 ^b	.57 ^a	.62 ^a	.013
Total (sum)	3.40 ^e	8.73 ^d	12.62 ^c	17.56 ^b	18.32 ^a	.097

^{a,b,c,d,e}Means in the same row and having no superscripts in common differ ($P \leq .01$).

¹Five cows were in each group: 0 = no precipitate; 1 = slight precipitate, which disappears; 2 = distinct precipitate, but no gel formation; 3 = mixture thickens with some suggestion of gel formation; and 4 = distinct gel with central peak.

2378

CSAPÓ ET AL.

cording to the method of Einarsson et al. (6), using a reversed-phase analytical column packed with Kromasil octyl C8 (250 $\times$ 5.6 mm i.d.; 5- μ m particle size; EKA Nobel AB, Bohus, Sweden). To increase the lifetime of the column, a safety column was fitted between the sample injector and the analytical column (RP8, Newguard; 25 $\times$ 3.2 mm i.d., 7- μ m particle size; EKA Nobel AB). A cleaning column (C18, Rsil; 36 $\times$ 4.5 mm i.d., 20- μ m particle size; EKA Nobel AB) was installed between the pump and the sample injector. To separate the enantiomers, the two-component gradient system was 40% methanol in phosphate buffer (9.5 mM; pH 7.05), and acetoneitrile. The flow rate was 1 ml/min, and the elution of the gradient as a function of time is shown in Table 1.

Free AA

Determination of total free AA was performed with an LKB Model 4101 automatic AA analyzer, following postcolumn derivative synthesis with ninhydrin.

RESULTS AND DISCUSSION

Concentrations of total (D- and L-) free AA are shown in Table 2 for the five CMT scores. Based on analysis of variance and comparison of paired means, differences among the five CMT score groups were significant ($P \leq .01$) for each of the 17 AA. Variation among cows within CMT class was very small, as indicated by the small standard errors of means shown in Table 2. The milk samples with CMT scores of 2, 3, or 4 had free AA composition similar to that of colostrum. This tendency has also been reported (5, 12) for protein components and minerals. Compared with concentrations of normal milk, the most spectacular increases were seen for Ile, Ala, Asp, Pro, and Leu, which were more than 10 times the concentrations observed in milk samples scored with a 0 CMT score.

The nature of differences among CMT classes was investigated by regression analysis. Table 3 shows the significant ($P \leq .01$) linear contrasts for each of the 17 free AA and for the sum. The concentration of free AA in-

TABLE 3. Regression of free amino acid content on California Mastitis Test score: the significance of linear (L), quadratic (Q), and cubic (C) orthogonal contrasts and the proportion of variance associated with regression.

AA	F Values ¹			R ²		
	L	Q	C	L	L, Q	L, Q, and C
Asp	2149**	306**	27**	.85	.97	.99
Thr	81**	0	1	.80	.80	.81
Ser	318**	7*	14**	.87	.88	.92
Glu	4995**	186**	11**	.94	.98	.98
Pro	2171**	7*	113**	.94	.94	.99
Gly	787**	18**	22**	.90	.92	.96
Ala	1101**	63*	5*	.92	.97	.98
Cys	221**	2	1	.87	.88	.89
Val	55**	4	1	.70	.74	.75
Met	80**	0	0	.84	.84	.84
Ile	903**	171**	26**	.80	.95	.98
Leu	1493**	23**	63**	.92	.93	.97
Tyr	274**	1	2	.84	.85	.86
Phe	171**	2	2	.87	.88	.89
Lys	1972**	51**	66**	.92	.94	.97
His	107**	4	1	.91	.94	.95
Arg	1321**	5*	32**	.96	.96	.99
Total (sum)	15,921**	503**	76**	.96	.99	.99

¹F Values (1.20 df).

* $P \leq .05$.

** $P \leq .01$.

MASTITIS EFFECT ON D-AMINO ACIDS OF MILK

2379

TABLE 4. Mean free D-AA contents of milk from cows with various California Mastitis Test (CMT) scores.

D-AA (mg/100 ml)	CMT Score ¹					SEM
	0	1	2	3	4	
D-Asp	.02 ^d	.17 ^c	.23 ^b	.32 ^a	.32 ^a	.008
D-Ser	0 ^c	0 ^c	.02 ^b	.04 ^a	.04 ^a	.003
D-Glu	.05 ^c	.08 ^c	.99 ^b	1.48 ^a	1.53 ^a	.027
D-Pro	0 ^c	0 ^c	.04 ^b	.09 ^a	.10 ^a	.005
D-Ala	.04 ^c	.05 ^b	1.13 ^b	2.32 ^a	2.41 ^a	.020
D-Val	0 ^b	.08 ^{ab}	.09 ^{ab}	.09 ^{ab}	.12 ^a	.017
D-allo-Ile	0 ^d	.08 ^c	.10 ^{bc}	.12 ^{ab}	.15 ^a	.006
D-Leu	0 ^d	.06 ^c	.12 ^b	.17 ^a	.17 ^a	.008
D-Lys	0 ^d	.11 ^c	.27 ^b	.36 ^a	.37 ^a	.012
Total (sum)	.11 ^c	.63 ^d	2.99 ^c	4.99 ^b	5.21 ^a	.018

a,b,c,d,e Means in the same row and having no superscripts in common differ ($P \leq .01$).¹Five cows were in each group: 0 = no precipitate; 1 = slight precipitate, which disappears; 2 = distinct precipitate, but no gel formation; 3 = mixture thickens with some suggestion of gel formation; and 4 = distinct gel with central peak.

creased linearly for CMT scores 0 to 3. The differences between CMT scores of 3 and 4 were significant only for Pro and for the sum of all AA. This result tended to cause the quadratic contrast to account for more variation than the cubic contrast. Based on free AA contents, the CMT classifications could be reduced to four: 0 to 3.

A quadratic function of CMT score explained 99% of the variation in the sum of free AA and 97% of the variation in contents of Asp, Glu, and Ala. Conversely, the free AA content could be used as an indicator of severity of mastitis.

Free D-AA

Concentrations of free D-AA are shown in Table 4. Milk samples rated with a negative score (CMT score of 0) contained free D-Asp, D-Glu, and D-Ala. However, the quantities present (.02, .05, and .04 mg/100 ml, respectively) were almost negligible compared with the quantities occurring in the milk samples that had CMT score of 2, 3, or 4. For samples scored 1, D-Val, D-allo-Ile, D-Leu, and D-Lys were also present. D-Serine and D-Pro were identified in samples scored 2, 3, or 4. Not even traces could be identified of the D-enantiomers of other AA, which are the building blocks of proteins.

TABLE 5. Regression of free D-AA content on California Mastitis Test score: the significance of linear (L), quadratic (Q), and cubic (C) orthogonal contrasts and the proportion of variance associated with regression.

D-AA	F Values ¹			R ²		
	L	Q	C	L	L, Q	L, Q, and C
D-Asp	692**	72**	0	.87	.96	.96
D-Ser	148**	0	20**	.80	.80	.99
D-Glu	5261**	13**	243**	.89	.90	.98
D-Pro	638**	3	28**	.86	.87	.94
D-Ala	25,775**	14**	1246**	.91	.91	.99
D-Val	216**	33**	34**	.71	.82	.94
D-allo-Ile	333**	17**	13**	.87	.91	.95
D-Leu	295**	17**	3	.88	.93	.94
D-Lys	5195**	33**	12**	.91	.95	.97
Total (sum)	9047**	27**	572**	.94	.94	.99

¹F Values (1.20 df).** $P \leq .01$.

2380

CSAPÓ ET AL.

TABLE 6. Free D-AA concentration as a percentage of free (D- and L-) AA content of milk from cows with various California Mastitis Test (CMT) scores.

D-AA	CMT Score ¹					SEM
	0	1	2	3	4	
D-Asp	17.0 ^c	19.0 ^{bc}	20.7 ^{ab}	23.3 ^a	21.9 ^{ab}	.92
D-Ser	0 ^b	0 ^b	6.6 ^a	8.6 ^a	7.7 ^a	.74
D-Glu	5.6 ^a	3.0 ^b	31.1 ^a	31.9 ^a	32.5 ^a	.79
D-Pro	0 ^c	0 ^c	8.4 ^b	11.8 ^a	11.1 ^a	.89
D-Ala	12.9 ^c	2.2 ^d	33.1 ^b	47.6 ^a	49.1 ^a	1.03
D-Val	0 ^b	11.0 ^a	12.5 ^a	11.0 ^a	13.0 ^a	.79
D-allo-Ile	0 ^c	27.6 ^b	27.6 ^b	29.3 ^b	34.7 ^a	1.61
D-Leu	0 ^b	29.1 ^a	31.7 ^a	24.4 ^a	25.8 ^a	1.91
D-Lys	0 ^c	22.0 ^b	32.6 ^a	32.0 ^a	32.8 ^a	1.81
Total (sum)	3.4 ^d	7.0 ^c	23.7 ^b	28.4 ^a	28.4 ^a	.40

a,b,c,d Means in the same row and having no superscripts in common differ ($P \leq .05$).¹Five cows were in each group: 0 = no precipitate; 1 = slight precipitate, which disappears; 2 = distinct precipitate, but no gel formation; 3 = mixture thickens with some suggestion of gel formation; and 4 = distinct gel with central peak.

Free D-AA increased as CMT score increased for all nine free D-AA and for the sum of free D-AA. The nature of the regression pattern (Table 5) was slightly different; the cubic contrast was relatively more important than the quadratic contrast. The CMT scores of 3 and 4 had similar free D-AA concentrations, as was observed previously. However, differences in free D-AA contents of samples scored 0 or 1 also tended to be small. Therefore, the graphic expression of free D-AA content relative to CMT score tended to be sigmoid in shape. Thus, CMT score can be used as an accurate predictor of concentration of free D-AA, but the prediction equation would be a cubic function: $\hat{y} = a + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$.

The increase in free D-AA could be easily attributed to the availability of larger amounts of free AA for conversion to D-AA. However, the concentration of free D-AA relative to free (D- and L-) AA increased as the CMT score increased (Table 6). Free D-Ala represented almost 50% of the total free Ala when CMT score was 3 or 4. Conversely, the increase in percentage D-Asp (17 to 23%) was small. For the sums of all AA, the percentage of D-AA was only 3% for samples scored 0 compared with 28% for those scored 3 or 4 by CMT. Both absolute quantity and percentage of D-AA (relative to total free) increased as the CMT score increased.

TABLE 7. Free D-AA content of foremilk and mixed total milk from five cows having negative (zero) California Mastitis Test scores.

D-AA (mg/100 ml)	Milk sample		Difference ¹	Confidence limits ²	
	Foremilk	Milk		LL	UL
D-Asp	.132	.021	.111**	.086	.136
D-Glu	.214	.053	.161**	.124	.198
D-Ala	.203	.043	.160**	.111	.209
D-allo-Ile	.061	0	.061**	.045	.077
Total (sum)	.610	.117	.493**	.443	.543

¹Difference (foremilk - milk) calculated for each cow and averaged ($\bar{D}$).²Lower (LL) and upper (UL) 99% confidence limits for mean difference ($\bar{D}$) = $\bar{D} \pm t$ (standard error of the difference) with $t = 5$ df, $\alpha = .01$, and standard error of the difference = $\sqrt{s_D^2/5}$.** $P \leq .01$.

MASTITIS EFFECT ON D-AMINO ACIDS OF MILK

2381

Free D-AA Content of Foremilk

Foremilk has a higher CMT score and higher SCC (8, 17, 22) than does milk drawn later in the milking process. The D-AA concentrations of foremilk and later milk from cows having a CMT score of 0 are shown in Table 7. For this experiment, the foremilk was two jets of milk drawn from each quarter at the beginning of milking. Free D-AA contents of foremilk were approximately five times those of milk drawn later ($P \leq .01$). Negative (CMT score of 0) samples had extremely low concentrations of free D-AA in later milk. The free D-AA contents of foremilk from cows with milk that scored 0 was typical of the concentrations reported for milk from cows with milk that scored 1 (Table 4).

CONCLUSIONS

Based on the results, we concluded that very low concentrations of D-AA are normal for raw milk. Higher D-AA can be traced to inclusion of the bacteria-rich foremilk and milk from cows with subclinical mastitis in the bulk tank. Data presented here would support the hypothesis that D-AA content of raw milk is associated with mastitis and, consequently, with bacterial activity in the udder.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support of the Hungarian National Research Fund through Grants OTKA T 12769 and OTKA T 14916.

REFERENCES

- Boehm, M. F., and J. L. Bada. 1984. Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100°C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 5263.
- Brückner, H., and M. Hausch. 1990. D-Amino acids in dairy products: detection, origin and nutritional aspects. I. Milk, fermented milk, fresh cheese and acid crude cheese. *Milchwissenschaft* 45:357.
- Brückner, H., and M. Hausch. 1990. D-Amino acids in dairy products: detection, origin and nutritional aspects. II. Ripened cheeses. *Milchwissenschaft* 45: 421.
- Bunjamai, S., R. R. Mahoney, and I. S. Fagerson. 1982. Determination of D-amino acids in some processed foods and effect of racemization on in vitro digestibility of casein. *J. Food Sci.* 47:1229.
- Csapó, J., Z. Csapó-Kiss, J. Máté, and I. Juriskay. 1986. Kísérletek a masztitiszes tej részarányának meghatározására elegytejékből. (Experiments for determination of the proportion of mastitis milk in the bulk.) *Állattenyészt. Takarmányozás* 35:337.
- Einarsson, S., S. Folestad, and B. Josefsson. 1987. Separation of amino acid enantiomers using precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside. *J. Liquid Chromatogr.* 10:1589.
- Finch, L. R., and F.S.R. Hird. 1960. The uptake of amino acids by isolated segments of rat intestine. 2. A survey of affinity for uptake and competition for uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 43:278.
- Forster, T. L., U. S. Ashworth, and L. O. Luedeker. 1967. Relationship between California mastitis test reaction and production and composition of milk from opposite quarters. *J. Dairy Sci.* 50:675.
- Friedman, M., J. C. Zahnley, and P. M. Masters. 1981. Relationship between in vitro digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D-amino acids. *J. Food Sci.* 46:127.
- Fuse, M., F. Hayase, and H. Kato. 1984. Digestibility of proteins and racemization of amino acid residues in roasted foods. *J. Jpn. Soc. Food Nutr.* 37:348.
- Gandolfi, I., G. Palla, L. Delprato, F. DeNisco, R. Marchelli, and C. Salvadori. 1992. D-amino acids in milk as related to heat treatments and bacterial activity. *J. Food Sci.* 57:377.
- Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77:2103.
- Hayashi, R., and I. Kameda. 1980. Decreased proteolysis of alkali treated proteins: consequences of racemization in food processing. *J. Food Sci.* 45:1430.
- Hungarian Standardisation Bureau. Nyers tehén és juhtej vizsgálata masztitiszt próbával. (Testing of cow's and ewe's milk with mastitis test.) Standard No. 12320-85. Hungarian Standardisation Bureau, Budapest, Hungary.
- Liardon, R., and S. Lederman. 1986. Racemization kinetics of free and protein-bound amino acids under moderate alkaline treatment. *J. Agric. Food Chem.* 34: 557.
- Reference deleted in proof.
- Luedeker, L. O., T. L. Forster, and U. S. Ashworth. 1967. Relationship between California Mastitis Test reaction and leucocyte count, catalase activity and A-esterase activity of milk from opposite quarters. *J. Dairy Sci.* 50:1592.
- Man, H., and J. L. Bada. 1987. Dietary D-amino acids. *Annu. Rev. Nutr.* 7:209.
- Masters, P. E., and M. Friedman. 1980. Amino acid racemization in alkali treated food proteins—chemistry, toxicology, and nutritional consequences. Page 165 in *Chemical Deterioration of Proteins*. ACS Symp. Ser. 123:165. J. R. Whitaker and M. Fujimaki, ed. Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- Palla, G., R. Marchelli, A. Dossena, and G. Casnati. 1989. Occurrence of D-amino acids in food. Detection by capillary gas chromatography and by reversed-phase high-performance liquid chromatography with L-phenylalaninamides as chiral selectors. *J. Chromatogr.* 475:45.
- Schalm, O. W., and D. O. Noorlander. 1957. Experiments and observations leading to the development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130:199.
- Smith, J. W., and W. D. Schultze. 1965. Preliminary evaluation of the California Mastitis Test as a method of estimating the inflammatory condition of individual quarters. *J. Dairy Sci.* 48(Suppl. 1):820.(Abstr.)



Int. Dairy Journal 6 (1996) 881-902
Copyright © 1996 Published by Elsevier Science Limited
Printed in Ireland. All rights reserved
P 11:0958-6946(95)00072-0 0958-6946/96/\$15.00 + 0.00

Protein, Fats, Vitamin and Mineral Concentrations in Porcine Colostrum and Milk from Parturition to 60 Days

J. Csapó,^a T. G. Martin,^b Z.S. Csapó-Kiss^a & Z. Házás^a

^aPANNON Agricultural University, Faculty of Animal Science, Kaposvár H-7401, Dénesmajor 2, Hungary

^bDepartment of Animal Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA

(Received 17 October 1994; accepted 20 November 1995)

ABSTRACT

The concentrations of protein, protein fractions, amino acids, total solids, fat, fatty acids, fat soluble vitamins (A, D₃, E, K₃), vitamin C, macro- and micro-elements and biological value of colostrum and milk of 10 Danish Large White, 10 Danish Duroc and 10 Norwegian Landrace sows were determined. The total protein content of the first colostrum (16.65%) was approximately three times the level in milk at the end of lactation (5.83%). All protein fractions decreased during lactation, with the exception of casein, which reached its maximum between 24–72 h of lactation with a value of 3.4–3.6%, and non-protein nitrogen, which increased from the beginning (0.41%) to the end of lactation (0.47%). Significant differences were observed between the free amino acid content of colostrum and milk. Colostrum contained less acidic and hydroxy, and more basic amino acids than milk. The concentrations of amino acids in colostrum and milk, similar to the change in total protein, decreased during lactation. However, when amino acid concentrations were expressed as g AA 100 g⁻¹ protein, most of the essential amino acids (threonine, cystine, valine) decreased, while the non-essential glutamic acid and proline increased. This explains why the biological value of colostrum protein was approximately 11% higher during the first 5 days of lactation (118–129) than that of milk protein on the 10–60th days of lactation.

The first colostrum contained 24.03% total solids and 5.32% fat; these increased to 27 and 13.1%, respectively, at 48–72 h, but decreased afterwards to 18.7 and 6.5%, respectively, at the end of lactation. The fat of sow's milk contained only very low concentrations (in fact just above the limit of identification) of saturated fatty acids with 4–12 C. Sow's milk contained significantly more unsaturated fatty acids than cow's milk; particularly large differences were found in the case of linolenic acid. Sow's milk contained more ash (0.843%), calcium (1965 mg kg⁻¹), phosphorus (1510 mg kg⁻¹), zinc (6.49 mg kg⁻¹), iron (2.44 mg kg⁻¹) and copper (1.34 mg kg⁻¹), and less potassium (748 mg kg⁻¹).

sodium (387 mg kg^{-1}) and magnesium (111 mg kg^{-1}) than cow's milk, while there were no differences between the two species in manganese content. Potassium, sodium, iron and copper contents decreased, while the concentrations of calcium and phosphorus increased during lactation. The concentrations of vitamins A, D₃, E, K₃ and C in colostrum were 1.61, 0.015, 3.69, 0.092 and 68.4 mg kg^{-1} , respectively, and with the exception of vitamin K₃, were 1.5–2.0 times the levels in late lactation milk (0.92, 0.009, 2.53, 0.089 and 45.3 mg kg^{-1}). These concentrations of vitamins in sow's milk were 2–3 times those in cow's milk. There were no significant differences among breeds or interaction between breeds and sampling dates relative to the composition of colostrum and milk samples. Copyright © 1996 Published by Elsevier Science Limited

INTRODUCTION

Milk contains protein, fat and mineral elements which are essential in the diet of man; 1 L of whole cows' milk can meet 20–60% of man's daily requirements for many of these nutrients. Cows, goats and ewes produce this essential food from feeds which are unsuitable for human consumption, and of limited value for monogastric animals. The situation is different in the case of sows which consume foods which are suitable for human consumption, and so are rivals of man in the food chain. Knowledge of the composition of sow's milk could be used in formulating diets for early-weaned or orphaned piglets.

The mammary gland develops during the last stage of pregnancy in non-milking sows. Milk production normally starts at parturition, but may begin one or two days before or after parturition. During the final hours of gestation, a highly pigmented and viscous colostrum secretion accumulates in the mammary gland. This secretion, called colostrum or pre-colostrum depending on time of collection, has as its predominant components globulin and albumin and smaller amounts of casein. Klobasa *et al.* (1987) reported that during the first 6 days of lactation, colostrum contained more dry matter and protein and less fat and lactose than normal milk. After the colostrum period, the concentration of fat and lactose in milk increased, while the dry matter remained constant.

As early as 1892, Erlich observed that the main protein fraction of colostrum — the globulins — was responsible for development of passive immunity in newborn animals. Many publications have appeared on this subject (Speer *et al.*, 1959; Payne & Marsh, 1962; Lecce *et al.*, 1962; Hardy, 1965; Butler, 1971; Werhahn *et al.*, 1981; Klobasa *et al.*, 1981, 1986). Many researchers measured individual animal variations and studied the influence of stage of lactation, age of sow, feeding regime and season on milk production and milk composition (Neuhaus, 1961; Onderscheka, 1969; Rerat & Duee, 1975).

Kovács *et al.* (1967) examined the composition of sows' colostrum during lactation and established that to the 6th day of lactation, the pre-albumin did not change but the α - and β -globulins increased a little. On the other hand, the concentration of γ -globulins decreased rapidly after parturition. Jensen (1978) and Jensen & Pedersen (1979) examined the IgG, IgA and IgM composition of sow's colostrum, while the IgG content of colostrum and the changes in its concentration were studied by Frenyó *et al.* (1981). In the opinion of Inoue (1981), the environment, age, feeding and number of sows on the farm scarcely influenced the IgM content of colostrum. Klobasa *et al.* (1987) found that the

total protein content of the first colostrum was 2–2.5 times higher, whey protein content five times higher, and non-protein nitrogen content lower than that of normal milk. The principal constituents of the whey protein fraction were IgG and IgM. Hennig & Anke (1966) obtained similar results when they examined the total protein and NPN content of sow's milk.

Kovács (1961) studied milk production and milk composition of Large White sows and established that the digestible protein content of colostrum on the first day of lactation was 10.02%. Comparable values for milk samples drawn on the 12th and 34th days of lactation and at the end of lactation were 4.40, 5.18 and 6.47%, respectively. Berezvai & Rákóczi (1966), who compared the composition of milks from Hungarian Large White and Cornwall sows, established that the colostrum of the latter contained more protein than that from the former. Klaver *et al.* (1981) compared the composition of milks from sows which were in good or poor body condition, while White *et al.* (1984) measured the influence of dietary fructose and glucose on the composition of sow's milk; it was concluded that diet did not significantly influence milk composition. However, Noblet & Etienne (1986) found a significantly higher protein content in milk of sows consuming a high energy feed than in milk of sows consuming a lower energy diet. In all of the above citations, the stage of lactation had a significant effect on milk composition.

The amino acid composition of sow's milk protein was described by Elliott *et al.* (1971), Duee & Jung (1973) and Dourmad *et al.* (1991). Gurr (1981) compared the amino acid composition of porcine and human milks and established that the protein of the latter contained less glutamic acid, methionine, tyrosine, lysine and histidine and more cystine and tryptophan than porcine milk protein. The ratio of methionine to cystine was quite different for the two milks which did not differ significantly for the other amino acids. Recently, King *et al.* (1993) demonstrated that increased dietary protein was associated with increased milk yield and milk protein output, but did not affect the proportions of amino acids in milk protein.

Colostrum was reported to contain more dry matter, fat, ash, calcium, phosphorus, iron, sodium, potassium and copper than normal sow's milk (Berezvai & Rákóczi, 1966; Hennig & Anke, 1966). Hennig & Anke (1966) also found that ash, calcium, magnesium, phosphorus and manganese contents increased during lactation. Klaver *et al.* (1981), who compared the composition of milks from sows with poor or very good body condition, found that the latter produced more milk which contained more energy than that from sows in poor condition. They also reported that the level of feeding did not influence milk composition in early lactation. Noblet & Etienne (1986) reported that the energy content of the diet did not influence lactose and ash contents, but the levels of dry matter, fat and energy were significantly higher in milk from sows consuming low energy food; in their opinion, the higher dry matter content was largely due to a higher fat content. The higher fat content was attributed to the fact that sows consuming low-energy food mobilised their body fat reserves better than did sows consuming high-energy food. Feeding with fructose or glucose did not influence the fat content of milk, but the lactose content of milk was significantly higher in milk from sows consuming fructose than that from sows consuming glucose (White *et al.*, 1984).

Klobasa & Farries (1986) found that there were no short-chain fatty acids ($\leq \text{C}_{10}$) in colostrum on the 1st day of lactation. Butyric acid was detected only at the end of lactation and caproic acid after 28 days of lactation. Oleic acid was the

predominant fatty acid, followed by palmitic and linoleic acids. The proportions of fatty acids changed continuously during lactation. They stated that the fatty acid spectrum of sow's milk fat differed considerably from the milk fat of ruminants. Drochner & Markus (1987), who analysed the composition of milk of sows fed a diet containing 8% soybean oil, found that the fat content increased by 4–5% during the first 2 weeks, but only by 2% in the 4th and 5th weeks of lactation. The linoleic acid content of the milk fat increased when soybean oil was fed. The concentration of lactose in the milk of sows was not affected by soybean oil. Elliott *et al.* (1971) reported that sow's milk fat contained no C_{4:0} and far less C_{6:0} and C_{8:0} fatty acids than bovine milk fat. Myristoleic acid (C_{14:1}) was not found in sow's milk, but linolenic and linoleic acids were present at higher concentrations than in cow's milk.

Colostrum from Cu-depleted sows showed a greatly reduced Cu content relative to that of sows given an adequate Cu supply (Kirchgessner *et al.*, 1981); the provision of adequate copper after parturition produced normal Cu levels within 5 days. According to Gurr (1981), sow's milk contains less Na and K and more Ca, Mg, P, Fe, Zn and Mn than cow's milk; the ratio of Ca:P is slightly greater in sow's milk than in cow's milk. Sow's milk contains 2–3 times as much vitamin A and 4–5 times as much vitamin C as cow's milk (Elliott *et al.*, 1971). No references were found concerning concentrations of other vitamins in sow's milk.

The objectives of this study were: 1) to determine the composition of sows' colostrum and milk; 2) to describe compositional changes from farrowing to 60 days post-partum; and 3) to estimate differences between genotypes and variation among individuals within genotype with regard to milk composition.

MATERIALS AND METHODS

Milk samples were collected from 10 Danish Large White, 10 Danish Duroc and 10 Norwegian Landrace sows which were chosen to be representative of their genotypes. The diet, a traditional maize–wheat–soy–sunflower diet containing 16.1% protein and ME of 12.5 MJ/kg, was the same for all sows. Housing was the same for all sows. Litter sizes and average pig birth weights were uniform with Large White, Duroc and Landrace sows, respectively, averaging 9.8, 9.2 and 10.7 pigs/litter and 1.4, 1.2 and 1.5 kg/pig.

The schedule for collection of colostrum and milk samples (25–50 cm³) by hand milking was immediately after parturition and after 12, 24 and 48 h and 3, 5, 10 and 20 and 45–60 days of lactation. The first colostrum sample was taken before the piglets could suckle. For later samples, piglets suckled and were separated from the sow approximately 10 min prior to milking and milk let-down was initiated by a warm water wash of the udder. Great care was taken to completely milk all the mammary glands so that the sample would be representative of the milk consumed by the piglets. The complete milking process required 6–10 min and, due to recent nursing by the piglets, the sample volume was 40–50 cm³.

One sample, a composite from all mammary glands, was collected from each sow at each of the nine times. Vitamin content were determined on unfrozen samples, with vitamin C analysis being initiated within 4 h after sampling and the other vitamin analyses being initiated on the day of sampling. Milk samples were frozen and stored at –25°C. All analyses were initiated within one month of

sampling. In a previous experiment on cow's milk (Csapó, 1984), one month storage in the frozen state had no effect on analytical results.

Total protein content and protein fractions of colostrum and milk were measured using the Kjel-Foss nitrogen analyser (protein equivalent = N% $\times$ 6.38). Separation of protein fractions Csapó (1984) was performed in three steps: (1) total protein from nitrogen content of skim milk, (2) whey protein from the nitrogen content of skim milk following precipitation of casein with 37% HCl at pH 4.55, and (3) non-protein nitrogen from the nitrogen content of skim milk deproteinized by using trichloroacetic acid. Differences among these values were calculated to obtain casein (1–2), true protein (1–3) and true whey protein (2–3) percentages. The amino acid composition of milk protein was measured using an LKB 4101 automatic amino acid analyser (LKB Biochrom, UK). Protein was hydrolysed by 6M HCl; cystine was determined as cysteic acid. Tryptophan was determined after hydrolysis with Ba(OH)₂ (Csapó, 1982; Csapó & Csapóné, 1986). The biological value of milk protein was calculated by the method of Morup & Olesen (1976) on the basis of amino acid composition.

Determination of total free amino acids was performed with an LKB 4101 automatic amino acid analyser, following post-column derivitization with ninhydrin. After defrosting and heating to 30°C, the sows' milk samples were centrifuged at 5000 $\times$ g at room temperature for 20 min to skim the milk and deposit particulate matter at the bottom of the centrifuge tube. To 50 ml of sample, 50 mL of a 25% trichloroacetic acid solution were added and the mixture allowed to stand for 20 min. The resulting precipitate was centrifuged at room temperature for 30 min at 10000 $\times$ g. To determine total free amino acids, the pH of the supernatant was adjusted to pH 2.2 with 4 M NaOH.

The dry matter content of colostrum and milk samples was determined by drying to constant weight at 105°C (Hungarian Standard No. 3744-67) and fat by the Gerber method (Hungarian Standard No. 3703-78). Constant weight was generally reached after 6 h, but more time was required when the fat content was high.

The fatty acid composition of the milk fat was determined as fatty acid methyl esters using a Packard 419 type gas chromatograph equipped with a flame ionisation detector and a Hewlett-Packard 33900-type electronic integrator. For quantitative evaluation, the weight percentage proportions of the methyl esters were regarded as equal to the proportions of the corresponding peaks in the chromatogram (Csapó *et al.*, 1986).

To determine the concentration of vitamins A, D₃ and E in the milks, samples (5 cm³) were saponified by alcoholic pyrogallol solution and 2.5 cm³ 80% KOH and then extracted with alcohol–n-hexane (60:40). The solvent was removed by evaporation and the residue dissolved in 200 μ L methanol; 20 μ L of the solution were injected onto a 250 $\times$ 5 mm column packed with 10 μ m granulated Partisil ODS, fitted on a Pye UNICAM LC-XP HPLC apparatus (Pye UNICAM, UK). Elution was carried out with an 85:15 solution of methanol:water at a flow rate of 1.4 cm³ min^{–1}. Vitamin standards obtained from MERCK (Darmstadt, Germany) were used to establish standard response curves. Vitamin K₃ was determined on a solution obtained by chloroform extraction of an alkaline substrate (pH = 12.5). The extracted vitamin K was determined by measuring the absorbance of the solution at 251 nm using a Beckman UV spectrophotometer. The vitamin C content of milk samples was determined by the method of Radeff (1938).

Ash content was determined by heating the samples to 550°C for 8 h (Hungarian Standard MSZ-3926/2-76). The macro- and micro-elements were present in the ash as metallic oxides and were converted to chlorides by HCl and taken into solution. The concentrations of metals were determined using UNICAM SP-191-type atomic absorption spectrophotometer (standards were purchased from MERCK). Phosphorus content was determined by measuring the absorbance of the blue colour formed by ammonium molybdenate at 720 nm using a Spekol spectrophotometer (Hungarian Standard MSZ 6830/16-79).

The composition of 32 individual cow samples was determined by the same methods as used for sow's milk. The cows were under summer feeding conditions, based principally on grass. Seventeen of the cows were Holstein-Friesian sired crossbreds (62.5% Holstein-Friesian, 25% Jersey and 12.5% Hungarian red spotted) which were in the second or third lactation and 15 were Hungaro-Friesian cows in the first lactation (Csapó, 1984; Csapó *et al.*, 1994).

The data were evaluated by analysis of variance using a model which contained main effects of breed and time of collection plus the interaction of breed and time. Since neither breed nor interaction was significant ($P > 0.25$) for any of the constituents, only means for time are presented. The final model for analysis of variance contained effects of individual sows and time. Differences among times were tested by the method of ranked means.

RESULTS AND DISCUSSION

Concentrations of protein and protein fractions of colostrum and milk

The concentrations of protein and protein fractions and the changes therein in sow's colostrum and milk during a 60-day lactation and the distribution of protein fractions expressed as percentages of total protein are shown in Table 1.

The total protein content of colostrum immediately after parturition averaged 16.65%. This value decreased to 7.97–9.35% in transitional milk (48–72 h of lactation) and to 5.75% in milk on the 10th day of lactation. The changes in true protein coincided closely with those in total protein. There were large changes in whey protein and true whey protein content over time; they decreased from 15.16 and 14.75%, respectively, immediately after parturition, to 8.55 and 7.93% at 24 h, and to 3.0 and 2.65% at 10 days. The casein content of colostrum, which was 1.48% immediately after farrowing, increased to 3.57% at 48 h and afterwards decreased to 2.75% at 5 days of lactation. The NPN content of the first colostrum did not differ significantly from that of mid- and late-lactation milk.

The distribution of protein fractions, expressed as percentages of total protein (Table 1) also changed during lactation. The true protein decreased from 97.5% for first colostrum to 95.5% at 48 h, and to 91.8% for milk after 45–60 days of lactation. Due to decreasing total protein content, the percentage of NPN increased over time. The percentage of total protein in the casein fraction increased rapidly following parturition (8.9% at parturition to 28.2% at 24 h and to 44.0% at 5 days). Whey protein and true whey protein decreased as a percentage of total protein (91.1% at farrowing, 71.8% at 24 h and 51.7% at 20 days for

TABLE 1
Means and Standard Deviations for the Concentration of Protein and Protein Fractions of Sow's Colostrum and Milk (g 100g⁻¹ milk)

Protein fractions	Time after parturition									Cows' milk ^c 5–270
	h					days				
	0	8–14	20–28	44–52	68–76	5	10	20	45–60	
True protein, average ^a , %	16.23	12.66	11.50	8.93	7.54	5.81	5.32	5.11	5.36	3.18–3.97
S.D. ^b	2.33	2.04	1.88	1.90	1.45	0.96	0.56	0.34	0.38	
% of total N	97.5	97.0	96.6	95.5	94.6	93.0	92.5	92.1	91.9	95.5–96.1
True whey protein, average, %	14.75	10.15	7.93	5.36	4.35	3.06	2.65	2.43	2.54	0.57–0.63
S.D.	1.48	1.34	0.97	1.02	0.65	0.53	0.48	0.24	0.29	
% of total N	88.6	77.8	66.6	57.3	54.6	49.0	46.1	43.8	43.6	15.3–17.2
Casein, average, %	1.48	2.63	3.36	3.57	3.19	2.75	2.68	2.68	2.81	2.61–3.34
S.D.	0.11	0.23	0.31	0.31	0.24	0.21	0.16	0.16	0.16	
% of total N	8.9	20.2	28.2	38.2	40.0	44.0	46.6	48.3	48.2	78.3–80.9
NPNx6.38, average, %	0.41	0.40	0.41	0.42	0.44	0.44	0.43	0.44	0.47	0.15–0.16
S.D.	0.05	0.06	0.05	0.05	0.07	0.06	0.05	0.04	0.06	
% of total N	2.5	3.1	3.4	4.5	5.5	7.0	7.5	7.9	8.1	4.0–4.4

^aMean of samples from 30 sows (10 Danish Large White, 10 Danish Duroc and 10 Norwegian Landrace).

^bStandard error of mean = 0.1826 S.D.; 95% confidence range = mean $\pm$ 0.3578 S.D.

^cFrom our earlier investigations (Csapó *et al.*, 1994) based on milk samples from 32 cows.

whey protein). Most of the observed changes occurred during the first 24 h after parturition, but further changes from colostrum to milk occurred gradually over the first 5 days. The differences between the compositions of colostrum and milk were not as great as those observed for ruminants milks in which casein represents a much higher percentage of total protein than was observed for porcine milk (Csapó, 1984; Csapó *et al.*, 1994).

These results for the changes in total protein, NPN and whey protein concentrations are in good agreement with those of Klobasa *et al.* (1987). The value of 16.65% for the total protein content of first-milked colostrum was slightly higher than that reported by Lucas & Lodge (1961). The actual percentage whey protein was higher and the actual percentage casein was lower than those reported by Salmon-Legagneur (1964). The concentrations of NPN in colostrum and milk were very similar to those reported by Lucas & Lodge (1961). No reports were found in which protein fractions of colostrum and milk were compared, or in which changes in protein fractions from first colostrum to the end of lactation were described.

Free amino acid composition of colostrum and milk

The free amino acid content of sow's colostrum and milk, expressed as mg free amino acid/100 g milk, are shown in Table 2. The total free amino acid content of milk was 18% higher than that of colostrum. The free amino acid content of colostrum was significantly higher than that of mare's colostrum (Csapó *et al.*, 1995a). Milk contained more (69.59 mg 100 ml⁻¹) acidic and hydroxy amino acids (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid), and less (5.9 mg 100 ml⁻¹) basic amino acids (lysine, histidine, arginine), than colostrum, which contained 28.96 mg 100 ml⁻¹ acidic amino acids and 13.8 mg 100 ml⁻¹ basic amino acids. Significant differences were observed between colostrum (0–72 h) and milk (5–60 days) in valine, methionine, isoleucine, tyrosine and phenylalanine contents. Colostrum contained 3–8 times as much of these amino acids as did milk. Milk contained significantly more aspartic acid, serine and glutamic acid than colostrum. No comparable data for the free amino acids were found in the literature.

TABLE 2
Concentration of Free Amino Acids in Sow's Colostrum and Milk

Amino acid	Free amino acid content, mg free amino acid/100 g milk			
	Colostrum ^a		Milk ^b	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Aspartic acid	4.31	0.22	12.18	0.34
Threonine	3.50	0.21	6.54	0.32
Serine	5.51	0.23	24.32	0.42
Glutamic acid	15.63	0.34	26.55	0.45
Proline	6.91	0.25	3.81	0.11
Glycine	4.64	0.11	10.21	0.23
Alanine	6.92	0.17	7.33	0.22
Cystine	0.99	0.12	1.02	0.09
Valine	4.41	0.23	0.85	0.08
Methionine	3.50	0.30	0.89	0.07
Isoleucine	1.60	0.11	0.47	0.05
Leucine	7.51	0.23	0.99	0.06
Tyrosine	3.14	0.19	1.42	0.09
Phenylalanine	3.41	0.17	0.93	0.11
Lysine	4.52	0.11	1.03	0.09
Histidine	2.43	0.09	1.35	0.11
Arginine	6.85	0.31	3.74	0.22
Totals	85.78		103.63	

^aMean of samples from 3 Danish Large White, 3 Danish Duroc and 3 Norwegian Landrace sows representing first drawn colostrum.

^bMean of samples from 3 Danish Large White, 3 Danish Duroc and 3 Norwegian Landrace sows representing milk samples between 45–60 days of lactation.

Amino acid composition of colostrum, milk, colostrum protein and milk protein

Amino acid concentrations in sow's colostrum and milk, expressed as g 100g⁻¹ fluid, are shown in Table 3 and are expressed as g 100g⁻¹ protein in Table 4. The percentages of each of 18 amino acids present in colostrum and milk (Table 3) decreased from farrowing to 45–60 days in a manner which paralleled the change of total protein content. Threonine content decreased from 0.96 g 100g⁻¹ colostrum to 0.24 g 100g⁻¹ milk and the corresponding change for glutamic acid was 3.01 to 1.30. The ratios of final to initial values for the individual amino acids ranged from 0.22 to 0.44. The comparable ratio for total protein was 5.83/16.65=0.35. When the amino acid (AA) concentration was expressed as g AA 100g⁻¹ protein, the changes were much less apparent (Table 4). Threonine decreased from 5.8 to 4.1 g 100g⁻¹ protein, serine decreased from 6.5 to 5.4 g 100g⁻¹ protein, valine decreased from 5.0 to 3.8 g 100g⁻¹ protein, but glutamic acid increased from 18.1 to 22.1 g 100g⁻¹ protein, and proline from 9.1 to 11.1 g 100g⁻¹ protein. The sum of five essential amino acids (threonine, valine, cystine, tyrosine and lysine) decreased from 22.9 to 20.1 g 100g⁻¹ protein, while the total of two non-essential amino acids (glutamic acid and proline) increased from 27.2 to 33.2 g 100g⁻¹ protein. In general, the percentages of essential amino acids in milk protein decreased, while those of non-essential amino acids increased or showed no change during lactation.

Elliott *et al.* (1971) reported that the level of dietary protein consumed by sows had essentially no influence on amino acid composition of sows' milk. The only effect they observed was that sows which consumed a low protein diet had a higher concentration of glutamic acid in their milk. The lysine content of milk protein in this experiment, 6.9–7.2 g 100g⁻¹ protein between 10 and 60 days of lactation, is in agreement with results of Elliott *et al.* (1971) and King *et al.* (1993). Higher levels of lysine (7.59 and 7.24 g lysine 100 g⁻¹ protein, respectively) were reported by Duee & Jung (1973) and Dourmad *et al.* (1991). No references were found which reported data on the amino acid composition of colostrum collected immediately after parturition. Data for the amino acid composition of milk protein generally agreed with the results of King *et al.* (1993), Elliott *et al.* (1971), Duee & Jung (1973) and Dourmad *et al.* (1991). However, there were cases where differences were observed for specific amino acids.

Biological value of milk protein

The biological value of milk protein was calculated by the method of Morup & Olesen (1976) based on amino acid composition (Table 5). The choice of this method was based on the desire to compare sow's milk with cow's milk. The biological value of colostrum milked between farrowing and the 5th day of lactation were only slightly lower (extremes: 118.0 and 129.5) than the maximum of the method (140). This was due to the very high content of essential amino acids (especially threonine and cystine). Between 0 and 52 h, the biological value of milk protein increased from 118.0 to 129.5, and then decreased. From the 10th to the 45–60th days, the biological value of milk protein averaged 107.5. This is a very high biological value compared with that of cow's milk which was 80.2 based on the data in Table 4. These differences can be explained by the higher proportion of whey protein and higher concentrations of essential amino acids, espe-

TABLE 3

Amino Acid Composition of Sow's Colostrum and Milk as a Function of Time After Parturition (g AA 100g⁻¹ milk)

Amino acids		Time after parturition										Cow's ^a milk
		<i>h</i>					<i>days</i>					
		0	8-14	20-28	44-52	68-76	5	10	20	45-60		
Aspartic acid	x	1.29	0.99	0.94	0.76	0.64	0.49	0.45	0.45	0.47	0.26	
	S.D.	0.124	0.091	0.083	0.082	0.051	0.042	0.041	0.039	0.036	0.021	
Threonine	x	0.96	0.69	0.64	0.47	0.47	0.25	0.24	0.24	0.24	0.15	
	S.D.	0.088	0.071	0.059	0.041	0.037	0.022	0.019	0.019	0.017	0.010	
Serine	x	1.09	0.84	0.75	0.59	0.48	0.36	0.31	0.29	0.33	0.16	
	S.D.	0.081	0.079	0.082	0.079	0.038	0.015	0.014	0.017	0.013	0.009	
Glutamic acid	x	3.01	2.48	2.23	1.76	1.47	1.37	1.28	1.24	1.30	0.77	
	S.D.	0.169	0.181	0.147	0.132	0.101	0.092	0.083	0.081	0.070	0.039	
Proline	x	1.51	1.16	1.13	0.90	0.78	0.67	0.63	0.61	0.66	0.32	
	S.D.	0.123	0.112	0.109	0.087	0.063	0.042	0.028	0.031	0.032	0.021	
Glycine	x	0.52	0.39	0.36	0.28	0.24	0.16	0.13	0.13	0.13	0.06	
	S.D.	0.038	0.035	0.035	0.029	0.021	0.010	0.009	0.008	0.008	0.005	
Alanine	x	0.74	0.56	0.51	0.40	0.30	0.22	0.16	0.16	0.16	0.10	
	S.D.	0.041	0.050	0.049	0.038	0.021	0.019	0.011	0.010	0.010	0.006	
Cystine	x	0.30	0.22	0.21	0.16	0.12	0.09	0.09	0.09	0.09	0.02	
	S.D.	0.021	0.011	0.009	0.009	0.008	0.007	0.006	0.006	0.006	0.003	
Valine	x	0.84	0.66	0.60	0.43	0.37	0.26	0.22	0.22	0.22	0.16	
	S.D.	0.047	0.032	0.031	0.029	0.020	0.021	0.017	0.016	0.015	0.010	
Methionine	x	0.29	0.22	0.20	0.17	0.14	0.12	0.10	0.10	0.10	0.06	
	S.D.	0.019	0.017	0.016	0.014	0.013	0.009	0.008	0.009	0.005	0.004	
Isoleucine	x	0.40	0.32	0.29	0.24	0.25	0.19	0.17	0.17	0.17	0.14	
	S.D.	0.031	0.027	0.014	0.015	0.016	0.012	0.011	0.010	0.010	0.007	
Leucine	x	1.65	1.32	1.23	0.98	0.80	0.66	0.57	0.56	0.57	0.29	
	S.D.	0.137	0.111	0.109	0.092	0.073	0.054	0.042	0.038	0.038	0.019	
Tyrosine	x	0.66	0.54	0.45	0.38	0.33	0.24	0.23	0.23	0.22	0.15	
	S.D.	0.043	0.039	0.036	0.030	0.021	0.019	0.010	0.010	0.009	0.006	
Phenylalanine	x	0.74	0.57	0.52	0.40	0.31	0.22	0.22	0.21	0.20	0.16	
	S.D.	0.059	0.051	0.043	0.040	0.027	0.016	0.016	0.014	0.010	0.008	
Lysine	x	1.05	0.89	0.73	0.58	0.50	0.39	0.42	0.40	0.39	0.27	
	S.D.	0.078	0.062	0.061	0.042	0.038	0.021	0.020	0.020	0.017	0.012	
Histidine	x	0.35	0.28	0.26	0.20	0.18	0.13	0.13	0.13	0.12	0.10	
	S.D.	0.026	0.019	0.012	0.010	0.010	0.009	0.008	0.009	0.008	0.005	
Tryptophan	x	0.26	0.21	0.19	0.14	0.13	0.09	0.10	0.10	0.10	0.05	
	S.D.	0.014	0.011	0.011	0.010	0.009	0.005	0.005	0.004	0.004	0.002	
Arginine	x	1.01	0.74	0.66	0.52	0.47	0.34	0.32	0.31	0.32	0.11	
	S.D.	0.070	0.065	0.053	0.048	0.033	0.029	0.019	0.018	0.014	0.005	

^aFrom our earlier investigations (Csapó *et al.*, 1986) based on milk samples from 32 cows.

TABLE 4

Amino Acid Composition of Sow's Colostrum Protein and Milk Protein as a Function of Time After Parturition (g AA 100 g⁻¹ protein)

Amino acids		Time after parturition										Cow's ^a milk protein
		h					days					
		0	8-14	20-28	44-52	68-76	5	10	20	45-60		
Aspartic acid	x	7.8	7.6	7.9	8.2	8.0	7.9	7.9	8.0	7.9	7.8	
	S.D.	0.75	0.70	0.70	0.88	0.64	0.68	0.72	0.69	0.61	0.63	
Threonine	x	5.8	5.3	5.4	5.1	5.4	4.0	4.1	4.2	4.1	4.5	
	S.D.	0.53	0.55	0.50	0.44	0.46	0.36	0.33	0.34	0.29	0.30	
Serine	x	6.5	6.4	6.3	6.3	6.1	5.7	5.4	5.3	5.4	4.8	
	S.D.	0.49	0.61	0.69	0.86	0.48	0.24	0.25	0.30	0.22	0.27	
Glutamic acid	x	18.1	19.0	18.8	18.8	18.6	21.9	22.3	22.4	22.1	23.2	
	S.D.	1.02	1.39	1.24	1.42	1.26	1.48	1.46	1.44	1.18	1.17	
Proline	x	9.1	8.9	9.5	9.7	9.8	10.6	11.0	10.9	11.1	9.6	
	S.D.	0.74	0.86	0.92	0.94	0.79	0.68	0.49	0.55	0.54	0.63	
Glycine	x	3.1	3.0	3.1	3.0	3.0	2.6	2.3	2.3	2.2	1.8	
	S.D.	0.23	0.27	0.29	0.31	0.26	0.16	0.16	0.14	0.13	0.15	
Alanine	x	4.4	4.3	4.3	4.2	3.8	3.6	2.8	2.8	2.9	3.0	
	S.D.	0.25	0.38	0.41	0.41	0.26	0.31	0.19	0.18	0.17	0.18	
Cystine	x	1.8	1.7	1.8	1.7	1.5	1.4	1.5	1.5	1.5	0.6	
	S.D.	0.13	0.08	0.08	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.09	
Valine	x	5.0	5.1	5.1	4.6	4.7	4.1	3.8	3.9	3.8	4.8	
	S.D.	0.28	0.25	0.26	0.31	0.25	0.34	0.30	0.28	0.25	0.30	
Methionine	x	1.7	1.7	1.7	1.8	1.8	1.9	1.6	1.6	1.6	1.8	
	S.D.	0.11	0.13	0.13	0.15	0.16	0.15	0.14	0.16	0.08	0.12	
Isoleucine	x	2.4	2.5	2.4	2.6	3.2	3.0	2.9	2.9	2.9	4.2	
	S.D.	0.19	0.21	0.12	0.16	0.20	0.19	0.19	0.18	0.17	0.21	
Leucine	x	9.9	10.1	10.4	10.5	10.1	10.4	9.8	9.9	9.7	8.7	
	S.D.	0.82	0.85	0.92	0.99	0.91	0.87	0.74	0.68	0.64	0.57	
Tyrosine	x	4.0	4.1	3.8	4.1	4.1	3.9	3.9	3.9	3.8	4.5	
	S.D.	0.26	0.30	0.30	0.32	0.26	0.31	0.18	0.18	0.15	0.18	
Phenylalanine	x	4.4	4.4	4.4	4.2	3.8	3.6	3.8	3.8	3.7	4.8	
	S.D.	0.35	0.39	0.36	0.43	0.34	0.26	0.28	0.25	0.17	0.24	
Lysine	x	6.3	6.7	6.2	6.2	6.3	6.2	7.2	7.0	6.9	8.1	
	S.D.	0.47	0.48	0.51	0.45	0.48	0.34	0.35	0.36	0.29	0.36	
Histidine	x	2.1	2.1	2.2	2.2	2.3	2.0	2.3	2.3	2.2	3.0	
	S.D.	0.16	0.15	0.10	0.11	0.13	0.15	0.14	0.16	0.13	0.15	
Tryptophan	x	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.4	1.6	1.6	1.6	1.5	
	S.D.	0.08	0.08	0.09	0.11	0.11	0.08	0.09	0.07	0.07	0.06	
Arginine	x	6.1	5.7	5.6	5.6	5.9	5.4	5.6	5.5	5.6	3.3	
	S.D.	0.42	0.50	0.45	0.52	0.41	0.47	0.33	0.32	0.24	0.15	

^aFrom our earlier investigations (Csapó *et al.*, 1986) based on milk samples from 32 cows.

TABLE 5
Biological Value of Colostrum Protein and Milk Protein as a Function of Time After Parturition^a

Time after parturition (h)	Biological value	Time after parturition (days)	Biological value
0	118.0	5	118.8
8–14	122.9	10	108.6
20–28	127.6	20	107.6
44–52	129.5	45–60	106.4
68–76	122.5		

^aOne value calculated for each time after parturition based on the average concentration of amino acids (Table 4) and the method of Morup & Olesen (1976).

cially threonine, in sow's milk. No comparable data on the biological value of sow's milk protein were found in the literature.

Dry matter and fat content of colostrum and milk

Dry matter and fat concentrations associated with the stage of lactation (colostrum to 45–60 days) for sows are shown in Table 6. The dry matter content of the colostrum immediately after parturition averaged 24.03% and remained unchanged to 24 h of lactation. It increased thereafter and reached a maximum of 27.03–27.37% between 44 and 76 h post-partum. The dry matter content of milk decreased to about 22, 20 and 19% after 5, 10 and 20 to 60 days, respectively. The changes in dry matter content with time after farrowing were compared with similar changes for other species (Csapó, 1984; Csapó *et al.*, 1994, 1995a,b) and the maximum dry matter content at 48–72 h of lactation was found to be atypical. In most other farm animals, there was a decrease in dry matter content immediately after parturition. Klobasa *et al.* (1987) also observed higher dry matter contents at 72 h and 5 days than at 12 and 24 h of lactation for porcine milk. However, the differences were much less than those reported here. The elevated dry matter content observed here and by Klobasa *et al.* (1987) could be associated with low water intake, constipation and/or elevated body temperature, which are conditions commonly observed in sows during early lactation.

The fat content of colostrum was also highest (12.90–12.99%) at 48–72 h of lactation and was more than twice the level measured at 0 and 12 h of lactation (5–6%). It is probable that the increase in dry matter content was due largely to the increase in fat content. Fat concentration in sow's milk, expressed as a percentage of the maximum value, decreased at the same rate as dry matter content. Fat content at 5, 10, 20 and 45–60 days was 10.8, 9.0, 7.9 and 6.5 g 100g⁻¹, respectively. Considering 0–72 h samples to represent colostrum, the dry matter and fat content of colostrum were higher than those of milk.

Trends in the changes in fat content with time after parturition were very similar to those reported by Klobasa *et al.* (1987), but the levels observed were much higher in the present study. The differences between the studies may be due

TABLE 6
Dry Matter and Fat Concentrations (g 100g⁻¹) in Colostrum and Milk of Sows

Time after parturition (h/day)	Dry matter		Fat	
	Average	S.D. ^a	Average	S.D. ^a
0	24.03 ^c	2.99	5.32 ^g	2.05
8–14	23.01 ^c	3.52	6.13 ^{fg}	3.01
20–28	23.40 ^c	2.82	9.99 ^{cd}	3.56
44–52	27.37 ^b	2.72	12.90 ^b	3.11
68–76	27.03 ^b	3.93	12.99 ^b	2.47
5	22.32 ^c	3.77	10.78 ^c	2.33
10	19.74 ^d	1.15	9.02 ^{de}	1.92
20	18.60 ^e	1.05	7.92 ^e	1.54
45–60	18.69 ^e	1.35	6.49 ^f	1.42
Cow ^h	12.55	1.22	3.86	0.55

^a = Standard error of mean = 0.1826 S.D.; 95% confidence interval for mean is mean $\pm$ 0.3578 S.D.

^{b, c, d, e, f, g} = Means in the same column having no superscripts in common differ ($P < 0.05$).

^h From our earlier investigations (Csapó, 1984) based on milk samples from 32 cows.

to different breeds, feeding regimes or the method of sampling colostrum and milk. We tried to milk (except the first colostrum) all the mammary glands totally, and it is well known that the last milk drawn is more concentrated in fat. In this experiment, the piglets suckled their mothers, and the composition of milk samples should be comparable to that of milk consumed by the piglets. For sows, as for other farm animals, differences in milk sampling technique can cause large differences in concentrations of dry matter and fat.

The dry matter and fat content of sow's milk were 1.6 and 2.2 times higher than those of cow's milk on days 5 through 60.

Concentrations of macro- and micro-elements in colostrum and milk

Changes in the concentrations of macro- and micro-elements during lactation (first-drawn colostrum to 45–60 days) for sows are shown in Table 7 and Table 8, which include corresponding data for cow's milk.

The ash content of sow's first-drawn colostrum was 0.66%, and this level was maintained during the 1st day of lactation. The ash content increased to 0.76 and 0.82% on the 2nd and 3rd days of lactation, respectively. From day 3 to the end of lactation, the ash content of porcine milk ranged from 0.80 to 0.84%, which was 6–12% higher than that of cow's milk.

The potassium content of colostrum was highest immediately after parturition (1100 mg kg⁻¹) but decreased to 750–800 mg kg⁻¹, i.e., approximately 35% lower than that in cow's milk. The concentration of sodium in sow's colostrum was 658 to 802 mg kg⁻¹ during the first 2 days of lactation, but was only 400–500 mg kg⁻¹ in milk from day 5 to the end of lactation, i.e., 10% less than cow's milk.

894

J. Csapó et al.

TABLE 7
Concentrations of Macro-elements in Porcine Colostrum and Milk

Time after parturition (h/day)	Macro-elements (mg kg ⁻¹)					
	Ash (g/100 g ⁻¹)	Potassium	Sodium	Calcium	Phosphorus	Magnesium
0						
Average	0.66	1100	685	686	1017	78.5
S.D. ^a	0.07	65	181	290	140	20.5
8–14						
Average	0.66	997	802	820	1002	83.9
S.D.	0.12	88	203	296	169	15.7
20–28						
Average	0.65	936	764	992	1092	90.8
S.D.	0.17	180	228	333	132	17.4
44–52						
Average	0.76	911	658	1157	1088	97.6
S.D.	0.07	120	153	436	166	15.7
68–76						
Average	0.82	841	709	1490	1104	107.3
S.D.	0.08	124	282	278	153	18.0
5						
Average	0.81	952	491	1632	1239	94.5
S.D.	0.04	223	315	285	229	11.3
10						
Average	0.80	836	470	1659	1202	93.1
S.D.	0.04	63	179	153	90	7.1
20						
Average	0.81	808	394	1746	1323	101.4
S.D.	0.06	63	37	129	105	5.1
45–60						
Average	0.84	748	387	1965	1510	110.7
S.D.	0.03	109	64	150	44	7.7
Cow ^b						
Average	0.75	1204	504	1287	996	139
S.D.	0.03	68	33	143	11	12

^a = Standard error of mean = 0.1826 S.D.; 95% confidence interval for mean is mean $\pm$ 0.3578 S.D.

^b From our earlier investigations (Csapó, 1984) based on milk samples from 32 cows.

Porcine colostrum and milk

895

TABLE 8
Concentrations of Micro-elements in Porcine Colostrum and Milk

Time after parturition (h/day)	Micro elements (mg kg ⁻¹)			
	Zinc	Iron	Copper	Manganese
0				
Average	15.70	1.70	3.77	0.06
S.D. ^a	4.98	0.24	1.24	0.03
8–14				
Average	12.99	1.88	3.25	0.05
S.D.	5.01	0.78	1.26	0.01
20–28				
Average	12.44	2.39	3.32	0.11
S.D.	4.34	1.35	0.96	0.07
44–52				
Average	8.82	2.73	3.63	0.06
S.D.	3.03	0.88	0.87	0.02
68–76				
Average	5.75	2.92	3.77	0.06
S.D.	2.53	1.09	1.39	0.02
5				
Average	5.84	2.35	1.67	0.08
S.D.	1.41	0.99	0.56	0.04
10				
Average	5.64	2.21	1.24	0.07
S.D.	1.11	0.61	0.16	0.03
20				
Average	6.14	2.02	1.33	0.08
S.D.	0.87	0.66	0.12	0.03
45–60				
Average	6.49	2.44	1.34	0.10
S.D.	0.06	1.15	0.20	0.05
Cow ^b				
Average	5.63	1.07	0.302	0.09
S.D.	0.19	0.32	0.055	0.01

^a = Standard error of mean = 0.1826 S.D.; 95% confidence interval for mean is mean $\pm$ 0.3578 S.D.

^b From our earlier investigations (Csapó, 1984) based on milk samples from 32 cows.

The calcium content of the colostrum increased from 686 to 1157 mg kg⁻¹ during the first 2 days of lactation and to 1965 mg kg⁻¹ in milk at the end of lactation, i.e., approximately 25% higher than that in cow's milk. The phosphorus concentration of colostrum changed only slightly during the first 48 h of lactation (1017–1088 mg kg⁻¹), but thereafter increased in a similar manner to calcium and reached 1510 mg kg⁻¹ at the end of lactation, i.e., approximately 25% higher than that of cow's milk. The magnesium content of first colostrum (78.5 mg kg⁻¹) was surprisingly low relative to values observed at later stages of lactation; it increased to 97.6 mg kg⁻¹ by the 2nd day of lactation and ranged from 93.1 to 110.9 mg kg⁻¹ for the remainder of the lactation; the concentration of magnesium was approximately 25% lower than that in cow's milk.

The zinc content of colostrum was highest at parturition (15.70 mg kg⁻¹) and decreased continuously to the 3rd day of lactation (5.75 mg kg⁻¹), after which it remained constant at 5.69 to 6.49 mg kg⁻¹ to the end of lactation, i.e., similar to cow's milk. The iron content of the colostrum was lowest at parturition (1.70 mg kg⁻¹), and attained maximum values (2.73–2.92 mg kg⁻¹) on days 2 and 3 of lactation; iron concentrations (2.02–2.44 mg kg⁻¹) from day 5 to the end of lactation were approximately twice the level in cow's milk.

The copper content of sow's colostrum was essentially constant during the first 3 days of lactation (3.25–3.77 mg kg⁻¹); in porcine milk (days 10–60) the concentration was 1.24–1.34 mg kg⁻¹, i.e. four times higher than cow's milk. The manganese content of sow's milk reached a maximum 24 h after parturition (0.108 mg kg⁻¹); the concentration decreased to 0.058–0.061 mg kg⁻¹ after 2–3 days and to 0.100 mg kg⁻¹ at the end of lactation, which was similar to that in bovine milk.

In this study, porcine colostrum (0–72 h) was found to have lower concentrations of ash, calcium, phosphorus, magnesium, iron and manganese than porcine milk. However, the concentration of potassium, sodium, zinc and copper were higher in colostrum than in milk. Berezhvai and Rákóczi (1966) reported that sow's colostrum contained lower levels of dry matter, fat, ash, calcium and phosphorus than those reported here. Hennig and Anke (1966) also found that the concentration of sodium, potassium and copper in porcine colostrum were higher than those in milk, and reported time-dependent changes in ash, calcium, magnesium, phosphorus and manganese very similar to those reported here.

Changes in the concentration of minerals over time followed several patterns: 1) continuous decrease (potassium), 2) continuous increase (calcium, phosphorus), 3) increase to day 2 or 3 and then remained constant (ash, magnesium, iron), 4) decrease to day two or three and remained relatively constant thereafter (sodium, zinc), and 5) decrease after 3 days (copper).

The mineral content of porcine and bovine milks were compared. Sow's milk (5–60 days) contained 10, 25, 25, 100 and 300%, respectively, more ash, calcium, phosphorus, iron and copper, but 10, 35 and 25% less sodium, potassium and magnesium, respectively, than cow's milk. Zinc and manganese contents were essentially equal. These findings are in good agreement with those of Gurr (1981) who reported that sow's milk contained more calcium, phosphorus, iron and copper and less sodium and potassium than cow's milk.

Concentrations of vitamins in colostrum and milk

Concentration of vitamins at various stages of lactation (colostrum to 45–60 days) for sows are shown in Table 9; values for cow's milk are included for

comparison. There were no significant ($P > 0.10$) changes in vitamin concentrations during the colostrum period (0–3 days), but the decrease in vitamin C approached significance. The concentrations of vitamins in milk (45–60 days) were lower ($P < 0.05$), with the exception of vitamin K₃, than those in colostrum.

Considering the changes in fat content reported previously (5.3% at parturition, 12.9% at 2–3 days and 6.5% at 45–60 days), the vitamin concentration (A, D, E and K₃) in the milk fat was much higher (2.0–2.5 times) in milk fat obtained immediately after parturition than in milk fat at 3 or 45–60 days of lactation.

No reports were found concerning the vitamin content of colostrum obtained immediately after parturition, or on changes in the vitamin content of milk due to stage of lactation. Values for the concentrations of vitamins A and C in sow's milk were reported by Elliott *et al.* (1971); their values for vitamin A, 40–144 µg 100 mL⁻¹ milk, agree with those in Table 9 for sow's milk, but were lower than those for colostrum. They reported vitamin C concentrations of 5600–11300 µg 100 mL⁻¹ sow's milk, which were higher than the value 45.3 mg kg⁻¹ at 45–60 days, but comparable to the values for colostrum found in this study. There appear to be no comparable data in the literature for the other vitamins.

Comparison of the vitamin content of sow's milk with that of cows' milk, showed that concentrations of the five vitamins in sow's milk ranged from 2.2 to 3.0 times higher than those in cow's milk.

Fatty acid composition of the fat in porcine colostrum and milk

Table 10 shows the fatty acid composition of milk fat at several times post-parturition, expressed as relative percentages of fatty acid methyl esters. Values

TABLE 9
Concentrations (mg kg⁻¹) of Vitamins in Porcine Colostrum and Milk

Vitamin		Time after parturition			
		h		days	Cow ^a
		0	68 76	45 60	
A	x	1.61	1.83	0.92	0.35
	S.D.	0.18	0.22	0.14	0.051
D ₃	x	0.015	0.014	0.009	0.003
	S.D.	0.002	0.002	0.001	0.001
E	x	3.69	3.74	2.53	1.14
	S.D.	0.28	0.26	0.23	0.15
K ₃	x	0.092	0.101	0.089	0.032
	S.D.	0.012	0.011	0.009	0.004
C	x	68.4	57.9	45.3	15.3
	S.D.	12.5	11.9	8.3	1.9

^aFrom our earlier investigations (Csapó, 1984) based on milk samples from 32 cows.

needed to compare fatty acid compositions of porcine and bovine milks are also shown.

The most obvious feature was that sow's colostrum did not contain even traces of butyric, caproic, caprylic and lauric acids prior to 72 h of lactation, and no capric acid prior to 5 days of lactation; porcine milk fat contained no nonadecanoic acid at any stage. On the 5th to 10th days of lactation, butyric, caproic, caprylic and lauric acids could be identified at trace levels ($P < 0.1$); myristoleic, pentadecanoic, pentadecylic, margaric and behenic acid were present at trace levels at all sampling times. The concentrations of heptadecylic and eicosatric+erucic acids in milk fat were only 0.1–0.2%. (Eicosatric and erucic acid could not be separated by the gas chromatographic method used.) The above fatty acids were present at very low concentrations in the milk fat, and represented only 1% of total fatty acids. The presence of these fatty acids in sow's milk has not been reported previously. However, no nonadecanoic acid was found in porcine milk fat. These investigations confirmed that porcine milk fat contained behenic acid and, probably, both eicosatric and erucic acids. The concentrations of the 13 fatty acids discussed above were so low and the standard deviations so large that no conclusion could be reached regarding changes during lactation. Klobasa & Farries (1986) reported that immediately after parturition, the first colostrum did not contain butyric acid. In this study, the short chain (C_4 to C_{12}) fatty acids were present from the 5th to 10th days of lactation. In contrast to the results of Elliott *et al.* (1971), butyric, caprylic and lauric acids were found in porcine milk fat at measurable concentrations.

More than 97% of the fatty acids in sow's milk fat were myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic and linoleic acids; palmitic and oleic acids represented 68% of the total. The palmitic acid content of the milk fat was 33.3% in colostrum immediately after parturition, 27.6% after 5 days and 36.6% at the end of lactation. The percentage of palmitoleic acid was constant at 5.5% at the beginning of lactation, but started to increase at 10 days and had almost doubled by the end of lactation. Oleic acid content was constant through 5 days (37.5–40.3%), but decreased in late lactation. Linoleic acid was higher at 3–5 days of lactation (14.0–14.5%) than before (12.7%) or after (8.4–12.6%). Palmitic and oleic acids were present at nearly equal concentrations in porcine milk fat. Klobasa & Farries (1986) reported that the percentage palmitic acid was higher than that of oleic acid in sow's milk fat; palmitoleic and linoleic acids were present at the 3rd and 4th highest concentrations, respectively. Myristoleic acid which was present at 0.01–0.03%, was not present in sow's milk at a measurable concentration according to Elliott *et al.* (1971).

The differences in fatty acid composition between porcine and bovine milks were primarily in the concentrations of short-chain fatty acids and the degree of saturation. Sow's milk fat contained C_4 to C_{12} fatty acids at barely detectable levels and represented only 0.2% of the total, while the concentrations of these fatty acids represented 8% of the total in cow's milk fat. Bovine milk fat contained more myristic, palmitic and stearic acids, and far less palmitoleic, oleic, linoleic and linolenic acids than porcine milk. In late lactation, 48% of the fatty acids in porcine milk fat were saturated compared with 76% for bovine milk fat, the ratios of saturated to unsaturated fatty acids were 0.92 and 3.17, respectively, for porcine and bovine milks.

TABLE 10
Percentages of Fatty Acids in the Lipids of Porcine Colostrum and Milk (relative percentages of the fatty acid methyl esters*)

Fatty acid	Time after parturition										S.D. ^c	Cow ^b
	days											
	0	8-14	20-28	44-52	68-76	5	10	20	45-60			
Butyric acid (4:0) ^a	0	0	0	0	0.05	0.06	0.05	0.08	0.09	0.006	0.52	
Caproic acid (6:0)	0	0	0	0	0.06	0.09	0.09	0.09	0.09	0.007	0.56	
Caprylic acid (8:0)	0	0	0	0	0	0.02	0.03	0.03	0.03	0.003	0.27	
Capric acid (10:0)	0	0	0	0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.001	2.61	
Lauric acid (12:0)	0	0	0	0	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.002	4.35	
Myristic acid (14:0)	3.20	3.21	3.18	3.06	3.06	3.12	3.61	3.71	4.02	0.307	14.00	
Myristoleic acid (14:1)	0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.03	0.02	0	0.01	0.002	1.41	
Pentadecanoic acid (15:0)	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.002	1.32	
Pentadecylic acid (15:1)	0.01	0	0.01	0	0.02	0.02	0.02	0	0.02	0.002	0.23	
Palmitic acid (16:0)	33.3	32.2	31.1	30.8	29.5	27.6	36.4	37.0	36.6	2.911	44.06	
Palmitoleic acid (16:1)	5.47	5.56	5.52	5.32	5.37	5.46	6.04	9.10	10.52	0.529	2.08	
Margaric acid (17:0)	0.08	0.09	0.05	0.06	0.07	0.08	0.06	0.09	0.08	0.008	0.60	
Heptadecylic acid (17:1)	0.13	0.14	0.14	0.17	0.13	0.16	0.12	0.14	0.15	0.012	0.46	
Stearic acid (18:0)	6.31	6.41	6.34	6.27	6.36	6.32	6.09	6.02	5.93	0.587	7.94	
Oleic acid (18:1)	37.5	38.4	39.5	38.8	39.4	40.3	32.9	33.0	32.3	3.111	17.25	
Nonadecanoic acid (19:0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0.03	
Linoleic acid (18:2)	12.7	12.6	12.7	14.0	14.1	14.5	12.6	8.9	8.4	1.082	1.72	
Arachidic acid (20:4)	0.42	0.44	0.46	0.48	0.67	0.87	0.52	0.51	0.50	0.038	0.19	
Linolenic acid (18:3)	0.74	0.77	0.83	0.91	1.02	1.11	1.02	1.14	1.04	0.080	0.09	
Behenic acid (22:0)	0.01	0.02	0.01	0.01	0	0.01	0.02	0.01	0.01	0.002	0.15	
Eicosatric acid (20:3)	0.11	0.12	0.09	0.11	0.12	0.15	0.12	0.13	0.14	0.009	0.20	
Erucic acid (22:1)												

^aValues in parentheses indicate length of carbon chain and degree of saturation.

^bFrom our earlier investigations (Csapó, 1984).

^cPooled standard deviation within time.

* For quantitative evaluation, the weight percentage proportions of the methyl esters were regarded as equal to the proportions of the corresponding peaks in the chromatogram (Csapó *et al.*, 1986).

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support of the Hungarian Research Fund (OTKA 1990) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Berezvai, F. & Rákóczi, I. (1996). Újabb adatok a kocatej összetételének változásához a laktáció folyamán. (Further data on changes in sow's milk composition during lactation.) *Magy. Áll. Lapja*, **212**, 448–491.
- Butler, J.E. (1971). Review of the bovine immunoglobulins. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1315–1316.
- Csapó, J. (1982). Gyors módszer élelmiszerek és takarmányok tisztítartalmának meghatározására ioncserés oszlopkromatográfiával. (Fast method for the determination of cystine content of food and feed by ion exchange column chromatography.) *Élelmiszervizsgáló Közlemények*, **4**, 163–172.
- Csapó, J. (1984). Colostrum and Milk Composition of Several Genotypes of Cattle. Ph. D. Thesis. Pannon Agricultural University, Faculty of Animal Science, Kaposvár.
- Csapó, J. & Csapó, Jné. (1986). Takarmányok és élelmiszerek triptofántartalmának meghatározása fotometrián és ioncserés oszlopkromatográfiával. (Determination of tryptophan content of food and feed by ion exchange column chromatography and photometrically.) *Élelmiszervizsgáló Közlemények*, **3**, 150–161.
- Csapó, J., Sugár, L., Horn, A. & Csapó, Jné. (1986). Chemical composition of milk from red deer, roe and fallow deer kept in captivity. *Acta Agronomica Hungarica*, **3–4**, 359–372.
- Csapó, J., Csapó-Kiss, Zs., Martin, T.G., Szentpéteri, J. & Wolf, Gy. (1994). Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *Int. Dairy J.*, **4**, 445–458.
- Csapó-Kiss, Zs., Stefler, J., Martin, T.G., Makray, S. & Csapó, J. (1995a). Composition of mare's colostrum and milk. II. Protein content, amino acid composition and biological value. *Int. Dairy J.*, **5**, 403–415.
- Csapó, J., Stefler, J., Martin, T.G., Makray, S. & Csapó-Kiss, Zs. (1995b). Composition of mare's colostrum and milk. I. Fat content and fatty acid composition. *Int. Dairy J.*, **5**, 393–402.
- Dourmad, J.Y., Etienne, M. & Noblet, J. (1991). A contribution to the study of amino acid requirements for lactation in sows. *J. Recherche Porcine en France*, **23**, 61–68.
- Drochner, W. & Markus, W. (1987). Einsatz hochaufgefetteter Rationen in der Ernährung hochgravider und laktierender Sauen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **94**, 424–426.
- Duee, P.H. & Jung, J. (1973). Amino acid composition of sow's milk. *Annales Zootechnie*, **22**, 243–247.
- Elliott, R.F., van der Noot, G.W., Gilbreath, R.L. & Fisher, H. (1971). Effect of dietary protein level on composition changes in sow colostrum and milk. *J. Anim. Sci.*, **32**, 1128–1137.
- Erlich, P. (1892). Ober Immunität durch Vererbung und Säugung. *Z. Hyg. Infektionskr.*, **12**, 183–185.
- Frenyó, V.L., Pethes, Gy., Antal, T. & Szabó, I. (1981). A sertés kolosztrum- és vérsavó-IgG koncentrációjának változása az idő függvényében. (Change in IgG concentration of colostrum and serum in sows.) *Magy. Áll. Lapja*, **36**, 315–317.
- Gurr, M.I. (1981). Review of the Progress of Dairy Science: Human and artificial milks for infant feeding. *J. Dairy Res.*, **48**, 519–554.
- Hardy, R.N. (1965). The breakdown of ¹³¹I gamma-globulin in the digestive tract of the newborn pig intestine. *J. Physiol.*, **205**, 435–451.
- Hennig, A. & Anke, M. (1966). Die Zusammensetzung der Sauenmilch verschiedener Laktationsstadien. (Rohnährstoffe. Mengenelemente, Spurenelemente). *Archiv für Tierzucht*, **9**, 312–329.

- Inoue, T. (1981). Possible factors influencing the immunoglobulin M concentration in swine colostrum. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1429–1432.
- Jensen, P.T. (1978). Trypsin inhibitor and immunoglobulins in porcine colostrum. *Acta Vet. Scand.*, **19**, 475–477.
- Jensen, P.T. & Pedersen, K.B. (1979). Studies on immunoglobulins and trypsin inhibitor in colostrum and milk from sows and in serum of their piglets. *Acta Vet. Scand.*, **20**, 60–72.
- King, R.H., Rayner, C.J. & Kerr, M. (1993). A note on the amino acid composition of sow's milk. *Anim. Prod.*, **57**, 500–502.
- Kirchgessner, M., Grassmann, E. & Mader, H. (1981). Zum Cu-Gehalt von Sauenmilch bei unterschiedlicher Cu-Versorgung. *Z. Tierphysiol., Tierernähr., u. Futtermittelkde.*, **45**, 261–267.
- Klaver, J., van Kempen, G.J.M., de Lange, P.G.B., Verstegen, M.W.A. & Boer, H.J. (1981). Milk composition and daily yield of different milk components as affected by sow condition and lactation/feeding regimen. *J. Anim. Sci.*, **52**, 1091–1097.
- Klobasa, F., Werhahn, E. & Butler, J.E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Res. Vet. Sci.*, **31**, 195–206.
- Klobasa, F., Butler, J.E., Werhahn, E. & Habe, F. (1986). Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo synthesis by piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **11**, 149–156.
- Klobasa, F. & Farries, E. (1986). Veränderungen des Fettsäurespektrums im Milchfett von Sauen im Verlauf der Laktation. *Milchwissenschaft*, **41**, 146–148.
- Klobasa, F., Werhahn, E. & Butler, J.E. (1987). Composition of sow milk during lactation. *J. Anim. Sci.*, **64**, 1458–1466.
- Kovács, J. (1961). Fehérhússertés szoptatókocák takarmányhasznosítása. (Food utilization of suckling large white sows.) *Mezőgazd. Kiad.*, Budapest, 1–21.
- Kovács, F., Kalich, J. & Sallai, J. (1967). Egyes környezeti tényezők hatása a sertés termelésére és egészségére. III. A colostrum mint környezeti faktor, különös tekintettel a malackori betegségek megelőzésére. (The effect of certain environmental factors on the health and production of pigs. III. The colostrum as an environmental factor with special respect to the prevention of diseases of piglet age.) *Magy. Áll. Lapja*, **22**, 557–560.
- Lecce, J.G., Matrone, G. & Morgan, D.O. (1962). Porcine neonatal nutrition, absorption of unaltered nonporcine proteins, and polyvinylpyrrolidone from gut of piglets and subsequent effects on maturation of serum profile. *J. Nutr.*, **73**, 159–171.
- Lucas, I.A.M. & Lodge, G.A. (1961). The nutrition of the young pig: A review. Technical Communication No. 22. Commonwealth Bureau of Animal Nutrition. Rowett Institute, Bucksburn Aberdeen, Scotland, p. 120.
- Morup, K. & Olesen, E.S. (1976). New method for prediction of protein value from essential amino acid pattern. *Nutr. Rep. Int.*, **13**, 355–365.
- Neuhaus, U. (1961). Die Milchleistung der Sau und die Zusammensetzung und Eigenschaften der Sauenmilch. *Z. Tierz. Züchtungsbiol.*, **75**, 160–167.
- Noblet, J. & Etienne, M. (1986). Effect of energy level in lactating sows on yield and composition of milk and nutrient balance of piglets. *J. Anim. Sci.*, **63**, 1888–1896.
- Ondersheka, K. (1969). Untersuchungen über Menge und Zusammensetzung der Schweinemilch und den Einfluss dieser Faktoren auf das Wachstum Ferkel. *Wien. Tierärztl. Monatsschr.*, **56**, 1–14.
- Payne, L.C. & Marsh, C.L. (1962). Absorption of gamma-globulin by the small intestine. *Federation Proc.*, **103**, 751–756.
- Radeff, T. (1938). Eine Methode zur Bestimmung des Vitamin-C in der Milch. *Milchw. Forsch.*, **19**, 187–192.
- Rerat, A. & Duee, P.H. (1975). Ernährung und Reproduktion der Sau. *Obersichten Tierernähr.*, **3**, 249–258.
- Salmon-Legagnuer, E. (1964). Quelques aspects des relations nutritionnelles entre la gestation et la lactation chez la truie. *Ann. Zootech.*, **14**, 1–12.

- Speer, V.C., Brown, H., Quinn, L. & Catron, D.V. (1959). The cessation of antibody absorption in the young pig. *J. Immunol.*, **83**, 632–634.
- Werhahn, E., Klobasa, F. & Butler, J.E. (1981). Investigation of some factors which influence the absorption of IgG by neonatal piglet. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **2**, 35–51.
- White, C.E., Head, H.H., Bachman, K.C. & Bazer, F.W. (1984). Yield and composition of milk and weight gain of nursing pigs from sows fed diets containing fructose or dextrose. *J. Anim. Sci.*, **59**, 141–150.