

ÉLELMISZERVIZSGÁLATI

K Ö Z L E M É N Y E K

JOURNAL OF FOOD INVESTIGATION

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

LXIX. ÉVFOLYAM 1. SZÁM
VOL. 69, 2023 NO. 1

SCIENCE – LIFE – QUALITY – SAFETY

2023. MÁRCIUS 31.
31 MARCH 2023

Tropán alkaloidok előfordulása élelmiszerekben

Valós és vélt kockázatok

Tropane Alkaloids in Food

Real and Perceived Risks



Tejsavbaktérium-izolátumok vizsgálata • Húsiparban alkalmazott néhány fűszekeverék vizsgálata

• Flexitáriánus, vegetáriánus és vegán étrendek összehasonlítása • Az MTA Élelmiszeranalitikai Bizottságának beszámolója

Evaluation of Lactic Acid Bacteria Isolates •

Investigation of Flavour Mixture Used in Meat

Industry • Comparative Analysis of Flexitarian, Vegetarian, and Vegan Diets • Summary of the

Food Analytical Committee Workshop of the Hungarian Academy of Sciences



www.eviko.hu

Élelmiszervizsgálati Közlemények / Journal of Food Investigation

Kiadó / Publisher: Szegedi Tudományegyetem, 6720 Szeged, Dugonics tér 13. / **HU ISSN 2676-8704**

Felelős kiadó: a Szegedi Tudományegyetem rektora

Főszerkesztő / Editor-in-chief: Dr. SZIGETI Tamás János

Megbízott társfőszerkesztő / Co-editor-in-chief: Prof. Dr. BÁNÁTI Diána

Szerkesztő / Editor: Dr. SZILVÁSSY Blanka Daniella

Szerkesztőbizottság / Editorial Board:

- AMBRUS Árpád Dr. *nyugalmazott egyetemi tanár, Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatal – NÉBIH – főtanácsadó
professor emeritus, National Agency for Food Safety, lead advisor*
- BARNA Sarolta Dr. *igazgató, Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatal – NÉBIH –, elnökhelyettes
director, National Agency for Food Safety, Directorate Of Risk Assessment,
deputy president of the Office*
- BÁNÁTI Diána Prof. Dr. *egyetemi tanár, rektori megbízott, Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar
full professor, special advisor of the rector, University of Szeged Faculty of
Engineering*
- BÉKÉS Ferenc Dr. *a Magyar Tudományos Akadémia külső tagja, nyugalmazott tudományos
osztályvezető, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
(CSIRO), Sydney, Ausztrália, igazgató, FBFD PTY LTD.
external member of the Hungarian Academy of Sciences, retired head of
Scientific Department, Commonwealth Scientific and Industrial Research
Organisation (CSIRO), Sydney, Australia, director, FBFD PTY LTD.*
- BIACS Péter Dr. *nyugalmazott egyetemi tanár, MATE
professor emeritus, MATE*
- BIRÓ György Dr. *nyugalmazott egyetemi tanár, Semmelweis Orvostudományi Egyetem,
Egészségtudományi Kar
professor emeritus, Semmelweis University of Medicine, Faculty of Health
Sciences*
- BOROSS Ferenc Dr. *ügyvezető elnök, EOQ Magyar Nemzeti Bizottság
executive chairman, EOQ Hungarian National Committee*
- CSAPÓ János Dr. *Debreceni Egyetem, ÁTK, Élelmiszertechnológiai Intézet; Sapientia EMTE
Csíkszeredai Kar, Élelmiszertudományi Tanszék
professor emeritus, University of Debrecen*
- FODOR Péter Dr. *nyugalmazott egyetemi tanár, MATE
professor emeritus, MATE*
- GYIMES Ernő Dr. *egyetemi docens Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar
reader, University of Szeged, Faculty of Engineering*
- GYÖRGY Éva Dr. *egyetemi docens, Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai
Kar, Csíkszereda, Élelmiszertudományi Tanszék
reader at Sapientia Hungarian University of Transylvania, Csíkszereda*
- GYŐRI Zoltán Dr. *egyetemi tanár, Debreceni Egyetem
professor emeritus, University of Debrecen*
- KASZA Gyula Dr. *elnöki főtanácsadó, NÉBIH
reader, University of Veterinary Medicine Budapest*
- KOVÁCS Béla Dr. *egyetemi tanár, Debreceni Egyetem
professor, University of Debrecen*
- LUKIN, Aleksandr Dr. *egyetemi tanár Dél-Urali Állami Egyetem, Cseljabinszk, Orosz Föderáció
professor, South-Ural State University Chelyabinsk, Russian Federation*
- MARÁZ Anna Dr. *egyetemi tanár, MATE, Élelmiszertudományi Kar
professor emeritus, MATE*
- MOLNÁR Pál Dr. *elnök, EOQ Magyar Nemzeti Bizottság, egyetemi tanár, Szegedi Egyetem
Mérnöki Kar
president of EOQ HNC, emeritus professor, University of Szeged*
- NAGY Edit *főtitkár, Magyar Víziközmű Szövetség
general secretary, Hungarian Water Utility Association*
- POPOVICS Anett Dr. *egyetemi adjunktus, Óbudai Egyetem, Keleti Károly Gazdasági Kar
reader, Óbuda University*

SALGÓ András Dr.	egyetemi adjunktus, Óbudai Egyetem, Keleti Károly Gazdasági Kar professor emeritus, Budapest Technical University
SIMONNÉ SARKADI Livia Prof. Dr. habil.	egyetemi tanár, MATE Élelmiszertudományi Kar university professor, MATE Faculty of Food Sciences
SIPOS László Dr.	egyetemi docens, MATE, Élelmiszertudományi Kar reader, MATE Faculty of Food Sciences
SOHÁR Pálné Dr.	nyugalmazott főosztályvezető, Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatal retired head of department, National Agency for Food Safety
SZABÓ S. András Dr.	nyugalmazott egyetemi tanár, Budapesti Corvinus Egyetem, Budapesti Ward Mária retired professor of MATE, Budapest Ward Mária School
SZALAY Anna	szabványosító menedzser, Magyar Szabványügyi Testület – MSZT standardization manager, Hungarian Standards Institution (HSI)
SZEITZNÉ SZABÓ Mária Dr.	nyugalmazott igazgatóhelyettes, Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatal – NÉBIH deputy director, National Agency for Food Safety, Directorate of Risk Assessment
SZIGETI Tamás János Dr.	főszerkesztő, tudományos tanácsadó, Bálint Analitika Kft, címzetes főiskolai docens, Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar, címzetes egyetemi docens, Debreceni Egyetem JFI - ÉVIK editor-in-chief, scientific advisor at Bálint Analitika Ltd., honorary reader, University of Szeged, University of Debrecen
SZILVÁSSY Blanka Daniella Dr.	ÉVIK szerkesztő, élelmiszerbiztonsági felügyelő, Nemzeti Élelmiszerlánc- biztonsági Hivatal – NÉBIH –Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság JFI – ÉVIK editor, food safety inspector, National Food Chain Safety Office (NFCISO), Department of Food and Feed Safety
TÖMÖSKÖZI Sándor Dr.	egyetemi docens, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem reader, Budapest University of Technology and Economics
VARGA László Dr.	egyetemi tanár, Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer- tudományi Kar professor, Széchenyi István University, Institution of Food Sciences

Layout: Adworks Kft.

A lap negyedévente, elektronikus formában jelenik meg. / This e-journal is published quarterly.



Az *Élelmiszervizsgálati Közlemények* nyílt hozzáférésű (open access) folyóirat, melynek tartalma jogi védelem alatt áll. A közlemények egésze és minden részlete azonosító adataik pontos megadásával, a szerzőre és a folyóiraatra való hivatkozás mellett használhatók fel. Ha a felhasználó a felhasznált szövegben vagy annak bármely részletében változtatást eszközöl, azt egyértelműen jeleznie kell. A folyóirat tartalma kereskedelmi célokra nem használható fel.

Journal of Food Investigation is an open access journal, its volumes and full contents are freely available upon publication without a fee or restrictions. Earlier volumes are available in the Archive. The full or partial content of published papers are copyright protected and allowed to be referred to or distributed with reference to the title of the journal. If user or distributor makes any changes in any section of the texts published, it must be clearly noted. The content of the Journal is forbidden to be used for commercial purposes.

A szakfolyóiratot a következő figyelőszolgáltatások vették jegyzékbe és referálják / this journal is listed by the following monitoring services: SCOPUS, SCIMAGO, MATARKA / *Hungarian Periodicals Table of Contents*, Magyar Tudományos Akadémia Könyvtár és Információs Központ, Magyar Tudományos Művek Tára / *Hungarian Academy of Sciences, Library of Information Centre, Hungarian Scientific Bibliography Database* / *Publishers International Linking Association Inc. (Crossref (DOI) Registration Agency)*

TARTALOM – CONTENTS

Tropán alkaloidok előfordulása élelmiszerekben - valós és vélt kockázatok (Lugasi Andrea)	4295
<i>Tropane alkaloids in food - real and perceived risks</i> (Andrea Lugasi)	4317
Tejsavbaktérium-izolátumok egyes probiotikus tulajdonságainak <i>in vitro</i> vizsgálata (Süle Judit, Varga László, Hatvan Zoltán, Kerényi Zoltán)	4337
<i>In vitro evaluation of certain probiotic properties of lactic acid bacteria isolates</i> (Judit Süle, László Varga, Zoltán Hatvan, Zoltán Kerényi)	4350
Húsiparban alkalmazott összetett fűszerkeverékek minősége (Natalya Naumova, Aleksandr Lukin, Evgenii Velisevich, Irina Rodionova, Sergey Pirozhinsky, Yulia Eremina)	4364
<i>Identification of Quality of Complex Flavour Mixtures Used in Meat Industry</i> (Natalya Naumova, Aleksandr Lukin, Evgenii Velisevich, Irina Rodionova, Sergey Pirozhinsky, Yulia Eremina)	4369
A flexitáriánus, vegetáriánus és vegán étrendek összehasonlító elemzése (Molnár Judit, Vasas Dávid, Mukhtar Ahmed)	4374
<i>Comparative Analysis of Flexitarian, Vegetarian and Vegan Diets: A Review</i> (Judit Molnár, Dávid Vasas, Mukhtar Ahmed)	4382
Az MTA Élelmiszervizsgáló Bizottságának beszámolója	4390
<i>Summary of the Food Analytical Committee Workshop of the Hungarian Academy of Sciences</i>	4392

ISSN 0422-9576



LUGASI Andrea¹DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2023/1-1-HUN>

Érkezett: 2022. augusztus – Elfogadva: 2022. november

Tropán alkaloidok előfordulása élelmiszerekben – valós és vélt kockázatok

Kulcsszavak: atropin, szkopolamin, antikolinerg hatás, antimuszkarinerg vegyületek, élettani hatás, humán expozíció, kokain, antidótumok, RASFF-riasztás, biotermékek gyommag-szennyezettsége

1. Összefoglalás

A tropán alkaloidok számos növény családban előfordulnak, toxikus hatásuk következtében dózistól függően enyhe tüneteket, de akár halált is okozhatnak. Az emberi szervezetbe leggyakrabban szennyeződés, tévesztés vagy bódító hatásuk miatti szándékos visszaélés következtében kerülnek. Gabonafélék, hüvelyesek, egyéb szemes termények, de különösen a vegyszermentes termelésű biotermékek nem megfelelő tisztítása következtében általános közfogyasztásra szánt élelmiszerekben előfordulnak, esetenként dokumentált mérgezést okoznak. A 2021-ben megjelent európai uniós szabályozás a növényi alapanyagok viszonylag széles körére határozza meg a tropán alkaloidok megengedhető mértékét, így a rendelet következetes betartásával elérhető lesz a tropán alkaloid szennyeződésből eredő élelmiszerbiztonsági kockázat csökkenése, mindamelllett, hogy az utóbbi évek élelmiszer-eredetű mérgezéssel esetei felhívják a figyelmet a szabályozás alá eső élelmi anyagok köre bővítésének szükségességére.

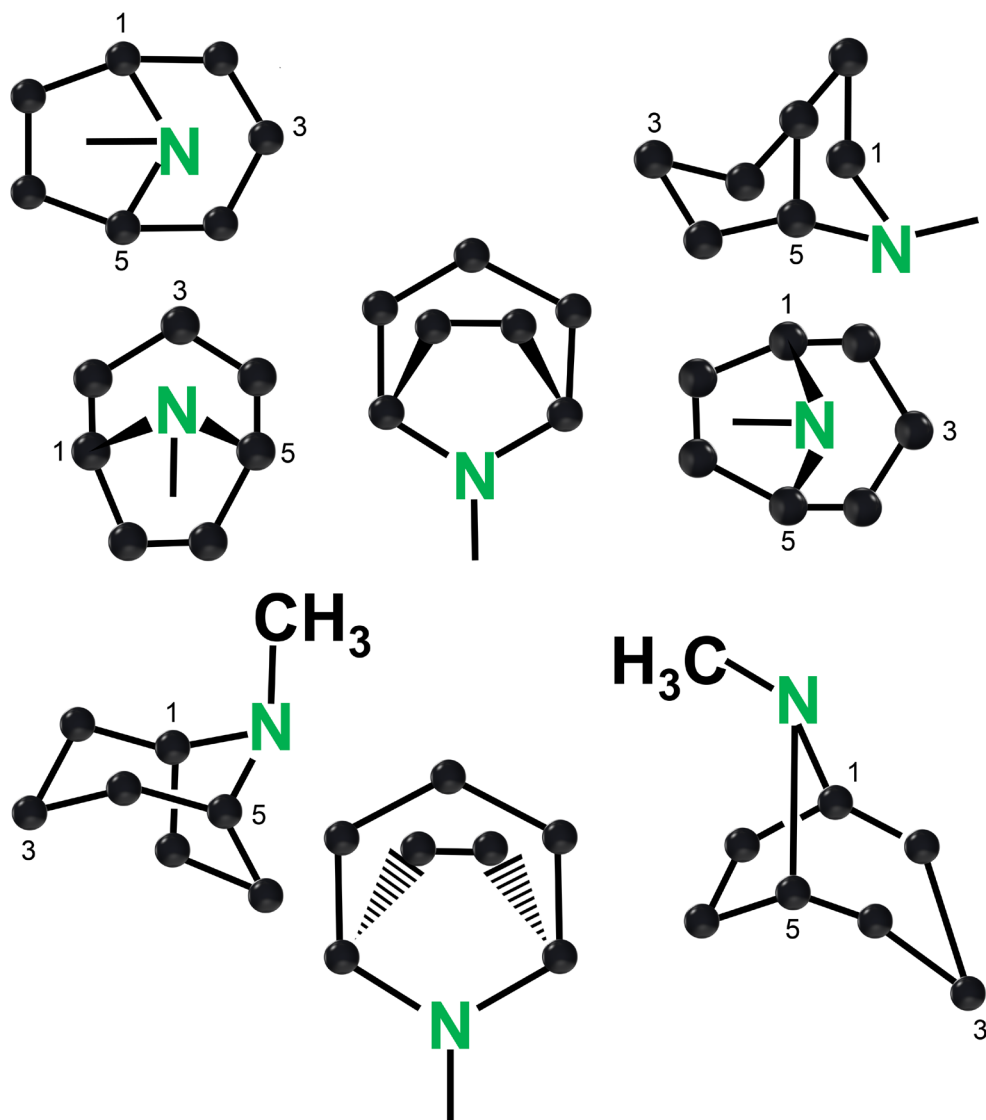
¹ Budapesti Gazdasági Egyetem

2. Bevezetés

A tropán alkaloidok a növényvilágban gyakran előforduló másodlagos metabolitok. Élelmiszerbiztonsági kockázatuk az utóbbi néhány évben került előtérbe, elsősorban élelmiszerek véletlen szennyeződésekből adódó veszély kapcsán. Különösen a vegyszermentes technológiával termesztett termények jelenthetnek élelmiszerbiztonsági kockázatot, mivel a gyomirtók használatának tiltása miatt a tropán alkaloidokat tartalmazó gyomnövények elszaporodhatnak és különböző részeik, de elsősorban a magvak belekerülhetnek a hasznos termékbe, akut mérgezést okozó szennyeződést eredményezve. Az utóbbi években a hazai piacon is találtak szennyezett élelmiszereket, illetve előfordult tropán alkaloidoknak tulajdonított, élelmiszer eredetű mérgezés, ez utóbbi a kereskedelmi vendéglátás területén jelent meg. Így a kockázat a végső fogyasztót az előrecsomagolt élelmiszereken és a vendéglátáson keresztül egyaránt érintheti. A tropán alkaloidra vonatkozó, Közösségi szintű szabályozás szükségessége az elmúlt egy - másfél évtized mérgezései okán előtérbe került, és így bizakodásra adhat okot a közelmúltban megjelent európai uniós szabályozás, melynek következetes alkalmazása elegendő védelmet tud biztosítani a fogyasztónak.

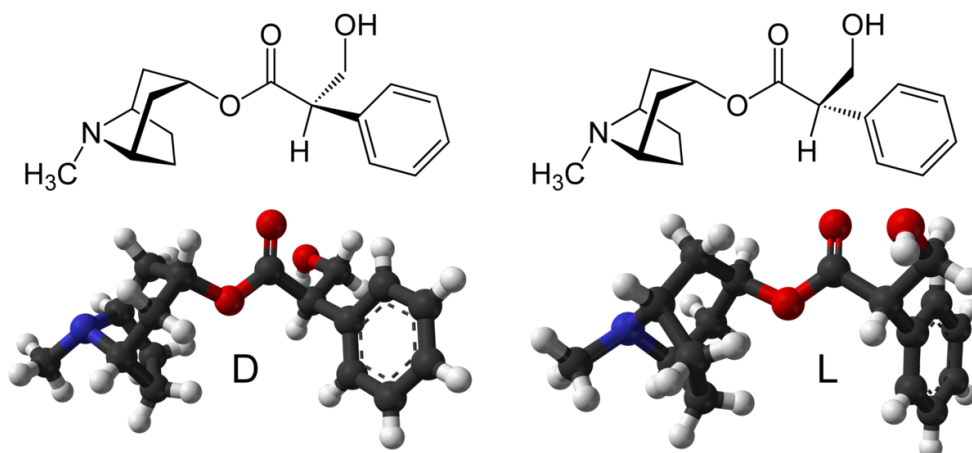
3. Kémiai szerkezet, előfordulás

A tropán alkaloidokra az azabicyclo[3.2.1]oktán gyűrűs szerkezet (bicyklus amin, amelyben egy pirrolidin és egy piperidin gyűrű, egy N és két C atomon osztozik) jellemző (1. ábra). Az aminocsoport, az alkaloidokra jellemző módon a legtöbbször metilált [1].



1. ábra. A tropán alkaloidok (1*R*, 5*S*)-8-metil-8-azabicyclo [3.2.1] oktán szerkezete [1]

A tropán alkaloidok alatt mintegy 200 különböző molekulát értünk, melyek között mono-, di- és triészterek, valamint karboxilált és benzoilált vegyületek is megtalálhatók [2, 3]. Legjelentősebb és a leggyakrabban előfordulók tropán alkaloidok azonban az atropin és a szkopolamin. Az atropin valójában a D-hioszciamin és L-hioszciamin racém keveréke (2. ábra) [4], a későbbiekben bemutatásra kerülő élettani hatásokért (antikolinerg hatás) döntő részben az L-hioszciamin tehető felelőssé [5].



2. ábra. A D- és L-hioszciamin szerkezete [4]

Az atropin – dózistól függően – potenciálisan halálos mérgező, nevét Atroposzról (Kérlelhetetlen), a Moirák (Sors istennői) egyikéről kapta, aki ollójával elvágja az élet fonálát a görög mitológiában és így ő dönti el, ki fog meghalni (3. ábra) [6, 7]. Az atropin a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben Atropinum néven szerepel.



3. ábra. Giorgio Ghisi: A három Sors, Clotho, Lachesis és Atropos [7]

A tropán alkaloidok különböző növény családban fordulnak elő, mint a *Brassicaceae* (*Cruciferae*) („mustár” család), *Convolvulaceae* („szulák” család), *Erythroxylaceae* („koka” család), *Euphorbiaceae* („kutyatej” család), *Olacaceae*, *Proteaceae*, és *Rhizophoraceae* („mangrove” család), de legjellemzőbbek a *Solanaceae* („nightsade” vagy „burgonya”) családban [2]. Ez utóbbi növény családban mintegy 100 nemzetséget és 3000 fajt foglal magában. Különösen a *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Scopolia*, *Anisodus*, *Przewalskia*, *Atropanthe*, *Physochlaina*, *Mandragora*, *Anthotroche*, *Cyphantera*, és *Duboisia* nemzetség gazdagok tropán alkaloidokban [2]. A *Solanaceae* család ismert tagjai a mandragóra, beléndek, nadragulya, csattanó maszlag és ehető rokonaik, a burgonya, paradicsom, a tojásgyümölcs (padlizsán). A tropán alkaloidok legnagyobb változatosságban a *Datura* és a *Brugmansia* nemzetségben fordulnak elő. Az ismertebb, tropán alkaloidokat tartalmazó növényeket, a bennük található komponenseket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. Tropán alkaloidokat tartalmazó növények, növényi részek Adamse és mtsai. alapján [8]

Növény			Tropán alkaloid (TA) vegyület	TA-t tartalmazó növényi rész
Botanikai név	Magyar név	Angol név		
<i>Atropa belladonna</i>	Nadragulya	Deadly nightshade	Szkopolamin, hioszciamin, atropin, kalistegin	Bogyó, levél, gyökér
<i>Datura stramonium</i>	Csattanó maszlag	Jimsonweed, thornapple	Szkopolamin, hioszciamin, atropin	Levél, gyökér, mag, virág
<i>Datura suaveolens</i> (<i>Brugmansia suaveolens</i>)	Angyaltrombita	Angel's tears, snowy angel's trumpet	Szkopolamin, hioszciamin	Levél, virág, mag
<i>Datura tatula</i>	Métel	Jimsonweed, thornapple	Atropin	Levél, virág, mag
<i>Duboisia myopoides</i>	Parafa	Corkwood	Szkopolamin, atropin	Levél
<i>Hyoscyamus niger</i>	Bolondító beléndek	Henbane, black henbane, stinking nightshade	Szkopolamin, hioszciamin, atropin, kalistegin	Levél, virág, mag
<i>Lycium barbarum</i>	Közönséges ördögcérna	Wolfberry, goji berry	Atropin	bogyó (termés)
<i>Mandragora officinarum</i>	Mandragóra	Mandrake	Szkopolamin, hioszciamin, atropin	Gyökér, termés
<i>Calystegia sepium</i>	Sövényszulák	Hedge false bindweed	Kalistegin	Levél, gyökér
<i>Convolvulus arvensis</i>	Apró szulák, mezei szulák	Field bindweed	Kalistegin	Levél, gyökér
<i>Physalis alkekengi</i>	Lampionvirág, páponya	Bladder cherry, Chinese lantern, etc.	Kalistegin	Levél
<i>Physalis peruviana</i>	Perui földicseresznye, poha, zsidócseresznye	Cape gooseberry, goldenberry	Tigloidin, szekotropán alkaloidok	Gyökér
<i>Erythroxylum coca</i>	Kokacserje	Coca	Számos alkaloid, köztük kokain	Levél

A tropán alkaloidokat tartalmazó, előzőekben bemutatott növényfajok egy része akár élelmiszerként is fogyasztható, például a *Brassicaceae* (*Cruciferae*) és a *Solanaceae* családok tagjai, de humán expozícióval mégsem kell számolni, mivel az ember által fogyasztott növényi részek, például a burgonya gyökérgumója, vagy a paradicsom termése, nem tartalmaznak tropán alkaloidokat. Ugyanakkor a különböző növényi szövetekben tropán alkaloidokat nagy mennyiségben tartalmazó növények szinte mindegyike gyomnövényként fellelhető természetben, vagy szabadon termő, de fogyasztható növények környezetében, ezért a belőlük származó tropán alkaloidok expozíció leggyakrabban véletlenszerű fogyasztásból adódik [8]. A **2. táblázat** a leggyakoribb, tropán alkaloidokat tartalmazó gyomnövények, többek között a *Datura stramonium* és az *Atropa belladonna* alkaloidtartalmát mutatja be a különböző növényi részekben.

2. táblázat. Különböző növényfajok és növényi részek tropán alkaloidtartalma (mg/kg szárazanyag)

Faj (származási hely)	Növényi rész	(-)-Hioszciamin	(-)-Szkopolamin	Összes tropán alkaloid	Hivatkozás
<i>D. stramonium</i> (USA)	Mag	1690-2710	360-690	2050-3400	[9]
<i>D. stramonium</i> (Olaszország)	gyökér	nd121	nd-14	Nd-135	[10]
	hajtás	1-915	Nd-129	1-1044	
	levél	134-831	16-73	172-378	
	virág	270-299	66-106	336-405	
	mag	170-387	12-89	182-476	
<i>D. stramonium</i> (kül. variánsok)	levél	425-1655	230-715	1000-1855	[11]
	mag	710-1380	520-1275	1235-2655	
<i>D. stramonium</i> (Olaszország)	mag	1280	680	1960	[12]
<i>D. stramonium</i> (var. <i>tutala</i> is) (Magyarország)	hajtás	360-5910	20-3320	380-8830	[13]
	levél	430-4710	130-1790	560-6430	
	virág	1690-3970	1360-2740	3050-6710	
<i>D. ferox</i> (Argentina)	gyökér		36-900		[14]
	hajtás		29-200		
	levél	x	40-3200	x	
	termés		130-210		
	mag		1500		
<i>D. ferox</i> (Argentina)	mag	nd	610-820	610-820	[15]
<i>A. belladonna</i> (Németország)	gyökér	5290	51		[16]
	levél	2500-9200	20-280	x	
<i>A. belladonna</i> (Európa)	gyökér	500-3700	nd-900	500-4000	[17]
	levél	500-4900	nd-500	700-5100	
	mag	1200-6900	nd-500	1300-7300	
<i>A. belladonna</i> (Németország)	gyökér	3700	100		[18]
	hajtás	1800-3900	70-130	x	
	levél	960-1400	90-130		
	termés+mag	2800-9200			
<i>A. belladonna</i> (Irán)	gyökér	570-880	17-31		[19]
	levél	740-770	28-180	x	
	hajtás	190-1200	23-470		

Faj (származási hely)	Növényi rész	(-)-Hioszciamin	(-)-Szkopolamin	Összes tropán alkaloid	Hivatkozás
<i>A. acuminata</i> (Iran)	levél	900-1200	140-470	x	[19]
<i>A. baetica</i> (Spanyolország)	gyökér	1000-10000	600	x	[20]
<i>H. niger</i> (Bulgária)	mag	140	430	570	[21]

nd: Kimutatási határ alatt (nem detektálható)

x: Nem áll rendelkezésre adat

4. Élettani hatások

A tropán alkaloidok antimuszkarinerg vegyületek, blokkolják a hörgőkben a simaizomzat, a mirigyek és az idegvégződések muszkarin-receptorait, gátolják az izom-összehúzódást, a váladéktermelődést és fokozzák a neuro-transzmitterek felszabadulását. A tropán alkaloidok paraszimpatikus idegrendszer-bénítók, befolyásolják a szív- és légzés-frekvenciát, simaizom-görcsoldók, csökkentik a nyál-, gyomornedv- és fehérjeszekréciót. 3,0-8,0 mg dózisban izgatják a központi idegrendszert, azonban 10 mg fölött bénítják annak működését. A vegyületekre jellemző, hogy a nyálkahártyán át gyorsan és maradéktalanul képesek felszívódni [22].

Az atropin humán élettani hatása a dózis függvényében nagyon eltérő. A vegyület 0,5 mg felvétele enyhe szívritmus-lassulást, gyenge szájszárazságot okoz, gátolja a veríték kiválasztását. Egy 1,0 mg-os mennyiség már erőteljesebb szájszárazságot, szomjúságérzetet, gyors szívritmust, pupillatágulást vált ki. 2,0 mg mennyiségnél gyors szívritmus, palpitáció, kitágult pupillák, elmosódott látás jelentkezik. 5,0 mg bevitel esetén az előző tünetek mellett gátolt beszéd, nyugtalanság, fejfájás, száraz, forró bőr tapasztalható. 10,0 mg feletti mennyiség szervezetbe jutása esetén a fenti tünetek mellett gyors és gyenge pulzus, homályos látás, bőrkipirosodás, ataxia, hallucináció, delírium, végül kómás állapot következhet be [23].

Az atropin mérgezés elsődleges tünetei a tág pupillák, a gátolt nyáltermelés, a hipertermia, a csökkent légzésszám és szívfrekvencia. A hatások a központi idegrendszert is érintik, álmoság, depresszió is megjelenhet. A mérgezési folyamat végső kimenetele keringési elégtelenség, kóma. Az egyedi érzékenység igen változó, a letális dózis: 100-1000 mg, gyerekeknél 10 mg. A szkopolamin mérgezés ugyancsak tág pupillákat, a nyáltermelés gátlását eredményezi, kisdózisnál a szívfrekvencia csökkenését, nagyobb dózisnál azonban annak növekedését okozza. A központi idegrendszerre gyakorolt hatása az atropinéval ellentétes, azaz stimulálja azt. A szkopolamin letális dózisa 100 mg, amely légzésbénulást, majd ebből származó halált okoz [24].

A mérgezés egyszeri expozícióra is bekövetkezik, lappangási ideje 6 órán belül, az expozíció módja leggyakrabban orális, de inhaláció is előfordul. A tropán-alkaloidok a gyomor-bélcsatornán át felszívódnak [25]. A toxikus hatások gyakran már 60 percen belül jelentkeznek a lenyelést követően, és a szubletális klinikai tünetek akár 24-48 órán keresztül is fennállhatnak [26]. Kezelés nélkül gyerekek esetében 2-5, felnőtteknél 10-20 nadragulya bogyó (mag) elfogyasztása halálos. A csattanó maszlag mérgezés 60 perccel az elfogyasztás után már észlelhető. A klinikai tünetek 24-48 órán keresztül fennmaradnak. Egy csattanó maszlag mag tömege kb. 8 mg, így mintegy 100 mag 10 mg atropinnal egyenértékű [27].

Az akut terápia az azonnali dekontamináció (gyomormosás, bélmosás, beöntés), de a mérgezést követően akár 12 óra múlva is. Mérgezés esetén az antidótum a physostigmin (0,02 mg/testtömeg kg), amelyet annak jelentős kardiális mellékhatásai miatt csak nagy óvatossággal szabad alkalmazni [28]. Tüneti, szupportív kezelésként a fizikális hűtés, szedálás, folyadékpótlás, béta-blokkoló beadása, katéterezés jöhet szóba. Elsősegélynyújtáskor

elsődleges a mérreg felszívódásának megakadályozása hánytatással, hashajtással vagy aktív szén adásával, a szomjúság csökkentése folyadékbevitellel, a testhő csökkenése jeges borogatással [29].

5. Tények és érdekességek a tropán alkaloidokról

Több mint 520 tropánvázis vegyület rendelkezik CAS számmal. A tropán CAS regisztrációs száma 529-17-9 [30]. A CAS adatbázisban a kokain 50-36-2 volt az első regisztrált tropán származék, a tesofensin (402856-42-2) az utolsó [31, 32]. A legtöbb természetben fellelhető tropán származék természetes deliriáns. A "Bella donna" (*Atropa belladonna*) kifejezés „szép hölgy”-et jelent, a reneszánsz időkben kapta nevét, mivel a hölgyek gyakran csepegtettek a szemükbe az *A. belladonna* atropint tartalmazó terméséből nyert léből, mely kitágította a pupillájukat és ezzel szépnek hatottak [33]. 1910-es és az 1960-as évek között a szkopolamin és a morfin keverékét a szülés közben altatószerként (félálomszerű állapot előidézésére) használták. A vegyületkeverék beadása egy átmeneti állapotot idézett elő, amely alatt az szülő nő félig éber állapotba került a szülés alatt, és a szülési folyamat kiesett az emlékezetéből [34].

A csattanó maszlag a jimson weed nevet onnan kapta, hogy 1676-ban az USA-beli Jamestown-ban brit katonák mérgeződtek meg növényi saláta fogyasztásakor, a tünetek 11 napon keresztül delírium és hallucináció voltak [35].

A szintetikus gyógyszerek egyike a homatropin volt, ami egy félszintetikus észter, Ladenburg szintetizálta, és a E. Merck Company hozta forgalomba 1883-ban, mint a pupillatágító [36]. A legismertebb tropán származék a kokain, amelyet Krisztus előtt 3000 óta gyógyszerként és narkotikumként is alkalmaznak. Kokaintartalmú termék volt például a fogfájás elleni pasztilla [37], vagy French Tonic Wine [38] [39] (4-5. ábra). A Coca-Cola a másik népszerű ital, mely kokacserje kokainmentes kivonatát tartalmazza. A kezdetekben a Coca Cola ital



4. ábra. Kokaintartalmú fogfájás elleni pasztilla reklámja 1885-ből [37]



5. ábra. Jules Chéret, Vin Mariani. Népszerű francia tonic..., 1894. Litográfiai plakát, kiadó: Imprimerie Chaix; 123 × 86,3 cm. [38, 39]



6. ábra. A Coca Cola hirdetése 1902-ből [41]

tartalmazott kokaint, a kokain-mentes változatot a Pure Food & Drug (USA) törvény bevezetése után, 1906-ban jelent meg [40]. A **6. ábrán** a Coca-Cola hirdetése látható 1902-ből [41].

A tropán alkaloidok és a kokain szerkezetét Richard Martin Willstätter (1872-1942) írta le. 1903-ban találta meg a tropánszintézis útját, felfedezése alapvető fontosságú mérföldkőnek számít a szerves kémiában. Willstätter 1915-ben kémiai Nobel díjat is nyert, elsősorban a klorofill és egyéb növényi pigmentek szerkezetének felfedezéséért [42].

A tropán származékok a gazdasági szempontból legjelentősebb farmakonok közé tartoznak [43]. A gyógyszeripar több mint húsz tropánvázis aktív gyógyszerhatóanyagot állít elő, melyek felhasználási területe szereteágazó: pupillatágítók, hányinger-csillapítók, görcsoldók, fájdalomcsillapítók, hörgőtágító hatásúak [5]. Az L-hioszciamin peptikus fekély, irritábilis bélszindróma, ill. Parkinson kór esetén használatos, a kokain helyi fájdalomcsillapító, a tiotropium-bromid a COPD ellenszere, az ipatropium-bromidot asztma esetén alkalmazzák [8].

6. Tropán alkaloidok felhasználása, alkalmazása, szándékos és véletlen fogyasztása

A tropán alkaloidok, elsősorban az atropin, gyógyszerként hivatalos a VII. Európai Gyógyszerkönyvben (VII. Ph. Eur.), terápiás alkalmazása szereteágazó, ez a pupillatágulástól az émelygésen át, az utazási betegség, a bélgörcsök, a bradikardia, egyéb szív- és légzőszervi betegségek kezeléséig terjed [44]. Az atropint a hagyományos kínai orvoslásban ajánlják az ízületi gyulladás kezelésére [45].

Az atropint népi gyógyászatban az idegzsába, reuma enyhítésére, görcsoldásra használják, asztmacigaretában (inhaláció) hörgőgörcsök és a nyálképződés csökkentésére alkalmazzák [46], de a túlادagolás lehetősége miatt háziszerként történő használata veszélyes lehet. Hallucinogén hatása miatt kábítószerként is használatos [46].

Nem szándékos használat, szennyeződés esetén mérgezés előfordulhat, tévesztés vagy carry-over hatás, vagy szándékos bevitel, növényi anyag abúzus (túlادagolás) következtében. A szennyeződés elsősorban ehető növények termesztése, betakarítása során következik be, amikor a hasznos növényállományban nagymennyiségben jelennek meg tropán alkaloidokat tartalmazó gyomnövények, elsősorban *Datura stramonis*, *Atropa belladonna*, *Hyosciamus niger*.

Ömlesztett formában forgalmazott kereskedelmi magvak, a szója és egyéb hüvelyesek, gabonák és álgabonák (búza, kukorica, cirok, köles, hajdina), napraforgó, lenmag szennyeződhet csattanó maszlag, angyaltrombita vagy beléndek magjával. Ezek a gyomnövények a szemestakarmányokkal együtt érnek és a betakarításkor kerülnek a takarmányba. A gyommagvak méretükben, alakjukban és színükben hasonlítanak a hasznos termények magvaihoz, így nehezen távolíthatók el válogatás vagy tisztítás útján. Az ilyen típusú szennyeződések súlyos mérgezésekhez is vezethetnek. Például Ugandában 2019-ben a humanitárius élelmiszersegély (kukoricából és szójából álló Super Cereal néven ismert termék) volt szennyezett csattanó maszlagból származó tropán alkaloidokkal, ennek elfogyasztása miatt 300 fő szorult kórházi kezelésre és öt halálesetet okozott [47].

Az emberi táplálkozás szempontjából különösen fontosak a szennyezett gabonafélék, álgabonák, hüvelyesek, mert ezek az élelmiszerek szinte valamennyi korosztály étrendjének részét képezik. A tropán alkaloidok előfordulásával kapcsolatban az egyik legtöbbet vizsgált álgabona a hajdina volt (*Fagopyron esculentum* L.), ami gazdag polifenolokban, vitaminokban és fehérjékben, ezen túlmenően gluténmentes is. Az egyéb gluténmentes termények, mint az amaránt, a csicseriborsó, a borsó, kukorica, rizs, köles, a quinoa és a belőlük készült termékek, kenyerek, péksütemények, tészták, cukrászsütemények, snackek egyre népszerűbbek nem csak a gluténérzékenyek, hanem az egészségükre jobban ügyelő fogyasztók körében is. Emiatt egyre fontosabbá válik az ezekben a terményekben, termékekben jelen lévő tropán alkaloidok előfordulásának gondos ellenőrzésének szükségessége. A szakirodalomban számos publikáció található, melyek az ilyen alapanyagok tropán alkaloid szennyezettségét jellemzik, ezek közül néhányat mutat be a **3. táblázat**.

3. táblázat Élelmiszerek tropánalkaloid-szennyezettsége Gonzales-Gómez és mtsai nyomán [48]

Minta (mintaszám)	Atropin-tartalmú minták (mennyiség)	Szkopolamin-tartalmú minták (mennyiség)	Hivatkozás
Reggeli gabona, reggeli gabona tejjel, keksz, sütemény (113 minta)	21 reggeli gabona (0,09–65,6 µg/kg)	18 reggeli gabona (0,28–15,2 µg/kg)	[49]
Lisztek (hajdina, köles, kukorica), gabonalapú ételek gyerekeknek, reggeli gabonák, kekszek, cukrászsütemények, péksütemények, tészták, kenyerek, hüvelyesek sütőolaj keverékek, olajos magvak (1305 minta)	46 liszt (0,5–149 µg/kg), 42 gabonalapú étel gyerekeknek (0,5–3,73 µg/kg), 15 reggeli gabona (0,5–90,83 µg/kg), 24 keksz és cukrászsütemény (0,5–1,85 µg/kg), 18 kenyér (0,5–3,80 µg/kg), 20 hüvelyes, sütőolaj keverék, olajosmag (0,5–0,11 µg/kg)	46 liszt (0,5–199 µg/kg), 42 gabonalapú étel gyerekeknek (0,5–1,86 µg/kg), 15 reggeli gabona (0,5–17,64 µg/kg), 24 keksz és cukrászsütemény (0,5–0,65 µg/kg), 18 kenyér (0,5–0,36 µg/kg), 20 hüvelyes, sütőolaj keverék, olajosmag (0,5–0,09 µg/kg)	[50]
Hajdina, hajdinaliszt és tészta; szója és szójaliszt; hántolt köles és kölesliszt; lenmag és lenmagliszt (15 minta)	1 hajdina (<1 µg/kg) 1 kölesliszt (13 µg/kg)	1 hajdina (<2 µg/kg) 1 kölesliszt (23 µg/kg)	[51]
Bio hajdina liszt, tészta és péksütemény (26 minta)	1 liszt (83,9 µg/kg) 1 tészta (21,3 µg/kg) 1 péksütemény (13,9 µg/kg)	1 liszt (10,4 µg/kg) 1 tészta (5,7 µg/kg)	[52]
gabonalapú ételek gyerekeknek (keksz, snack, grissini) (18 minta)	1 keksz (11,5 µg/kg)	1 keksz (2,8 µg/kg)	[53]
Búza, kukorica, rizs, zab és köles liszt, kevert gabonalisztek, gabonatermékek csecsemőknek, gabonaalapú termékek (95 minta)	1 paradicsomos rizspehely (9,6 µg/kg)	1 paradicsomos rizspehely (2,6 µg/kg)	[54]
Hajdina és hajdina liszt, quinoa, amarant, teff liszt, finomított kukoricaliszt, kukoricaliszt, kék kukoricaliszt, cirokliszt, hántolt köles, zöld és vörös lencse liszt, csicseriborsó-liszt, borsóliszt (15 minta)	3 hajdina mag és liszt (6,7–21 µg/kg), 1 quinoa (7,1 µg/kg), 1 teff liszt (78 µg/kg), 1 finomított kukoricaliszt (7 µg/kg), 1 cirokliszt (15 µg/kg), 1 hántolt köles (6,9 µg/kg)	1 of teff liszt (28 µg/kg)	[55]
Zöld tea, fekete tea, kamilla, édeskömény, citromfű, borsmenta, rooibos (70 minta)	1 édeskömény (83 µg/kg) 8 borsmenta (20–208 µg/kg)	1 édeskömény (11 µg/kg) 8 borsmenta (20–208 µg/kg) 1 kamilla (2,1 µg/kg) 1 of rooibos (2 µg/kg)	[56]
Szárított gyógynövények (teához) (121 minta)	85 szárított gyógynövény (0,0067–295 µg/kg)	85 szárított gyógynövény (0,0067–134 µg/kg)	[55]
Kakukkfű, bazsalikom, koriander (16 minta)	5 kakukkfű (<5–5,7 µg/kg) 5 bazsalikom (9–11,7 µg/kg) 4 koriander (9,9–42 µg/kg)	2 kakukkfű (<5 µg/kg) 1 koriander (34 µg/kg)	[57]

Gyakran előforduló mérgezés származik – különösen gyerekek esetén – a hibásan azonosított növény elfogyasztásából, például nadragulyatermését (bogyót) fekete áfonya termésével téveszthetik össze. Leírták *Atropa belladonna* téves használatát mályvalevéllel (*Malva silvestris*), *Datura stramonium* levelének téves beazonosítását teaként történő használat esetén, szintén csalánnal, mályvalevéllel, *Symphytum officinale*-val, csattanó maszlag gyökerének használatát *Arcticum lappa* helyett tradicionális használatban vértisztító, vízajtó, bőrtisztító tea főzetként, zöldsalátaként *Datura* virágát használták *Paulownia* (foxxglove tree) helyett [8, 58]. Szennyeződéssel, tévesztéssel vagy szándékos túladagolással összefüggő mérgezéses esetek kiváló összefoglalói olvashatók többek között Adamse és szerzőtársai 2010-es és 2014-es közleményeiben [8, 58].

Állati takarmány szennyeződéséből származó tropán alkaloidok jelenléte állati eredetű élelmiszerekben (tej, tojás, hús) carry-over bevittel lehetséges. Nyers takarmány esetén ennek jelentősége és lehetősége erősen korlátozott, mivel az állatok megtagadják a tropán alkaloidokkal szennyezett takarmány fogyasztását, a gyomnövény jellegzetes és kellemetlen íze és illata miatt, azonban szárított takarmánykeverék esetén a gyommagvak jelenlétét már nem fedezik fel, így az ebből származó expozíció lehetséges. A tropán alkaloidok nem érzékenyek a hőkezelésre, szárításra, *Datura* maggal szennyezett lisztből készült kenyér sütését követően a toxin 72-100%-a kimutatható a termékben [9], így érthető, hogy mennyisége a szárított takarmányban is számottevő lehet. Szárított takarmánykeverék esetén azonban a száraz *Datura* mag jelenléte súlyos mérgezést, tömeges elhullást is okozhat haszonállatoknál, különösen a sertések érzékenyek a toxinra [59]. Egy 'worst case exposure' becslés szerint a 3000 mg/kg *Datura ferox* mag bevitel a takarmányban a 2002/32/EU irányelv szerint malacokban súlyos mellékhatást okozhat [60]. Ugyanakkor a tropán alkaloidok felszívódása és lebomlása, kiürülése meglehetősen gyors folyamat, a szövetekben, szövetekben nem raktározódnak, így gazdasági állatok hújának fogyasztása esetén humán mérgezéssel nem kell számolni [59].

A mérgezés másik esete a szándékos használatból, ill. a túladagolásból származik, részben a hallucinogén hatás miatti kábítószerként történő alkalmazáskor, vagy terápiás célú felhasználás (arthritis kezelésére, érzéstelenítésre) esetén. A szándékos mérgezés patológiás esete a gyilkosság, vagy öngyilkosság. Bizonyos esetekben az atropin antidótumként is használatos organofoszfát mérgezés esetén [61].

Sajnálatos módon, hazai vizsgálati eredmények élelmiszerek tropán alkaloid szennyeződésére és ebből eredő mérgezésekre vonatkozóan nem érhetőek el, azonban véletlenszerű vagy szándékos mérgezéses adatok fellelhetők a Magyar Toxikológiai Információs Szolgálat által gyűjtött adatok alapján [62]. Ezek szerint a *Brugmansia* és *Datura* fajok voltak leggyakoribbak a magyarországi növénymérgezések során. Egy, 2005 és 2017 közötti felmérés szerint a rendszeresen mérgezéseket okozó növényi taxonok között a *Brugmansia* fajok 1-7%-t, a *Datura* fajok 1-16%-ot, a *Convallaria majalis* 6-20%-ot, a *Taxus baccata* 8-19%-ot tettek ki.

7. Élelmiszeripari feldolgozás hatása a tropán alkaloidokra

A tropán alkaloidok viszonylag hőstabilak. List és Spencer vizsgálatai szerint a szójabab feldolgozása során a szennyeződésként jelenlévő hiosziamin és a szkopolamin mennyisége is csökkent, az előbbinek 90%, az utóbbinak 84%-a maradt meg a **zsírtalanított szójalisztben. A finomítatlan szójaolajban az eredeti alkaloidmennyiség kb. 0,1% volt jelen, és ennek is több mint 90%-a elveszett az olaj lúgos finomítása és mosása következtében [63].** Csattanó maszlag magvakkal szennyezett búzából készült kenyér sütése során a hőkezelés 0-28%-kal csökkentette a tropán alkaloidok koncentrációját [9]. Tropán alkaloidokkal szennyezett hajdinalisztból készült žganci (kása-szerű étel) főzése során az atropin és a szkopolamin koncentrációja 60, illetve 40%-kal csökkent [64].

Marín-Sáez és mtsai hajdina- és köleslisztek *Datura stramoniummal* és *Brugmansia arborea*-val szennyezett mintáit vizsgálták, a lisztek kelesztési (37 °C) és sütési (190 °C) folyamatoknak vetették alá [65]. A kelesztés során a tropán alkaloidok koncentrációja csökkent (13-95% lebomlás), míg a sütési körülmények között szinte teljesen eltűnnek (94-100% lebomlás). Ugyancsak Marín-Sáez kutatócsoportja vizsgálta tropán alkaloidok lebomlását tésztaból és zöld teából [66]. A tésztát 100 °C-on 10 percig forrázták, a teát 100 °C-os vízzel készítették, majd 5 percig hűlni hagyták. A tésztát és a zöld teát *Datura stramonium* és *Brugmansia*

arborea magvakkal szennyezték, míg a kokalevél teát közvetlenül elemezték. A lebomlási vizsgálatok azt mutatták, hogy a tropán alkaloidok koncentrációja csökkent, és ez függött a vegyülettől, a legnagyobb mértékű degradáció a tropinon, tropán, a kuskohigrin (cuscohygrine) és a tropin vegyületek esetében volt kimutatható, de azt is megfigyelték, hogy a főzési során a vegyületek a vizes fázisba vándoroltak [66].

A legfrissebb tanulmány csattanó maszlaggal szennyezett, kukoricalisztból készült, gluténmentes kenyérrudacsok tropán alkaloid-tartalmáról számol be. A termikus lebomlási vizsgálatok a tropán alkaloidok mennyiségének csökkenését mutatták sütés közben (180 °C, 20 perc), ami - az alkalmazott előkészítési körülményektől függően - az atropinnál 7-65%, a szkopolamin és az anizodamin 35-49% a esetében volt [67].

8. Élelmiszerbiztonsági jogi szabályozás takarmányokban, élelmiszerekben

A tropán alkaloidok - mint potenciálisan toxikus vegyületek - jelenléte általános közfogyasztásra szánt élelmiszerekben, étrend-kiegészítőkben, különleges táplálkozási célú élelmiszerekben, vendéglátásban felszolgált ételekben nem kívánatos. Alapvető kívánalom a biztonságos élelmiszer forgalmazása, így az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európa Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról, valamint az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról szóló 178/2002 EK rendeletben írottak a meghatározók [68].

Az Európai Unióban sokáig kellett várni a hatékony szabályozás megjelenésére. Meglepő módon előbb jelent meg a maradékanyagokra vonatkozó rendelet a haszonállatok, mint az ember vonatkozásában. A takarmányban előforduló nemkívánatos anyagokról szóló 2002/32/EK irányelv meghatározza, hogy alkaloidákat, glükozidákat vagy más mérgező anyagokat külön, illetve kombinációban tartalmazó gyommagvak és öröletlen vagy össze nem zúzott termések, beleértve a csattanó maszlag magját is maximum 3000 mg/kg mennyiségben, így a *Datura stramonium* L. magvak maximum 1000 mg/kg mennyiségben fordulhatnak elő 12 %-os nedvességtartalmú takarmányra vonatkozóan [60]. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) 2008-ban kiadott állásfoglalásában megállapította, hogy állati eredetű élelmiszerekkel tropán alkaloidok nem jutnak be az élelmiszerláncba, így ez a fogyasztók számára nem okoz kockázatot. Ugyanakkor, az állásfoglalást összeállító tudományos panel felhívta a figyelmet a tropán alkaloidok mérési módszerei validálásának fontosságára [59].

5 évvel később, 2013-ban az EFSA újabb szakértői állásfoglalást bocsátott ki az élelmiszerekben és takarmányokban előforduló tropán alkaloidokról [69]. A rendelkezésre álló adatok alapján az EFSA egy, a (-)-hioszciamin és a (-)-szkopolamin összegében kifejezett 0,016 µg/testtömeg kg mértékű csoportos akut referenciadózist (ARfD) határozott meg, egyenértékű hatásérősség feltételezése mellett. Ezen túlmenően megállapította, hogy bár meglehetősen korlátozott számú információ áll rendelkezésre, de ezek azt jelzik, hogy a kisgyermekek tropán alkaloidokra vonatkozó étrendi kitettsége jelentős mértékben meghaladhatja a csoportos akut referenciadózist.

Az EFSA álláspontjára alapozva jelent meg a Bizottság 2016/239/EK [70] rendelete az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról szóló 1881/2006/EK rendelet [71] csecsemők és kisgyermekek számára készült, kölest, cirokot, hajdinát vagy ezekből származó termékeket tartalmazó feldolgozott gabonaalapú élelmiszerekben és bébiételekben előforduló atropinra és szkopolaminra vonatkozó felső határértékek tekintetében történő módosításáról. Ennek megfelelően, az említett élelmiszerekben az atropin, ill. a szkopolamin megengedett felsőértéke külön-külön 1,0 µg/kg.

Az EFSA 2013-as állásfoglalásában [69] kiemelte, hogy nélkülözhetetlen lenne az élelmiszerekben és takarmányokban természetesen előforduló vagy szennyező anyagként jelen lévő tropán alkaloidok részletesebb jellemzése, gabonafélékben és olajos magvakban való előfordulásukra vonatkozó analitikai adatok összegyűjtése. Ezen analitikai adatok összegyűjtése az Európai Bizottság tagállamok élelmiszeripari vállalkozói felé irányuló, a tropán alkaloidok monitorozását célzó ajánlása [72] alapján meg is történt. Az Ajánlás felhívta a tagállamok az élelmiszerbiztonságot felügyelő hatóságait, hogy az élelmiszeripari vállalkozók aktív bevonásával kövessék nyomon a tropán alkaloidok élelmiszerekben való előfordulását, különös

tekintettel a gabonafélékben és belőlük készült termékekben (hajdina, cirok, köles, kukorica és hajdina-, cirok-, köles- és kukoricaliszt), csecsemőknek és kisgyermekeknek szánt gabonaalapú élelmiszerekben, reggeli gabonapelyhekben, malomipari termékekben, emberi fogyasztásra szánt magvakban, gluténmentes termékekben, étrend-kiegészítőkben, teákban és gyógynövényteákban, hüvelyes zöldségekben (hüvely nélkül), hüvelyesek és olajos magvakban, valamint az ezekből származó termékekben [72].

2016-ban megjelent a tropán alkaloidok élelmiszerekben való előfordulásáról szóló, kilenc tagállamot érintő, ad hoc adatgyűjtési vizsgálat eredményeit bemutató összefoglaló tanulmány [50]. Az eredmények értékelését követően, 2018-ban az EFSA tudományos jelentést bocsátott ki az uniós lakosság tropán alkaloidoknak való akut étrendi expozíciójának tekintetében [73]. A jelentést 2019-ben frissítették. Ez a jelentés ismerteti a becsült emberi akut étrendi tropán alkaloid expozíciót, 17 európai ország és egy szövetség, a Tea & Herbal Infusions Europe adatai alapján a 2009-2016 közötti, majd 2019-ig terjedő időszakból származó mérési eredmények segítségével. Az elemzéshez mintegy 7.900 élelmiszerből származó, közel 45 ezer analitikai adatot használtak fel (6.943 atropin és 6.897 szkopolamin mérési eredmény, 14.851 egyéb *Datura* típusú tropán-alkaloid és 15.493 egyéb tropán alkaloid). A leggyakrabban előforduló tropán alkaloidok az atropin (6.943 mintában; 15,7 %) és a szkopolamin (6.897 mintában; 15,6%) voltak [73].

Nagy mennyiségű atropin szennyeződés volt jelen a kendermagban (77,2 µg/kg), különböző fűszerekben (pl. koriandermag 35,0 µg/kg; édesköménymag 6,1 µg/kg), teákban és főzetekben (zöld tea 10,01 µg/kg), gabonaszeletekben (átlag 6,3 µg/kg). Szkopolamin viszonylag nagy koncentrációban volt jelen kendermagban (64,9 µg/kg), teákban és főzetekben (kamillavirág 11 µg/kg, zöld tea 10 µg/kg) és fűszerekben (koriandermag 22 µg/kg), burgonyában és burgonyatermékekben kaliztegin A3 szennyeződés volt kimutatható (107 mg/kg) [73].

Az atropin és szkopolamin együttes átlagos akut étrendi expozíciója a csecsemőknél volt a legmagasabb: 1-19 ng/ttkg/nap, de az idősebb gyermekek kitétsége is hasonlóan magas volt: kisgyermeknél 2-19 ng/ttkg/nap, és a 18 év alatti gyermekek esetében 1-18 ng/ttkg/nap volt a megállapított bevitel. A tropán alkaloidok akut expozíciójára vonatkozó becslés szerint a lakosság számos csoportja (de különösen a fiatal, sérülékeny korosztály) túllépi az akut referenciadózist (16 ng/ttkg/nap) és azt is megállapították, hogy az atropin és a szkopolamin együttes expozíciójához a kenyér és gabonaipari termékek járultak hozzá legnagyobb mértékben, minden korosztály tekintetében. A felmérési adatok szerint az élelmiszerláncban aggályos mennyiségben fordulnak elő a tropán alkaloidok, különösen az atropin és a szkopolamin.

Mindezek alapján 2021-ben ismét módosították a 1881/2006/EK rendelet, így a gabonafélék, az azokból származó termékek és egyes gyógynövényforrások tekintetében is meghatározták a felső határértékeket [74] (4. táblázat). A 2021/1408/EK rendelet mellékletében felsorolt, 2022. szeptember 1-je előtt jogszerűen forgalomba hozott élelmiszerek a minőségmegőrzési vagy a fogyaszthatósági idejük lejártáig forgalomban maradhatnak. A szabályozás továbbra is kiemelten kezeli a csecsemőknek, kisgyermekeknek szánt élelmiszereket és meghagyja a korábbi értékeket, azaz az 1-1 µg/kg megengedhető mennyiséget atropinra és szkopolaminra. Ezen túlmenően, széles körben érinti a növényi eredetű élelmiszereket, gabonákat (kukorica, köles, cirok), álgabonát (hajdina) és gyógynövényeket. Ismerve a magyarországi, köménymag szennyeződéséből eredő mérgező esetet (lásd később), a szabályozás alá vont élelmiszerek köre hiányosnak tűnik, így a tropán alkaloidok vonatkozásában célszerű lett volna a fűszernövény magvakra is előírni felső határértéket.

4. táblázat. A tropán alkaloidok (atropin, szkopolamin) élelmiszerekben megengedhető felső határértéke a 1881/2006/EK rendelet alapján, egységes szerkezetben [70, 74]

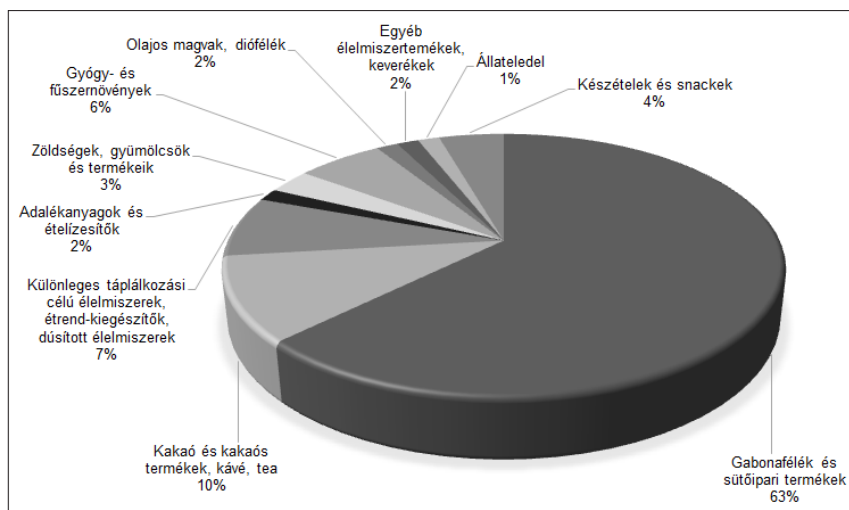
Élelmiszerek	Felső határérték (µg/kg)	
	Atropin	Szkopolamin
Kölest, cirokot, hajdinát, kukoricát és ezekből származó termékeket tartalmazó, csecsemők és kisgyermekek számára készült, feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébiételek	1,0	1,0

Élelmiszerek	Felső határérték (µg/kg)
	Az atropin és szkopolamin összege (µg/kg)
Feldolgozatlan köles és cirok	2022. szeptember 1-jétől 5,0
Feldolgozatlan kukorica a következők kivételével: - nedves őrléssel történő feldolgozásra szánt feldolgozatlan kukorica - pattogtatásra szánt feldolgozatlan kukorica	2022. szeptember 1-jétől 15
Feldolgozatlan hajdina	2022. szeptember 1-jétől 10
Pattogtatásra szánt kukorica Végső fogyasztók számára forgalomba hozott köles, cirok és kukorica Kölesből, cirokból és kukoricából származó malomipari termékek	2022. szeptember 1-jétől 5,0
Végső fogyasztók számára forgalomba hozott hajdina Hajdinából származó malomipari termékek	2022. szeptember 1-jétől 10
Gyógynövényforrázat (szárított termék), a következő sorban említett gyógynövényforrázatok kivételével	2022. szeptember 1-jétől 25
Ánizsmagból származó gyógynövényforrázatok (szárított termék)	2022. szeptember 1-jétől 50
Gyógynövényforrázatok (folyékony)	2022. szeptember 1-jétől 0,20

Az étrend-kiegészítőkről szóló európai uniós 46/2002/EK irányelv és annak hazai átültetése, a 37/2004. (IV. 26.) ESZCSM rendelet az étrend-kiegészítőkről nem ad konkrét útmutatást az egészségre káros anyagokra, ezek étrend-kiegészítőben történő alkalmazhatóságára, a megengedhető mennyiségre, határértékekre, stb. vonatkozóan [75, 76]. Ugyanakkor, az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (korábban Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, OÉTI) által az európai uniós csatlakozást követően összehívott Szakértői Testület 2006-ban összeállított egy listát, mely az élelmiszerekben, beleértve az étrend-kiegészítőket is, alkalmazásra nem javasolt növényeket tartalmazza [77]. Ezek között számos, tropán alkaloidokat tartalmazó növény, ill. növényi rész található, úgy mint *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Mandragora officinarum*, *Scopolia* sp., *Datura stramonis*, *Solanum nigrum*, *S. dulcimara*, *Brugmansia* sp. Érdemes megemlíteni, hogy korábban e negatív listán szerepelt a *Lycium barbarum* termése (gyümölcse, goji bogyó) is, tekintettel arra, hogy egy 1989-es közlemény [78] szerint a termésben (vékonyréteg kromatográfiás – TLC technikával meghatározva) 0,95 % atropin és 0,29 % (-)-hioszciamin található. A szerző utal arra is, hogy ezek a tropán alkaloidok hasonló mennyiségben megtalálhatók a gyökérben és a friss hajtásban is. Ugyanakkor, Drost-Karbowska, 1984-es közleményében nem ír tropán-alkaloidokról a *Lycium barbarum* termésében [79]. Adams 2006-ban HPLC-MS technikával 19 µg alkaloid/kg termés mennyiséget mutatott ki, míg Potterat (2010) nem tudta tropán alkaloidok jelenlétét igazolni a termésben [80, 81]. Ez utóbbi adatokra történő hivatkozással jelenleg az OGYÉI negatív lista ma nem tartalmazza a *Lycium barbarum* termését.

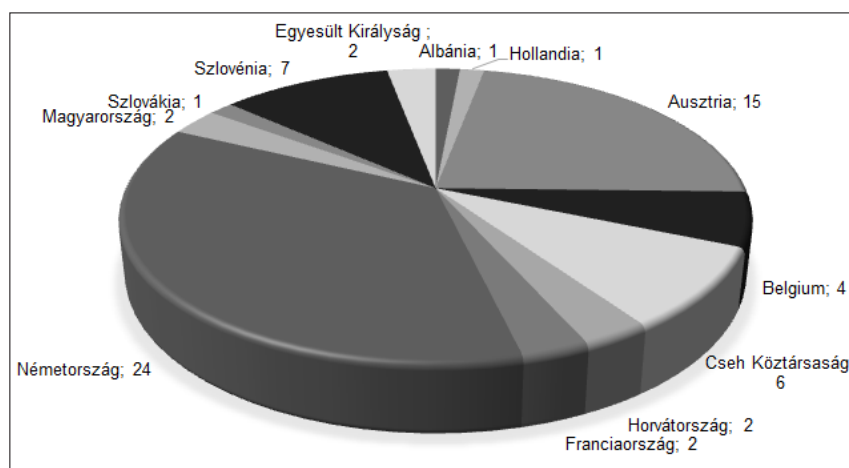
9. Tropán alkaloidok jelenléte élelmiszerekben, RASFF riasztások

Az Európai Unió élelmiszerekkel és takarmányokkal összefüggő gyorsriasztási rendszerében (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed) 2006-2022 között 67 olyan esemény (riasztás, információ, visszautasítás a határon) található, mely tropán alkaloidokkal függ össze [82]. Az érintett élelmiszerek döntő többsége gabonai termékek: köles (arany, barna) liszt és termékek, cirok, hajdina, valamint kisgyerekeknek szánt élelmiszerek (gabonapehely), kukorica (liszt, popcorn) spenót, köménymag, múzli, borsmenta, zab- és szójapehely, gyógynövényteák, chipsek (7. ábra). Valamennyi esetben a tropán alkaloidok szennyeződésként voltak jelen a termékekben. A tropán alkaloidok forrása többségében csattanó maszlag (*Datura stramonium*) és fekete csucsor (*Solanum nigrum*) volt, de legtöbb esetben csak az atropin és a szkopolamin jelenléte/mennyisége jelent meg a RASFF adatbázisban.



7. ábra. Az egyes élelmiszer típusok megoszlása az Európai Unió RASFF rendszerében megjelenő, tropán alkaloidokkal összefüggő bejelentésekben, 2006-2022 július

A legtöbb jelzés Németországból (24) és Ausztriából (15) érkezett (8. ábra), de a szennyezett élelmiszerek több mint 40 országba eljutottak, érintették szinte valamennyi EU tagállamot, de például Kínát, Japán, Szenegált, Bahreint, Svájcot, Dél-Afrikai Köztársaságot, Andorrát, Bosznia-Hercegovinát is. A legtöbb bejelentés tropán alkaloidokkal kapcsolatban 2015-ben volt (9. ábra), ekkor Németország és Ausztria 4-4 terméket, Csehország pedig egy esetet jelentett a RASFF rendszerben.

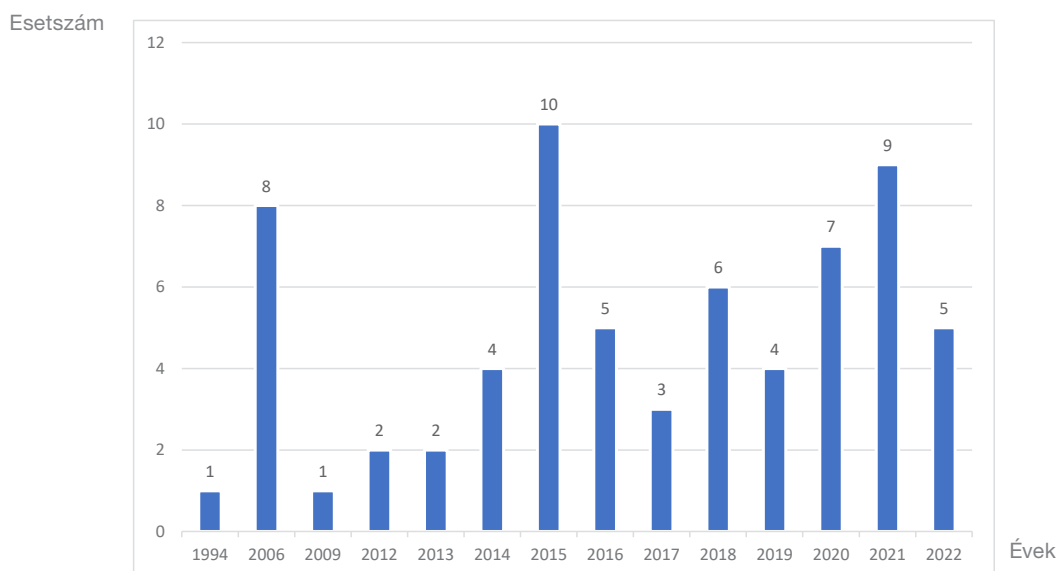


8. ábra. A tropán alkaloidokat érintő RASFF esetek bejelentő ország szerinti megoszlása (2006-2022)

A 67 eseményből 22 eset érintette Magyarországot, vagy azért, mert az alapanyag hazánkban származott (11 eset), vagy azért, mert a termék a hazai kereskedelemben is megjelent, illetve megjelenhetett (11 eset). Hazánk két esetben tett bejelentést a RASFF-rendszerbe tropán alkaloidokkal szennyezett élelmiszerről.

Az egyik élelmiszer a 2018-ban a nagy sajtóvilágosságot szerzett, csattanó maszlaggal szennyezett köménymag volt (2018.0774), ami a RASFF portálon egyértelműen úgy jelent meg, hogy a szennyezés forrása magyar termék volt. A másik magyar bejelentés egy lengyel zabpehelyhez kapcsolódik (2020.5838), melyben a magyar hatóság szintén csattanó maszlagot talált. A 2021-2022-ben a NÉBIH weboldalán és több sajtótermékben is megjelenő, csattanó maszlag magvakat tartalmazó, különböző vállalkozások által előállított és forgalmazott fagyasztott zöldbab nem jelenik meg a RASFF-ban.

2006-ban *Datura* magvak voltak (130 mag/kg) Magyarországról és Ausztriából származó biokölesben (2006.0833), ugyancsak csattanó maszlag magvait találták állateledelnek szánt vörös kölesben (2006. BYZ) 2009-ben. 2009-ben Szlovénia jelentett a RASFF-ba hazánkban származó hajdina lisztben 110 µg/kg



9. ábra. Tropán alkaloidokkal kapcsolatos RASFF bejelentések száma évenkénti bontásban, 1994, 2006-2022

atropint és 47 µg/kg szkopolamint (2009.0558). 2104-ben a német hatóságok találtak atropint (46 µg/kg) és szkopolamint (25 µg/kg) Ausztriából származó barna köles (*Uroclora ramosa*) lisztben, ahol az alapanyag származási helye Magyarország és Hollandia volt (2014.1652). 2015 márciusában egymás után három, Ausztriából induló riasztásban szerepelt magyar alapanyag, bio puffasztott kölesben 481 µg/kg atropin és 533 µg/kg szkopolamin, puffasztott kölesben 384 µg/kg atropin és 388 µg/kg szkopolamin, továbbá kölesgolyóban 304 µg/kg atropin és 358 µg/kg szkopolamin volt kimutatható (2015.0338, 2015.0339, 2015.0399). 2016-ban ismét köleslisztben volt kimutatható atropin (23,5 µg/kg) és szkopolamin (9,5 µg/kg) (2016.1298). A 2018-as év a köménymagról szólt (lásd később), 2021-ben Magyarországról származó bio lenmaglisztben mutatott ki a német hatóság atropint (100 - 238 µg/kg) (2021.6052), 2021-ben ugyancsak a német hatóság tropán alkaloidok jelenlétét jelezte a RASFF-ban magyar petrezselyemben, de konkrét mérési eredmények nem találhatók az adatbázisban (2021.3836).

Magyarországra bekerülő termékek tropán alkaloid szennyezettségét jelentették a RASFF-ban, 2006-ban bio kölesben (2006.0737, 2006.0833), 2014-ben két esetben Németországból származó, gabonaalapú bébiételekben (2014.1694, 2014.1596), 2015-ben barna kölesben és kukoricaliszt alapú biotermékben (2015.0203, 2015.0210). 2018-ban atropint és szkopolamint mutattak ki hazánkban is forgalmazott, Lengyelországból származó növényi forrázatban (pontos összetétele nem ismert) (2018.2009), Franciaországból származó pattogatni való kukoricában (2018.1447), és osztrák bio müzliben (2018.2695). 2020-ban csattanó maszlag magvakkal szennyezett lengyel zabpehely (2020.5838), valamint atropint és szkopolamint tartalmazó bio szójapehely (2020.0366) került a hazai boltokba. 2022-ben Németországból származó, többféle ízesítésű kukorica chips (2022.3840) került hazánkban forgalomba (a kézirat befejezéséig tropán alkaloid mérési eredmények nem érhetőek el a RASFF oldalon).

A RASFF oldalon feltüntetett információk szerint, az érintett tagállamok a szennyezett termékeket visszahívták a piacról, mérgezésekről, egészségkárosító hatásról nincsenek információk.

Érdemes még felhívni a figyelmet arra, hogy az elmúlt néhány évben (2018 és 2022 között) a hazai hatóság több esetben is jelezte, ill. hívta fel a fogyasztók figyelmét különböző élelmiszerekben tropán alkaloid, illetve csattanó maszlag jelenlétére, mely esetek azonban a RASFF-ban nem jelentek meg. A NÉBIH 2016-ban két, nagy valószínűséggel hazai gyártású extrudált kölesgolyót (gluténmentes, extrudált bio kölesgolyó, földimogyorós ízesítésű, ellenőrzött ökológiai gazdálkodásból, 75 g; enyhén sózott, gluténmentes, extrudált kölesgolyó ellenőrzött ökológiai gazdálkodásból, 150 g) vont ki a forgalomból magas atropin- és szkopolamin-tartalom miatt [83]. 2020-ban a gyártó önellenőrzése alapján különböző ízű, német gyártmányú müzli

szeleteket hívtak vissza a kereskedelemről [84]. 2021-2022-ben csattanó maszlag jelenlétére hívta fel a hazai hatóság a figyelmet, különböző márkaneven, különböző forgalmazók által piacra helyezett, 1000 g-os, gyorsfagyasztott sárgahüvelyű zöldbabban [85, 86]¹.

10. Tropán alkaloidok jelenléte a vendéglátásban

A rendelkezésre álló szakirodalmi források, valamint a RASFF riasztások adatai alapján tropán alkaloidokkal leggyakrabban szennyeződő, feldolgozott élelmiszerek azok, ahol alapanyagként gabonaféléket (búza, kukorica, rozs, zab, rizs, köles), álgabonákat (hajdina, teff, amarant), hüvelyeseket használtak. Sajnálatos módon gyakran fordulnak elő sérülékeny csoportoknak szánt termékekben, mint például bébiételek, kisgyermekeknek szánt gabonaalapú élelmiszerek, reggeliző pelyhek. Felmerülhet fűszernövények gyomnövény-magvakkal történő szennyeződése is. Bizonyos gyógynövényekkel való tévesztés okán, egészségre ható termékek, étrend-kiegészítők is a tropán alkaloidok potenciális forrásai lehetnek. Szerencsére, állati eredetű élelmiszerekben (elsősorban hús, de akár tej, tejtermék tojás), a tropán alkaloidok megjelenése nem várható, tekintettel arra, hogy a tropán alkaloidokkal szennyeződött takarmány rossz ízű, az állat azt nem fogyasztja el, emésztőrendszerébe nem kerül, szervezetében nem szívódik fel.

A fentebb említett élelmiszerek, ill. élelmiszer-alapanyagok óhatatlanul megjelennek a vendéglátásban, így ezen a területen is foglalkozni kell a lehetséges egészségkárosító hatásokkal. Ha áttekintjük a 2006-2022 közötti, akár a tropán alkaloidok okozta mérgezésekről beszámoló nyilvános híreket, akár a RASFF adatait, akár a hazai hatóság, a NÉBIH figyelmeztetéseit, felhívásait, megállapítható, hogy ezek közül a legnagyobb nyilvánosságot a következő, 2018-as köménymagos esemény kapta: sajtóhírek alapján ismert, hogy 2018. áprilisában, vendéglátóhelyen elfogyasztott étel után kerültek fogyasztók (zömmel külföldi turisták) akut mérgezéses tünetekkel kórházba [87]. A tünetek alapján, valamint a betegek szisztematikus kivizsgálása után világossá vált, hogy atropinmérgezésről van szó. A *Vendéglátás Magazin* című szaklapban olvasható cikk szerint, néhány hónappal korábban, 2017 decemberében szintén vendéglátóhelyen történt hasonló mérgezés, majd a hatóság látóterébe került olyan élelmiszer, konkrétan fűszer, köménymag, mely felelőssé volt tehető a fogyasztók tüneteire [87]. A mérgezést közvetítő étel gulyásleves volt, amelyet a hagyományos receptúra szerint köménymaggal (is) fűszereznek [88]. A hatóság az első, 2017 decemberi esetet követően több cég által forgalmazott tétel kapcsán hívta fel a fogyasztók, vendéglátásban, közétkeztetésben érdekelt vállalkozások figyelmét a tropán alkaloidokkal szennyezett köménymagra [89, 90]. A magyar hatóság a márciusi vizsgálatok eredményeit továbbította a RASFF rendszerébe, ahol a riasztás 2018.0774 referenciaszámmal található, továbbá egész köménymagra vonatkozóan konkrét mérési adatok is megjelennek, atropinra (16177,6 µg/kg) és szkopolaminra (4658,3 µg/kg) vonatkozóan. Az eset érdekessége, hogy a RASFF riasztásban a termék származási helyeként Magyarországot jelölték meg, ugyanakkor a sajtóhírek szerint a fűszer több állomáson (importőr, kereskedő, őrlő, csomagoló, forgalmazó) keresztül érkezhetett az éttermekbe, ahol a mérgezéseket okozta, lehetséges eredete azonban inkább Egyiptom, de erre vonatkozó megerősítés nem érhető el sem a NÉBIH honlapján, sem a RASFF portálon. Érdemes még arra is felhívni a figyelmet, hogy egy hazai bébiétel előállító cég is visszahívta azon köménymaggal fűszerezett termékét, mely érintett lehetett a szennyeződésben, ezzel is eleget téve a vállalkozói felelősség elvének. A hatóság az érintett forgalmazók bevonásával a még forgalomban lévő termékeket visszahívta, így a későbbiekben már nem érkeztek hírek további mérgezésekről, mindamellett, hogy a szennyezett fűszer a magánháztartásokba is eljuthatott.

A 2018-as köménymagos mérgezések után, a 2019-ben megrendezett Hungalimenteria 2019 konferencián elhangzott egy NÉBIH munkatárs által tartott összefoglaló előadás, amelyben az eseménnyel kapcsolatban mérési eredmények is bemutatottak [90]. Őrölt fűszerköményben átlagosan 7219 mg/kg (689-745 mg/kg) atropin és 237 mg/kg (232-244 mg/kg) szkopolamin volt kimutatható, egész köményben 15,8 mg/kg (16,1-15,4 mg/kg) atropin, 4,5 mg/kg (4,3-4,6mg/kg) szkopolamin. Különböző módon előkészített, illetve elkészített búzafehérje (szejtán) termékekben átlagosan 145 µg/kg atropin és 124 µg/kg szkopolamin volt jelen, bébi-

¹ A NÉBIH termék visszahívásokat bemutató oldalán csak az utolsó 6 hónapra vonatkozó adatok érhetőek el, így korábbi kiadott termék visszahívásokra csak sajtóhírek alapján lehetséges hivatkozni.

ételekben mindkét tropánvázas alkaloid 10 µg/kg alatti mennyiségben volt jelen. Jóllehet, az adatokat tudományos közleményben eddig nem erősítették meg, de azt mindenképpen jelzik, hogy a hatóság által vizsgált fűszerkömény tételek jelentős mennyiségben tartalmaztak csattanó maszlag-szennyezést. Egész termés esetén a szennyezés szabad szemmel is észrevehető, örölt fűszernél értelemszerűen már nem ismerhető fel a gyomnövény magja.

Ahogy az általános közfogyasztású élelmiszerek esetében, úgy vendéglátó termékek területén is egyre népszerűbbek a bio, vegán, nyers vegán és mentes termékek. A bio termesztésű növényi alapanyagok esetében – a gyomirtó szerek használatának tiltása miatt – előfordulhat gyomnövény-magvakkal, így akár tropán alkaloid-tartalmú magvakkal történő szennyeződés. A hagyományőrzés okán számos gabonából, álgabonából (kukorica, köles, cirok, hajdina) készült étel kerül egyre gyakrabban a vendéglátóhelyek étlapjára. A gluténérzékeny egyének számára kínált, búzától és egyéb, glutént tartalmazó összetevőktől mentes, továbbá a tisztán növényi alapanyagokból álló vegán termékek is forrásai lehetnek növényi szennyezőknek, ezért nem csak az élelmiszeriparban, hanem a vendéglátásban működő vállalkozásoknak is figyelmet kell fordítaniuk erre a potenciális kockázatra.

11. A biotermékek tropán alkaloid szennyezettsége

Jelenleg az európai szabályozás alapján számos herbicid (gyomirtószer) használható a növénytermesztésben meghatározott feltételek mellett, melyek megakadályozzák a gyomok megjelenését és további szaporodását különböző növénykultúrákban. Az ökológiai (bio) gazdálkodásban általában tiltják a vegyszerek használatát, így a gazdáknak a gyomok elpusztítására is vegyszeres kezeléstől eltérő, egyéb eljárásokat kell alkalmazniuk. Tekintettel arra, hogy a tropán alkaloid-tartalmú gyomnövények gyakran jelennek meg azokon a területeken is, ahol különböző szemes és hüvelyes termények, gabonafélék termesztése zajlik, gyomirtó szerek hiányában a gyomnövények önmagukban a learatott termésben, vagy magvaik a hasznos magvak között gyakorta előfordulnak. A gyommagvak jelenléte nem jelentene veszélyt, ha a hasznos termény és a gyomnövény magja között méretben, színben vagy fajsúlyban számottevő különbség lenne, mivel ezekben az esetekben különböző elven működő tisztítóberendezések alkalmazásával a magvak egymástól elválaszthatóak lennének. Azonban a köles, hajdina, lenmag, szója és néhány egyéb szemes termény és fűszernövény magja nagyon hasonlít a csattanó maszlag magjához, színben, méretben és így jelenleg nem áll rendelkezésre megfelelő technológia, amelynek alkalmazásával a csattanó maszlag magja a terményből hatékonyan eltávolítható lenne [48]. A nem bio gazdálkodásban a vegyszeres gyomirtás a gyomnövény kelését megakadályozza, bio gazdálkodásban csak a nagy időigényű kézi gyomirtás, és/vagy a betakarítást követő laboratóriumi ellenőrzés jöhet szóba, amely azonban az alkalmazott módszer függvényében különböző mértékben bonyolult, illetve költséges, így az esetek többségében ez az út nem járható. Ezt az állítást ugyan kevés vizsgálati eredmény támasztja alá, de az a tény, hogy a RASFF riasztások között gyakran találkozunk biotermékekkel, mégis jelzik a biotermékek gyommagvakkal történő lehetséges szennyeződésének nagyobb kockázatát. A szakirodalomban egy közlemény érhető el ebben a témában. Cirilini és mtsai 26 bio, azaz vegyszermentes termelésből származó hajdinaterméket (liszt, tészta, péksütemény) vizsgáltak tropán alkaloid tartalomra. Három mintában találtak szennyeződést (13,9-83,9 µg/kg atropin és 5,7-10,4 µg/kg szkopolamin), a legnagyobb mennyiségben egy hajdinalisztben 83,9 µg/kg atropint és 10,4 µg/kg szkopolamint találtak [52]. Így a bioélelmiszerek potenciális élelmiszerbiztonsági kockázataik között a gyommagvakkal származó tropán alkaloid szennyeződést is meg kell említeni.

12. Összegzés

A gyommagvakkal származó tropán alkaloidokkal való szennyeződés bizonyos élelmiszer-csoportokban számottevő élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent, ezért javasolható, hogy az érintett élelmiszer-nyersanyagokat, félkész és kész élelmiszereket a jelenlegi gyakorlathoz képest nagyobb mintaszámban lenne célszerű vizsgálni akár a hatósági, akár a szolgáltató laboratóriumokban.

13. Frissítés

2023 első három hónapjában három újabb, tropán alkaloidokhoz kötődő riasztás jelent meg a RASFF

rendszerben. Mindhárom terméket Németország jelentette, kettő holland, egy lengyel eredetű volt. Biotermesztésű hántolt kölesben (2023.0140) 29 µg/kg atropin és 23 µg/kg szkopolamin volt jelen, pattogatott kukoricában (2023.1822) 16,7 µg/kg atropin, 2,3 µg/kg szkopolamin és bio teff lisztben (2023.1823) 190,4 µg/kg atropin és 60,2 µg/kg szkopolamin volt jelen. Ez utóbbi termék Magyarországon is kereskedelmi forgalomba került, a termék szennyezettségéről a sajtóhírben NÉBIH felhívta a fogyasztók figyelmét és a terméket a forgalomból visszahívta [91].

Köszönetnyilvánítás

A szerző hálás köszönetét fejezi ki Dr. Hegedüs Gyulának és Roger Mantonnak, a Budapesti Gazdasági Egyetem Kereskedelmi, Vendéglátóipari és Idegenforgalmi Kar Gazdasági Szaknyelvek tanszék oktatóinak a kézirat angol nyelvre történő fordításában nyújtott értékes közreműködésükért.

14. Irodalom

- [1] Lounasmaa M., and Tamminen T. (1993): The tropane alkaloids: Chemistry and Biology. In: The Alkaloids (Ed: G.A. Cordell), Academic Press, New York, Vol. **44** 1-114.
- [2] Griffin W.J., Lin G.D. (2000): Chemotaxonomy and geographical relationship of tropane alkaloid producing plants. *Phytochemistry* **53** 623-637. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00475-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00475-6)
- [3] Koleva I.I., Van Beek T.A., Soffers A.E., Dusemund B., Rietjens I.M. (2011): Alkaloids in the human food chain--natural occurrence and possible adverse effects. *Molecular Nutrition and Food Research* **56** 30-52. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100165>
- [4] <https://www.wikidata.org/wiki/Q413762> (Acquired: 12.07.2022)
- [5] Gryniewicz G., Gadzikowska M. (2008): Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Acta Pol Pharm – Drug Res* **60** 439-463. http://if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2008/4_439.pdf
- [6] Passos D.I., Mironidou-Tzouveleki M. (2016): Hallucinogenic plants in the Mediterranean countries. In Victor R. Preedy eds. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse, Volume 2: Stimulants, Club and Dissociative Drugs, Hallucinogens, Steroids, Inhalants and International Aspects*, Chapter 71, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/C2013-0-14226-2> (Acquired: 18.07.2022)
- [7] <http://www.metmuseum.org/art/collection/search/367537> (Acquired: 10.07.2022)
- [8] Adamse P., van Egmond H.P., Noordam M.Y., Mulder P.P.J., de Nijs M. (2014): Tropane alkaloids in food: poisoning incidents. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* **6** (1) 15-24. <https://doi.org/10.3920/QAS2013.0314>
- [9] Friedman M., Levin C.E. (1989): Composition of Jimson Weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37** 998-1005. <https://doi.org/10.1021/jf00088a040>
- [10] Miraldi E., Masti A., Ferri S., Comparini I.B. (2001): Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* **72** 644-648. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00291-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00291-X)
- [11] Mroczek T., Główniak K., Kowalska J. (2006): Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* **1107** 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.034>
- [12] Caligiani A., Palla G., Bonzanini F., Bianchi A., Bruni R. (2011): A validated GC-MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods. *Food Chemistry* **127** 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.141>
- [13] Jakabová S., Vincze L., Farkas A., Kilár F., Boros B., Felinger A. (2012): Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A* **1232** 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.036>
- [14] Padula L.Z., Bandoni A.L., Rondina R.V.D., Coussio J.D. (1976): Quantitative-determination of total alkaloids and scopolamine in *Datura ferox* growing in Argentina. *Planta Medica* **29** 357-360. DOI: 10.1055/s-0028-1097676
- [15] Vitale A.A., Acher A., Pomilio A.B. (1995): Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* **49** 81-89. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)90035-7)
- [16] Wilms J., Roder E., Kating H. (1977): Gas-Chromatographic determination of tropane alkaloids in organs of *Atropa Belladonna*. *Planta Medica* **31** 249-256.

- [17] Simola L.K., Nieminen S., Huhtikangas A., Ylinen M., Naaranlahti T., Lounasmaa M. (1988): Tropane alkaloids from *Atropa belladonna* 2. Interaction of origin, age, and environment in alkaloid production of callus-cultures. *Journal of Natural Products* **51** 234-242. <https://doi.org/10.1021/np50056a007>
- [18] Sporer F., Sauerwein M., Wink M. (1993): Diurnal and developmental variation of alkaloid accumulation in *Atropa belladonna*. *Acta Horticulturae* **331** 381-386. DOI: 10.17660/ActaHortic.1993.331.53
- [19] Ashtiania F., Sefidkonb F. (2011): Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miens plants. *Journal of Medicinal Plants Research* **5** 6515-6522. DOI10.5897/JMPR11.482 https://academicjournals.org/article/article1380720036_Ashiani%20and%20Sefidkon.pdf (Acquired: 06.08.2022)
- [20] Zarate R., Hermosin B., Cantos M., Troncoso A. (1997): Tropane alkaloid distribution in *Atropa baetica* plants. *Journal of Chemical Ecology* **23** 2059-2066. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006489.76006.cb> (Acquired: 06.08.2022)
- [21] Berkov S. (2001): Size and alkaloid content of seeds in induced autotetraploids of *Datura innoxia*, *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Pharmaceutical Biology* **39** 329-331. <https://doi.org/10.1076/phbi.39.5.329.5896>
- [22] Brown J.H. (1990): Atropine, scopolamine and related antimuscarinic drugs. In: Pharmacological Basis of Therapeutics. Eds Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS and Taylor P, Pergamon Press, Oxford, 33-48.
- [23] Gadzikowska M., Gryniewicz G. (2002): Tropane alkaloids in pharmaceutical and phytochemical analysis. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **59** (2) 149-160. https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2002/2/149.pdf (Acquired: 06.08.2022)
- [24] Martindale (2011): The complete drug reference, online, Atropine, Pharmaceutical Press, London, Date of monographs revision: 05 December 2011. <http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/> (Acquired: 12.07.2022)
- [25] Beermann B., Hellström K., Rosén A. (1971): The gastrointestinal absorption of atropine in man. *Clinical Science* **40** 95-106. <https://doi.org/10.1042/cs0400095>
- [26] Spina S.P., Taddei A. (2007): Teenagers with jimson weed (*Datura stramonium*) poisoning. *Canadian Journal of Emergency Medicine* **9** 467-469. <https://doi.org/10.1017/S1481803500015530>
- [27] Kohnen-Johannsen K.L., Kayser O. (2019): Tropane alkaloids: Chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules* **24** (4), 796; <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>
- [28] <http://www.drdiag.hu/kereso/diagnosztika.adatlap.php?id=84755> (Acquired: 07.08.2022)
- [29] <https://www.parentmcs.hu/?page=vegyul&id=8> (Acquired: 07.08.2022)
- [30] https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=529-17-9 (Acquired: 07.08.2022)
- [31] https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=50-36-2 (Acquired: 07.08.2022)
- [32] https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=402856-42-2 (Acquired: 07.08.2022)
- [33] Nagy európai természetkalauz. Összeáll. és szerk. Roland Gerstmeier. 2. kiadás. Budapest: Officina Nova. 1993. ISBN 963 8185 40 6
- [34] Pollesche J. (2019): The use of morphine and scopolamine to induce twilight sleep. Embryo Project Encyclopedia (2019-05-02). ISSN: 1940-5030 <http://embryo.asu.edu/handle/10776/13101> (Acquired: 07.08.2022)
- [35] Beverly R. (1705): The history and present state of Virginia, in four parts (University of North Carolina). Book II. The natural product and conveniencies in its unimprov'd state, before the English went thither. p. 24. <http://docsouth.unc.edu/southlit/beverley/beverley.html> (Acquired: 07.08.2022)
- [36] Szejnberg A. (2021): Albert Ladenburg (1842-1911) – The distinguished German chemist and historian of chemistry of the second half of the XIX century (To the 110th anniversary of his death). *Substantia* **5** (2) 153-164. doi: 10.36253/Substantia-1231
- [37] <https://www.nlm.nih.gov/exhibition/pickyourpoison/exhibition-cocaine.html?slide=3> (Acquired: 07.08.2022)
- [38] <http://www.euvs.org/en/discover/man-behind-the-bottle/mariani> (Acquired: 07.08.2022)
- [39] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vin_mariani_publicite156.jpg (Acquired: 07.08.2022)
- [40] <https://en.wikipedia.org/wiki/Coca-Cola> (Acquired: 07.08.2022)
- [41] <https://www.businessinsider.com/strategies-coca-cola-used-to-become-an-iconic-brand-2016-2#1-it-started-with-a-unique-market-tested-formula-1> (Acquired: 07.08.2022)

- [42] <https://www.encyclopedia.com/science/news-wires-white-papers-and-books/willstatter-richard-martin> (Acquired: 07.08.2022)
- [43] Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J.M., Cornwell T., Pastor I., Fridlender B. (2002): Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* **20** (12) 522-31. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02080-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02080-2)
- [44] VII. Ph. Eur (2011): Council of Europe, European pharmacopoeia, 7th Ed. Council of Europe, Strasbourg, France. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
- [45] Lin C.C., Chen, J.C. (2002): Medicinal herb *Erycibe henri* Prain ('Ting Kung Teng') resulting in acute cholinergic syndrome. *J Toxicology – Clinical Toxicology* **40** 185-187. <https://doi.org/10.1081/CLT-120004409>
- [46] Beltman W., Van Riel A.J.H.P., Wijnands-Kleukers A.P.G., Vriesman M.F., Van den Hengel-Koot I.S., De Vries I., Meulenbelt, J. (1999): Smartshops – Smart shops: a survey of products, claimed effects and medical-toxicological relevance. RIVM report 348802 017 [in Dutch]. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands, <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/348802017.html>
- [47] Abia W.A., Montgomery H., Nugent A.P., Elliott C.T. (2021): Tropane alkaloid contamination of agricultural commodities and food products in relation to consumer health: Learnings from the 2019 Uganda food aid outbreak. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **20** 501-525. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12664>
- [48] González-Gómez L., Morante-Zarcelero S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I (2022): Occurrence and chemistry of tropane alkaloids in foods, with a focus on sample analysis methods: A Review on Recent Trends and Technological Advances. *Foods* **11** 407. <https://doi.org/10.3390/foods11030407>
- [49] Mulder P.P.J., Pereboom-de Fauw D.P.K.H., Hoogenboom R.L.A.P., de Stoppelaar J., de Nijs M. (2015): Tropane and ergot alkaloids in grain-based products for infants és young children in the Netherlands in 2011–2014. *Food Addit Contam Part B Surveill* **8** 284-290. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1089947>
- [50] Mulder P.P.J., De Nijs M., Castellari M., Hortos M., MacDonald S., Crews C., Hajslova J. Stranska M. (2016): Occurrence of tropane alkaloids in food. EFSA supporting publication, 2016:EN-1140, 200. o., <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1140>
- [51] Marín-Sáez J., Romero-González R., Garrido Frenich A. (2017): Multi-analysis determination of tropane alkaloids in cereals and *Solanaceae* seeds by liquid chromatography coupled to single stage Exactive-Orbitrap. *J Chromatogr. A* **1518** 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.052>
- [52] Cirlini M., Demuth T.M., Biancardi A., Rychlik M., Dall'Asta C., Bruni R. (2018): Are tropane alkaloids present in organic foods? Detection of scopolamine and atropine in organic buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) products by UHPLC–MS/MS. *Food Chem* **239** 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.028>
- [53] Marín-Sáez, J.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. (2019): Reliable determination of tropane alkaloids in cereal based baby foods coupling on-line spe to mass spectrometry avoiding chromatographic step. *Food Chem* **275** 746-753. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.137>
- [54] Baslé Q., Mujahid C., Bessaire T. (2020): Application of a streamlined LC-MS/MS methodology for the determination of atropine and scopolamine in cereals from Asian and African countries. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Contro. Expo Risk Assess* **37** 1744-1754. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1800828>
- [55] González-Gómez L., Gañán J., Morante-Zarcelero S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I. (2020): Sulfonic acid-functionalized SBA-15 as strong cation-exchange sorbent for solid-phase extraction of atropine and scopolamine in gluten-free grains and flours. *Foods* **9** (12) 1854. <https://doi.org/10.3390/foods9121854>
- [56] Shimshoni J.A., Duebecke A., Mulder P.P.J., Cuneah O., Barel S. (2015): Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas peppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market. *Food Addit Contam Part A Chem Ana. Control Expo Risk Assess* **32** 2058-2067. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1087651>
- [57] González-Gómez L., Gañán J., Morante-Zarcelero S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I. (2022): Mesostructured silicas as cation-exchange sorbents in packed or dispersive solid phase extraction for the determination of tropane alkaloids in culinary aromatics herbs by HPLC-MS/MS. *Toxins* **14** 218. <https://doi.org/10.3390/toxins14030218>

- [58] Adamse P., van Egmond H.P. (2010): Tropane alkaloids in food. RIKILT - Institute of Food Safety, Wageningen University & Research centre, <https://edepot.wur.nl/160741>
- [59] Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Tropane alkaloids (from *Datura sp.*) as undesirable substances in animal feed. (2008) *The EFSA Journal* **691** 1-55. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.691>
- [60] European Commission (EC), 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Union* **L 140** 10. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32002L0032&from=EN> (Acquired: 07.08.2022)
- [61] Bania T.C., Chu J., Bailes D., O'Neill M. (2004): Jimson weed extract as a protective agent in severe organophosphate toxicity. *Acad Emerg Med* **11** (4) 335-338. <https://doi.org/10.1197/j.aem.2003.12.002>
- [62] Kerchner A., Farkas Á. (2020): Worldwide poisoning potential of *Brugmansia* and *Datura*. *Forensic Toxicology* **38** 30-41. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00500-2>
- [63] List G.R., Spencer G.F. (1976): Fate of Jimson weed seed alkaloids in soybean processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **53** 535-536. doi: 10.1007/BF02586254
- [64] Perharič L., Koželj G., Družina B., Stanovnik L. (2013): Risk assessment of buckwheat flour contaminated by thorn-apple (*Datura stramonium* L.) alkaloids: a case study from Slovenia. *Food Additives and Contaminants, Part A* **30** 321-330. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.743189>
- [65] Marín-Sáez J., Romero-González, R., Garrido Frenich, A. (2019): Degradation of tropane alkaloids in baked bread samples contaminated with *Solanaceae* seeds. *Food Research International* **122** 585-592. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.027>
- [66] Marín-Sáez J., Romero-González R., Garrido Frenich A. (2019): Effect of tea making and boiling processes on the degradation of tropane alkaloids in tea and pasta samples contaminated with *Solanaceae* seeds and coca leaf. *Food Chemistry* **287** 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.091>
- [67] Vera-Baquero F.L., Morante-Zarzero S., Sierra I. (2022): Evaluation of thermal degradation of tropane and opium alkaloids in gluten-free corn breadsticks samples contaminated with *Stramonium* Seeds and baked with poppy seeds under different conditions. *Foods* **11** 2196. <https://doi.org/10.3390/foods11152196>
- [68] Az Európai Parlament és a Tanács 178/2002/EK RENDELETE (2002. január 28.) az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L31/1** 463-486. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R0178&from=HU> (Acquired: 20.04.2022)
- [69] EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2013. Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* **11** (10) 3386. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3386>
- [70] A Bizottság (EU) 2016/239 rendelete (2016. február 19.) az 1881/2006/EK rendeletnek a bizonyos, csecsemők és kisgyermek számára készült gabona-alapú élelmiszerekben előforduló tropánalkaloidok felső határértékeinek tekintetében történő módosításáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L45** 3-5. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0239&from=EN> (Acquired: 08.04.2022)
- [71] A Bizottság 1881/2006/EK rendelete (2006. december 19.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L364** 5-24. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20170728&from=PL> (Acquired: 12.05.2022)
- [72] A Bizottság (EU) 2015/976 ajánlása (2015. június 19.) a tropán alkaloidok élelmiszerekben való előfordulásának nyomon követéséről. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L157** 97-98. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015H0976&from=HU> (Acquired: 04.05.2022)
- [73] EFSA (European Food Safety Authority), Arcella D., Altieri A., Horváth Zs. (2018): Scientific report on human acute exposure assessment to tropane alkaloids. *EFSA Journal* **16** (2) 5160. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5160>
- [74] A Bizottság (EU) 2021/1408 rendelete (2021. augusztus 27.) az 1881/2006/EK rendeletnek az egyes élelmiszerekben előforduló tropánalkaloidok felső határértékei tekintetében történő módosításáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L 304/1** <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32021R1408&from=EN> (Acquired: 12.04.2022)

- [75] Az Európai Parlament és a Tanács 2002/46/EK irányelve (2002. június 10.) az étrend-kiegészítőkre vonatkozó tagállami jogszabályok közelítéséről. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L183/51** <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=EN> (Acquired: 23.10.2020)
- [76] 37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet az étrend-kiegészítőkről. <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0400037.esc> (Acquired: 12.04.2022)
- [77] https://ogyei.gov.hu/etrend_kiegeszitokban_felhasznalásra_nem_javasolt_gyogynovenyek_es_ertekelesuk (Acquired: 29.06.2022)
- [78] Harsh M.L. (1989): Tropane alkaloids from *Lycium barbarum* Linn. in vivo and in vitro. *Current Science* **58** 817-818. Corpus ID: 88551086
- [79] Drost-Karbowska K., Hajdrych-Szauffer M., Kowalewski Z. (1984): Search for alkaloid-type basis in *Lycium halimifolium*. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **41** 127-129.
- [80] Adams M., Wiedenmann M., Tittel G., Bauer R. (2006): HPLC-MS trace analysis of atropine in *Lycium barbarum* berries. *Phytochemical Analysis* **17** 279-283. <https://doi.org/10.1002/pca.915>
- [81] Potterat O. (2010): Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Medica* **76** 7-19. DOI: 10.1055/s-0029-1186218
- [82] <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> (Acquired: 07.08.2022)
- [83] https://portal.nebih.gov.hu/kihelyezett-tanszek-kijelzo/-/asset_publisher/IDJzr2QmIly/content/extrudalt-kolesgolyo-termekeket-vont-ki-a-forgalombol-a-nebih https://www.mueller.co.hu/as-sets/download/19/2020_termekvisszahivas_Hafervoll-37919.pdf (Acquired: 12.07.2022)
- [84] https://www.csaladinet.hu/hirek/szabadido/hirek_erdekessegek/31281/nebih_figyelmeztetes_mergezo_gyomnoveny_kerulhetett_a_fagyasztott_zoldbabba (Acquired: 12.07.2022)
- [85] <https://portal.nebih.gov.hu/termekvisszahivas> (Acquired: 12.06.2022)
- [86] <https://vendeglatasmagazin.hu/ismet-sulyos-mergezest-okozott-fertozott-fuszerkomeny/> (Acquired: 28.06.2022)
- [87] https://index.hu/belfold/2018/04/26/mergezest_kapott_a_gulyastol_egy_csoport_turista/ (Acquired: 09.05.2020)
- [88] <https://portal.nebih.gov.hu/-/ismet-szenyezett-fuszerkomeny-visszahivasat-rendelte-el-a-hatosag> (Acquired: 09.05.2020)
- [89] <https://portal.nebih.gov.hu/-/ujabb-csattano-maszlaggal-szenyezett-fuszerkomeny-teteleket-azonositott-a-nebih-laboratoriuma> (Acquired: 09.05.2020)
- [90] https://wesslingtudaskozpont.hu/resources/hungalimentaria/archiv/2019/eloadasok/Sus%C3%A1n%20Judit%20-%202019Tox_hungalimentaria.pdf (Acquired: 06.08.2022)
- [91] <https://glutenerzékeny.hu/termekvisszahivas-teff-liszt-2023-03-18/> (Acquired: 21.03.2023)

Andrea LUGASI ¹DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2023/1-1-ENG>

Received: August 2022 – Accepted: November 2022

Tropane alkaloids in food – real and perceived risks

Keywords: atropine, Scopolamine, anticholinergic effect, antimuscarinic compounds, physiological effect, human exposure, cocaine, antidotes, RASFF alert, bio product contamination by weed seeds

1. Summary

Tropane alkaloids occur in many plant families and their toxic effects can cause mild symptoms or even death, depending on the dose. They are most commonly introduced into the human body through contamination, misuse or deliberate abuse due to their intoxicating effects. They are present in food for general consumption, sometimes causing documented poisoning, due to inadequate cleaning of cereals, pulses or other grain crops, but especially organic products produced without chemicals. The EU legislation published in 2021 set tolerances for tropane alkaloids for a relatively wide range of plant materials, and therefore consistent compliance with the regulation will reduce the food safety risk from tropane alkaloid contamination, although food poisoning incidents in recent years have highlighted the need to broaden the range of food substances covered.

¹ Budapest Business School, Faculty of Commerce, Hospitality and Tourism, Department of Hospitality

2. Introduction

Tropane alkaloids are secondary metabolites commonly found in plants. Their food safety risk has come to the fore in the last few years, mainly in relation to accidental contamination of food. In particular, crops grown using chemical-free technologies may pose a food safety risk, as the ban on the use of herbicides may lead to the proliferation of weeds containing tropane alkaloids. Various parts of weeds but mainly seeds can be introduced into products for human consumption, resulting in contamination that cause acute poisoning.

In recent years, contaminated food has been found in the Hungarian market and food poisoning cases attributed to tropane alkaloids have occurred in the commercial catering sector. Thus, the risk may affect the final consumer through both prepackaged food and catering. In the light of poisoning incidents over the last decade and so, the need to regulate tropane alkaloids at Community level has been brought to the fore there is reason for optimism that the recent EU legislation, if applied consistently, can provide sufficient protection for the consumer.

3. Chemical structure, occurrence

The tropane alkaloids are characterised by an azabicyclo[3.2.1]octane ring structure (bicyclic amine, in which a pyrrolidine and a piperidine ring, one N and two C atoms, are shared) (**Figure 1**). The amino group is, as is typical for alkaloids, mostly methylated [**1**].

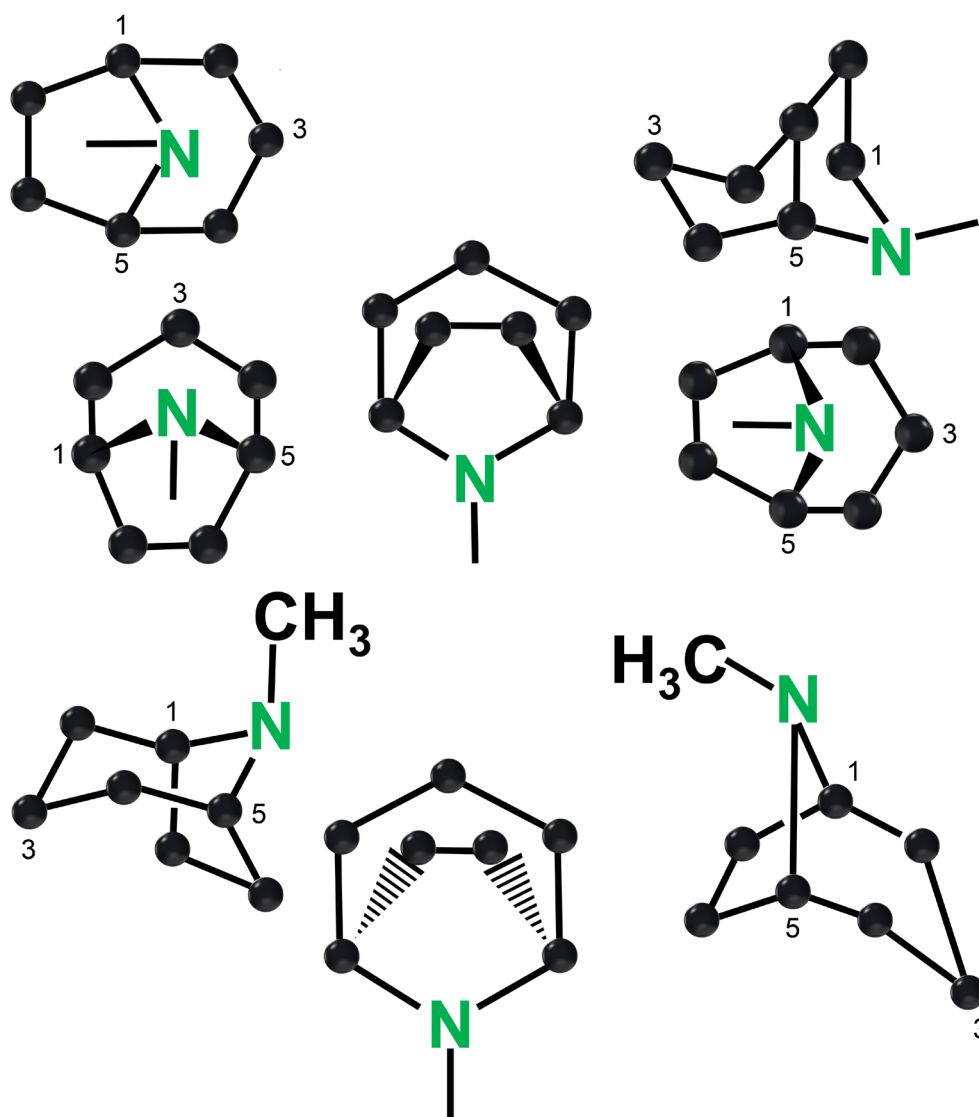


Figure 1 Structure of tropane alkaloids (1R, 5S)-8-methyl-8-azabicyclo [3.2.1] octane [**1**]

The tropane alkaloids include about 200 different molecules, including mono-, di- and tri-esters, as well as carboxylated and benzoylated compounds [**2**, **3**]. The most important and most commonly occurring tropane alkaloids are atropine and Scopolamine. Atropine is in fact a racemic mixture of D-hyoscyamine and L-hyoscyamine (Figure 2) [**4**], the latter being predominantly responsible for the physiological effects (anticholinergic effect) which will be discussed later [**5**].

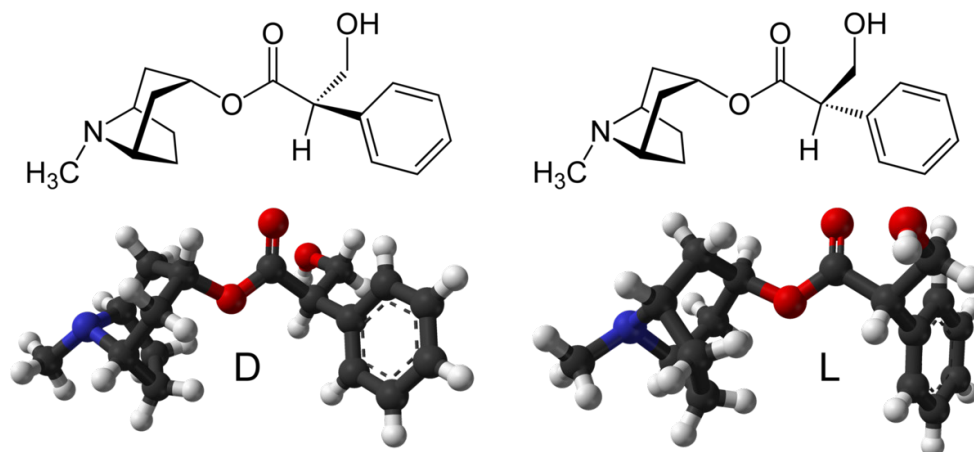


Figure 2 Structure of D- and L-hyoscyamine [4]

Atropine - depending on the dose - is a potentially lethal poison, named after Atropos (The Inflexible One) in Greek mythology, one of the Moirai (Goddesses of Fate), who cuts the thread of life with her scissors and thus decides who will die (Figure 3) [6, 7]. Atropine is listed in the 8th edition of Hungarian Pharmacopoeia as Atropineum.



Figure 3 The Three Fates Clotho, Lachesis, and Atropos by Giorgio Ghisi [7]

Tropane alkaloids are found in various plant families, such as *Brassicaceae* (*Cruciferae*) (“mustard” family), *Convolvulaceae* (“bindweeds” family), *Erythroxylaceae* (“coca” family), *Euphorbiaceae* (“spurge” family), *Olacaceae*, *Proteaceae*, and *Rhizophoraceae* (“mangrove” family), but most commonly in the *Solanaceae* (“nightshade” or “potato”) family [2]. The latter family includes about 100 genera and 3000 species. In particular, the genera *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Scopolia*, *Anisodus*, *Przewalskia*, *Atropanthe*, *Physochlaina*, *Mandragora*, *Anthotroche*, *Cyphantera*, and *Duboisia* are rich in tropane alkaloids [2]. The well-known members of the *Solanaceae* family are mandragora, henbane, nightshade and jimson weed as well as their edible relatives, potato, tomato and eggplant. The tropane alkaloids are most abundant in the genera *Datura* and *Brugmansia*. The best known plants containing tropane alkaloids and their constituents are summarised in Table 1.

Table 1. Plants and plant parts containing tropane alkaloids based on Adamse et al. [8]

Plant			Tropane alkaloids (TA)	Plant parts contain tropane alkaloids
Botanical name	Hungarian name	English name		
<i>Atropa belladonna</i>	Nadragulya	Deadly nightshade	Scopolamine, hyoscyamine, atropine, kalistegin	Berry, leaf, root
<i>Datura stramonium</i>	Csattanó maszlag	Jimsonweed, thornapple	Scopolamine, hyoscyamine, atropine	Leaf, root, seed, flower
<i>Datura suaveolens</i> (<i>Brugmansia suaveolens</i>)	Angyaltrombita	Angel's tears, snowy angel's trumpet	Scopolamine, hyoscyamine	Leaf, flower, seed
<i>Datura tatula</i>	Métel	Jimsonweed, thornapple	Atropine	Leaf, flower, seed
<i>Duboisia myopoides</i>	Parafa	Corkwood	Scopolamine, atropine	Leaf
<i>Hyoscyamus niger</i>	Bolondító beléndek	Henbane, black henbane, stinking nightshade	Scopolamine, hyoscyamine, atropine, kalistegin	Leaf, flower, seed
<i>Lycium barbarum</i>	Közönséges ördögcérna	Wolfberry, goji berry	Atropine	Berry
<i>Mandragora officinarum</i>	Mandragóra	Mandrake	Scopolamine, hyoscyamine, atropine	Root, berry
<i>Calystegia sepium</i>	Sövényszulák	Hedge false bindweed	Kalistegin	Leaf, root
<i>Convolvulus arvensis</i>	Apró szulák, mezei szulák	Field bindweed	Kalistegin	Leaf, root
<i>Physalis alkekengi</i>	Lampionvirág, páponya	Bladder cherry, Chinese lantern, etc.	Kalistegin	Leaf
<i>Physalis peruviana</i>	Perui földicseresznye, pohá, zsidócseresznye	Cape gooseberry, goldenberry	Tigloidin, seco tropane alkaloids	Root
<i>Erythroxylum coca</i>	Kokacserje	Coca	Several alkaloids, including cocaine	Leaf

Some of the plant species containing tropane alkaloids described above may be consumed as food, for example members of the *Brassicaceae* (*Cruciferae*) and *Solanaceae* families, but human exposure is not expected as plant parts consumed by humans, such as potato tubers or tomato fruits, do not contain tropane alkaloids. However, almost all of the plants containing high levels of tropane alkaloids in various plant organs can be found as weeds in the environment of cultivated or free-growing but edible plants, and therefore exposure of tropane alkaloids from them is most often due to accidental consumption [8]. Table 2 shows the alkaloid content of the most common weeds containing tropane alkaloids in various plant parts, including *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*.

Table 2. Tropane alkaloid content of different plant species and plant parts (mg/kg dry matter)

Species (place of origin)	Plant part	(-)-Hyoscyamine	(-)-Scopolamine	Total tropane alkaloids	Reference
<i>D. stramonium</i> (USA)	Seed	1690-2710	360-690	2050-3400	[9]
<i>D. stramonium</i> (Italy)	Root Shoot Leaf Flower Seed	Nd121 1-915 134-831 270-299 170-387	Nd-14 Nd-129 16-73 66-106 12-89	Nd-135 1-1044 172-378 336-405 182-476	[10]
<i>D. stramonium</i> (different variants)	Leaf Seed	425-1655 710-1380	230-715 520-1275	1000-1855 1235-2655	[11]
<i>D. stramonium</i> (Italy)	Seed	1280	680	1960	[12]
<i>D. stramonium</i> (<i>D. var. tutala</i>) (Hungary)	Shoot Leaf Flower	360-5910 430-4710 1690-3970	20-3320 130-1790 1360-2740	380-8830 560-6430 3050-6710	[13]
<i>D. ferox</i> (Argentina)	Root, Shoot Fruit Leaf Seed	x	36-900 29-200 40-3200 130-210 1500	x	[14]
<i>D. ferox</i> (Argentina)	Seed	Nd	610-820	610-820	[15]
<i>A. belladonna</i> (Germany)	Root Leaf	5290 2500-9200	51 20-280	x	[16]
<i>A. belladonna</i> (Europe)	Root Leaf Seed	500-3700 500-4900 1200-6900	nd-900 nd-500 nd-500	500-4000 700-5100 1300-7300	[17]
<i>A. belladonna</i> (Germany)	Root, shoot Leaf Seed	3700 1800-3900 960-1400 2800-9200	100 70-130 90-130	x	[18]
<i>A. belladonna</i> (Iran)	Root Shoot Leaf	570-880 740-770 190-1200	17-31 28-180 23-470	x	[19]
<i>A. acuminata</i> (Iran)	Leaf	900-1200	140-470	x	[19]
<i>A. baetica</i> (Spain)	Root	1000-10000	600	x	[20]
<i>H. niger</i> (Bulgary)	Seed	140	430	570	[21]

nd: not detectable

x: no information available

4. Physiological effects

The tropane alkaloids are antimuscarinic compounds, blocking the muscarinic receptors of smooth muscles in the bronchi, of glands and of nerve endings, inhibiting muscle contraction and secretion, as well as increasing the release of neurotransmitters. The tropane alkaloids are parasympathetic neuromuscular paralyzers, which affect cardiac and respiratory frequency, they are smooth muscle antispasmodics and they also reduce saliva, gastric juice and protein secretion. At doses of 3.0 to 8.0 mg they excite the central nervous system, but above 10 mg they paralyse its function. The compounds are characterised by their rapid and complete absorption through the mucous membrane [22].

The human physiological effects of atropine vary widely depending on the dose. Ingestion of 0.5 mg of the compound causes a slight slowing of the heart rate and mild dry mouth, and it inhibits the secretion of sweat. A dose of 1.0 mg produces more severe dry mouth, a feeling of thirst, rapid heart rate and dilated pupils. At 2.0 mg, rapid heart rate, palpitation, dilated pupils and blurred vision occur. At intakes above 5.0 mg, the above symptoms are accompanied by slurred speech, restlessness, headache and dry and hot skin. At intakes above 10.0 mg, the above symptoms are accompanied by a rapid and weak pulse, blurred vision, skin erythema, ataxia, hallucination, delirium and finally coma [23].

The primary symptoms of atropine poisoning are dilated pupils, inhibited saliva production, hyperthermia and decreased respiratory rate and heart rate. The central nervous system is also affected, and drowsiness and depression may occur. The final outcome of the poisoning process is circulatory failure and coma. Individual sensitivity is highly variable, with lethal doses ranging from 100 to 1000 mg, 10 mg in children. Scopolamine intoxication also results in dilated pupils, inhibition of saliva production, a decrease in heart rate at low doses, but an increase at higher doses. Its effect on the central nervous system is the opposite of atropine, i.e. it stimulates it. The lethal dose of scopolamine is 100 mg, which causes respiratory paralysis and eventual death [24].

Poisoning can occur on a single exposure, with an incubation period of up to 6 hours, and the route of exposure is most often oral, but inhalation also occurs. Tropane alkaloids are absorbed via the gastrointestinal tract [25]. Toxic effects often occur within 60 minutes of ingestion and sub-lethal clinical signs may persist for up to 24-48 hours [26]. Without treatment, consumption of 2-5 berries (seeds) of deadly nightshade can be fatal for children and 10-20 berries for adults. Jimson weed poisoning can be detected 60 minutes after ingestion. Clinical signs persist for 24-48 hours. A jimson weed seed weighs about 8 mg, therefore about 100 seeds are equivalent to 10 mg of atropine [27].

Acute therapy is immediate decontamination (gastric and/or bowel lavage, enema), but it can be applied to 12 hours after poisoning. The antidote for poisoning is physostigmine (0.02 mg/kg body weight), which should be used with caution because of its significant cardiac side effects [28]. Symptomatic supportive treatment may include physical cooling, sedation, fluid replacement, beta-blocker administration and catheterisation. When providing first aid, the priority is to prevent the absorption of poison by vomiting, gastric emptying or giving activated charcoal, reducing thirst with fluid intake and reducing body temperature with an ice compress [29].

5. Interesting facts about tropane alkaloids

There are more than 520 tropane base compounds that have a CAS number. The CAS registration number of tropane is 529-17-9 [30]. In the CAS database, cocaine [50-36-2] was the first tropane derivative registered, while tesofensine [402856-42-2] was the last [31, 32]. Most naturally occurring tropane derivatives are natural deliriants. The term “Bella donna” (*Atropa belladonna*) means “beautiful lady” and was given its name in the Renaissance era because ladies often dripped into their eyes a juice from the atropine-containing fruit of *A. belladonna*, which dilated their pupils and made them look beautiful [33].

Between the 1910s and the 1960s, a mixture of scopolamine and morphine was used as a sleeping pill to produce twilight sleep during childbirth. The administration of the mixture induced a semi-conscious state during labour and the birth process was lost from the mother’s memory [34].

Jimson weed was named after Jamestown, USA, where British soldiers were poisoned in 1676 by eating a vegetable salad, with symptoms of delirium and hallucinations for 11 days [35].

Homatropine was a synthetic drug, a semi-synthetic ester synthesised by Ladenburg and marketed by the E. Merck Company in 1883 as a pupil dilator [36]. The best known tropane derivative is cocaine, which has been used as a drug and narcotic since 3000 BCE. Examples of cocaine-containing products included toothache pastilles [37] and French Tonic Wine [38] [39] (Figure 4-5). Coca Cola is another popular drink containing cocaine-free extracts of coca bush. Initially, Coca Cola did contain cocaine, and the cocaine-free version appeared after the enactment of the Pure Food and Drug Act of 1906 [40]. Figure 6 shows an advertisement for Coca Cola from 1902 [41].

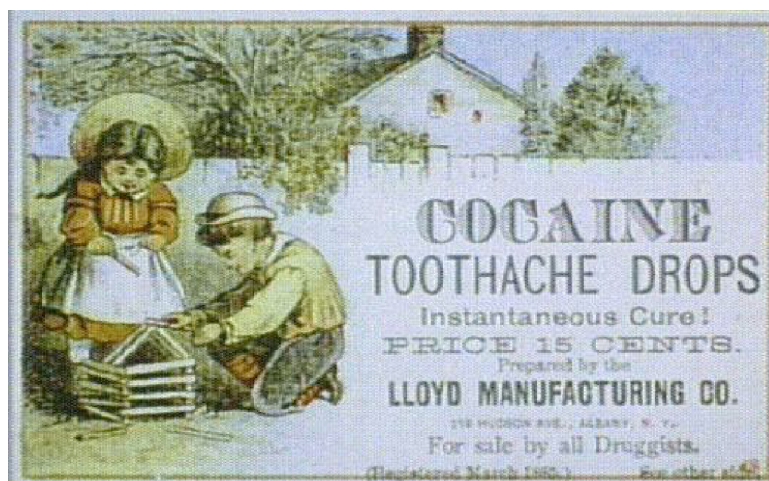


Figure 4 An advertisement for a cocaine toothache pastille from 1885 [37]



Figure 5 Jules Chéret, *Vin Mariani. Popular French tonic wine...*, 1894. Lithographic poster, published by Imprimerie Chaix; 123 × 86.3 cm. [38, 39]



Figure 6 Coca Cola advertisement from 1902 [41]

The structure of tropane alkaloids and cocaine was described by Richard Martin Willstätter (1872-1942). In 1903 he discovered the method of synthesising tropane, a discovery considered a fundamental milestone in organic chemistry. Willstätter also won the Nobel Prize in Chemistry in 1915, mainly for his discovery of the structure of chlorophyll and other plant pigments [42].

Tropane derivatives are among the most economically important pharmaceuticals [43]. The pharmaceutical industry produces more than twenty tropane-based active pharmaceuticals with a wide range of uses: pupil dilators, antiemetics, anticonvulsants, analgesics and bronchodilators [5]. L-hyoscyamine is used for peptic ulcer, irritable bowel syndrome and Parkinson's disease, cocaine is a local analgesic, tiotropium bromide is used for COPD, and ipratropium bromide is used for asthma [8].

6. Use, administration and intentional and unintentional consumption of tropane alkaloids

The tropane alkaloids, mainly atropine, are officially listed as medicinal products in the European Pharmacopoeia VII (VII Ph. Eur.) and have a wide range of therapeutic uses, treatment of dilated pupils, nausea, motion sickness, intestinal spasms, bradycardia and other cardiac and respiratory diseases [44]. Atropine is recommended in traditional Chinese medicine for the treatment of arthritis [45].

In folk medicine, atropine is used to relieve nerve spasms, rheumatism and spasms, and in asthma cigarettes (inhalation) to reduce bronchospasms and salivation [46], but its use as a home remedy can be dangerous due to the potential for overdose. It is also used as a drug because of its hallucinogenic effects [46].

In case of unintentional use or contamination, poisoning may occur due to misguided use or aftereffects, intentional ingestion, or abuse (overdose) of the plant material. Contamination occurs mainly during the cultivation and harvesting of edible plants, when weeds containing tropane alkaloids, mainly *Datura stramonis*, *Atropa belladonna* and *Hyoscyamus niger* species, appear in large quantities among edible plants.

Commercial seeds sold in bulk, soya and other legumes, cereals and pseudocereals (wheat, maize, sorghum, millet, buckwheat), sunflower and linseed may be contaminated with seeds of jimson weed, angel trumpet or henbane. These weeds mature with the grain forage and are mixed into the forage at harvest. Weed seeds are similar in size, shape and colour to the seeds of edible crops, so they are difficult to remove by sorting or cleaning. This type of contamination can also lead to serious poisoning. For example, in Uganda in 2019, a humanitarian food aid product (known as Super Cereal, a product made from maize and soya) was contaminated with tropane alkaloids from jimson weed, resulting in 300 people being hospitalised and five deaths [47].

Of particular relevance to human nutrition are contaminated cereals, pseudocereals and pulses, as these foods are part of the diet of almost all age groups. One of the most studied pseudocereals in relation to the occurrence of tropane alkaloids was buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.), which is rich in polyphenols, vitamins and proteins, and is also gluten-free. Other gluten-free crops, such as amaranth, chickpeas, green peas, maize, rice, millet, quinoa and their products, breads, pastries, pasta, confectionery and snacks are becoming increasingly popular not only among gluten-sensitive consumers but also among those who are more health-conscious. This makes it increasingly important to carefully monitor the presence of tropane alkaloids in these products. There are many publications in the literature that show the tropane alkaloid contamination of such raw materials, some of which are presented in Table 3.

Table 3. Tropane alkaloid contamination of foods according to Gonzales-Gómez et al. [48]

Sample (number of samples)	Atropine-containing samples (concentration)	Scopolamine-containing samples (concentration)	Reference
Breakfast cereal, breakfast cereal with milk, biscuits, cake (113 samples)	21 breakfast cereals (0,09–65,6 µg/kg)	18 breakfast cereals (0,28–15,2 µg/kg)	[49]
Flours (buckwheat, millet, corn), cereal-based foods for children, breakfast cereals, biscuits, pastries, breads, legumes cooking oil mixes, oilseeds (1305 samples)	46 flours (0,5–149 µg/kg), 42 cereal-based foods for children (0,5–3,73 µg/kg), 15 breakfast cereals (0,5–90,83 µg/kg), 24 biscuits, pastries (0,5–1,85 µg/kg), 18 bread (0,5–3,80 µg/kg), 20 legumes, cooking oil mixes, oilseeds (0,5–0,11 µg/kg)	46 flours (0,5–199 µg/kg), 42 cereal-based foods for children (0,5–1,86 µg/kg), 15 breakfast cereals (0,5–17,64 µg/kg), 24 biscuits, pastries (0,5–0,65 µg/kg), 18 bread (0,5–0,36 µg/kg), 20 legumes cooking oil mixes, oilseeds (0,5–0,09 µg/kg)	[50]
Buckwheat, buckwheat flour and pasta; soy and soy flour; hulled millet and millet flour; flaxseed and flaxseed meal (15 samples)	1 buckwheat (<1 µg/kg) 1 millet flour (13 µg/kg)	1 buckwheat (<2 µg/kg) 1 millet flour (23 µg/kg)	[51]
Organic buckwheat flour, pasta and pastries (26 samples)	1 flour (83,9 µg/kg) 1 pasta (21,3 µg/kg) 1 pastry (13,9 µg/kg)	1 flour (10,4 µg/kg) 1 pasta (5,7 µg/kg)	[52]
cereal-based foods for children (biscuits, snacks, grissini) (18 samples)	1 snack (11,5 µg/kg)	1 snack (2,8 µg/kg)	[53]
Wheat, corn, rice, oat and millet flour, mixed cereal flours, cereal products for babies, cereal-based products (95 samples)	1 tomato rice flakes (9,6 µg/kg)	1 tomato rice flakes (2,6 µg/kg)	[54]

Sample (number of samples)	Atropine-containing samples (concentration)	Scopolamine-containing samples (concentration)	Reference
Buckwheat and buckwheat flour, quinoa, amaranth, teff flour, refined corn flour, corn flour, blue corn flour, sorghum flour, hulled millet, green and red lentil flour, chickpea flour, pea flour (15 samples)	3 Buckwheat and buckwheat flour (6,7–21 µg/kg), 1 quinoa (7,1 µg/kg), 1 teff flour (78 µg/kg), 1 refined corn flour (7 µg/kg), 1 sorghum flour (15 µg/kg), 1 hulled millet (6,9 µg/kg)	1 of teff flour (28 µg/kg)	[55]
Green tea, black tea, chamomile, fennel, lemongrass, peppermint, rooibos (70 samples)	1 fennel (83 µg/kg) 8 peppermint (20–208 µg/kg)	1 fennel (11 µg/kg) 8 peppermint (20–208 µg/kg) 1 chamomile (2.1 µg/kg) 1 of rooibos (2 µg/kg)	[56]
Dried herbs (for infusion) (121 samples)	85 dried herbs (0,0067–295 µg/kg)	85 dried herbs (0,0067–134 µg/kg)	[55]
Thyme, basil, coriander (16 samples)	5 thyme (<5–5,7 µg/kg) 5 basil (9–11,7 µg/kg) 4 coriander (9,9–42 µg/kg)	2 thyme (<5 µg/kg) 1 coriander (34 µg/kg)	[57]

Common poisoning, especially in the cases of children, comes from consuming a misidentified plant, for example mistaking the fruit of nightshade for blueberry. There are records of misidentification of *Atropa belladonna* for mallow leaves (*Malva silvestris*); of the leaves of *Datura stramonium* when used as herbal infusion for nettle, mallow leaf and *Symphytum officinale*; of the root of jimson weed for *Arcticum lappa* when using traditionally as blood-cleansing, diuretic and skin-cleansing herbal infusion; and *Datura* flower for *Paulownia* (foxglove tree) as a green salad [8, 58]. For excellent summaries of poisoning cases related to contamination, mistaken identification or intentional overdose, see, among others, the publications by Adamse et al. 2010 and 2014 [8, 58].

The presence of tropane alkaloids in food of animal origin (milk, eggs, meat) from animal feed contamination can be the result of carry-over intake. In the case of raw feed, the relevance and possibility of this is very limited, as animals refuse to eat feed contaminated with tropane alkaloids because of the characteristic and unpleasant taste and smell of the weed. In the case of a dried feed mixture, the presence of weed seeds is no longer detected by the animals, so the resulting exposure is possible. Tropane alkaloids are not sensitive to heating and drying. 72 to 100% of the toxin can be detected in the product after baking bread made from flour contaminated with *Datura* seeds [9], so it is understandable that its presence in dried feed can be significant. However, in dried feed mixtures, the presence of dry *Datura* seeds can cause severe toxicity and mass mortality in farm animals, especially pigs, which are sensitive to the toxin [59]. According to EU Directive 2002/32/EU, a 'worst case exposure' estimate of 3000 mg/kg *Datura ferox* seed intake in feed may cause severe adverse reactions in piglets [60]. However, the absorption, degradation and elimination of tropane alkaloids is a rather rapid process and they are not stored in organs and tissues, and therefore human poisoning is not expected when consuming farm animal meat [59].

Other cases of poisoning are from intentional use or overdose, partly when used as a drug because of hallucinogenic effects, or for therapeutic purposes (arthritis treatment, anaesthesia). Pathological cases of intentional intoxication are homicide and suicide. In some cases, atropine is also used as an antidote for organophosphate poisoning [61].

Unfortunately, Hungarian data on tropane alkaloid contamination of food and resulting poisonings are not available, although data regarding accidental or intentional poisoning are available from the Hungarian Toxicological Information Service [62]. According to these data, *Brugmansia* and *Datura* species were the most common poisoning species in Hungary. According to a survey conducted between 2005 and 2017, *Brugmansia* species accounted for 1-7%, *Datura* species for 1-16%, *Convallaria majalis* for 6-20% and *Taxus baccata* for 8-19% of the plant taxa that regularly caused poisonings.

7. Impact of food processing on tropane alkaloids

Tropane alkaloids are relatively heat stable. Studies by List and Spencer have shown that processing soybeans also reduces the amount of hyoscyamine and scopolamine present as impurities, with 90% of the former and 84% of the latter remaining in the defatted soybean meal. In unrefined soybean oil, about 0.1%

of the original alkaloid content was present, and more than 90% of this was lost due to alkaline refining and washing of the oil [63]. During baking of wheat bread contaminated with cracked jimson weed seeds, heat treatment reduced the concentration of tropane alkaloids by 0-28% [9]. Cooking of žganci (porridge-like dish) made from buckwheat flour contaminated with tropane alkaloids reduced the concentrations of atropine and scopolamine by 60 and 40%, respectively [64].

Marín-Sáez et al. studied buckwheat and millet flours contaminated with *Datura stramonium* and *Brugmansia arborea*, subjected to rising (37 °C) and baking (190 °C) processes [65]. During the rising process, the concentration of tropane alkaloids decreased (13-95% degradation), whereas under baking conditions they almost disappeared (94-100% degradation). Also, Marín-Sáez's research group investigated the degradation of tropane alkaloids from pasta and green tea [66]. Pasta was boiled at 100 °C for 10 minutes, tea was prepared with water at 100 °C and allowed to cool for 5 minutes. The pasta and green tea were contaminated with seeds of *Datura stramonium* and *Brugmansia arborea*, while the coca leaf tea was analysed directly. Degradation studies showed that the concentration of tropane alkaloids decreased and this was dependent on the compound, with the greatest degradation being observed for the compounds tropinone, tropane, cuscohygrine and tropine, but it was also observed that the compounds migrated to the aqueous phase during cooking [66].

The latest study reports on the tropane alkaloid content of gluten-free bread sticks made from corn flour contaminated with jimson weed. Thermal degradation studies showed a decrease in the amount of tropane alkaloids during baking (180 °C, 20 minutes), ranging from 7-65% for atropine and 35-49% for scopolamine and anisodamine, depending on the conditions used [67].

8. Food safety legislation in feed and food

The presence of tropane alkaloids as potentially toxic compounds in foods for general consumption, food supplements, foods for particular nutritional uses and food served in catering is undesirable. The marketing of safe food is a fundamental requirement and is therefore governed by EC Directive 178/2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety [68].

The European Union has had to wait a long time for effective regulation. Surprisingly, the regulation for farm animals was introduced before the regulation for humans. Regulation 2002/32/EC on undesirable substances in animal feed stipulates that weed seeds and unground or uncrushed fruits, including the seeds of the jimson weed seeds containing alkaloids, glucosides or other toxic substances, either singly or in combination, may be present up to a maximum of 3000 mg/kg, and *Datura stramonium* L. seeds at a maximum of 1000 mg/kg in animal feed with a moisture content of 12% [60].

In its statement, the European Food Safety Authority (EFSA) concluded in 2008 that tropane alkaloids do not enter the food chain via food of animal origin and therefore do not pose a risk to consumers. However, the scientific panel that drafted the position paper drew attention to the importance of validating methods for the measurement of tropane alkaloids [59].

5 years later, in 2013, EFSA issued a new expert opinion on tropane alkaloids in food and feed [69]. Based on the available data, EFSA established an Acute Reference Dose (ARfD) of 0.016 µg/kg body weight expressed as the sum of (-)-hyoscyamine and (-)-scopolamine, assuming equivalent potency. In addition, it concluded that, although information is rather limited, it indicates that the dietary exposure of young children to tropane alkaloids may significantly exceed the group acute reference dose.

Based on the EFSA's opinion, Commission Regulation (EC) No 2016/239/EC [70] amending Regulation (EC) No 1881/2006 [71] was published setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards maximum levels for atropine and scopolamine in processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children containing millet, sorghum, buckwheat or products thereof. Accordingly, the maximum levels for atropine and scopolamine in those foods are set at 1.0 µg/kg each.

In its 2013 position paper [69], the EFSA highlighted the need for more detailed characterisation of tropane alkaloids naturally occurring or present as contaminants in food and feed, and for the collection of analytical data on their occurrence in cereals and oilseeds. Collection of these analytical data was carried out on the basis of the Recommendation of the European Commission to food business operators in the Member States to monitor tropane alkaloids [72]. The Recommendation called on the food safety authorities of the Member States to monitor the presence of tropane alkaloids with the active involvement of food business operators in foodstuffs, in particular in cereals and cereal products (buckwheat, sorghum, millet, maize and flours thereof), cereal-based foods for infants and young children, breakfast cereals, mill products, seeds for human consumption, gluten-free products, food supplements, teas and herbal teas, leguminous vegetables (without pods), pulses and oilseeds and products derived from them [72].

In 2016, a summary study presenting the results of an ad hoc data collection study on the prevalence of tropane alkaloids in food in nine Member States was published [50]. Following the assessment of the results, in 2018 EFSA issued a scientific report on acute dietary exposure of the EU population to tropane alkaloids [73]. The report was updated in 2019. This report describes the estimated human acute dietary exposure to tropane alkaloids based on data from 17 European countries and one association, Tea & Herbal Infusions Europe, using nearly 45 000 analytical data from about 7,900 food samples (6 943 atropine and 6 897 scopolamine measurements, 14 851 other *Datura*-type tropane alkaloids and 15 493 other tropane alkaloids) from 2009-2016 to 2019. The most abundant tropane alkaloids were atropine (in 15.7% of the samples); and scopolamine (in 15.6% of the samples) [73].

High levels of atropine contamination were present in hemp seeds (77.2 µg/kg), in various spices (e.g. coriander seeds 35.0 µg/kg, fennel seeds, 6.1 µg/kg), teas and brews (green tea 10.01 µg/kg), in cereal bars (average 6.3 µg/kg). Scopolamine was present in relatively high concentrations in hemp seed (64.9 µg/kg), in teas and infusions (chamomile flower 11 µg/kg, green tea 10 µg/kg) and spices (coriander seed 22 µg/kg), while calystegine A3 contamination was detected in potatoes and potato products (107 µg/kg) [73].

The combined average acute dietary exposure to atropine and Scopolamine was highest in infants: 1-19 ng/kg bw/day, but the exposure in older children was similarly high: 2-19 ng/kg bw/day in young children and 1-18 ng/kg bw/day in children under 18 years of age. Acute exposure to tropane alkaloids was estimated to exceed the acute reference intake (16 ng/kg bw/day) in many population groups (but especially in the young, vulnerable age group) and it was also found that bread and cereal products were the largest contributors to the combined exposure to atropine and scopolamine for all age groups. The survey data indicate that tropane alkaloids, in particular atropine and scopolamine, are present in the food chain in quantities to cause concern.

On this basis, Regulation (EC) No 1881/2006 was amended again in 2021 to set maximum levels for cereals, cereal products and certain herbal sources [74] (Table 4).

Foodstuffs listed in the Annex to Regulation 2021/1408 that were lawfully placed on the market before 1 September 2022 may remain on the market until their date of minimum durability or use-by date. The regulation continues to give priority to foods intended for infants and young children and maintains the previous values of 1-1 µg/kg for atropine and scopolamine. In addition, a wide range of foods of plant origin, cereals (maize, millet, sorghum), pseudo-cereals (buckwheat) and herbs are also affected. In view of the case of caraway seed contamination poisoning in Hungary (see below), the range of foods covered appears to be incomplete and it would have been appropriate to include herb seeds in the maximum level for tropane alkaloids.

Table 4. Maximum permitted levels of tropane alkaloids (atropine, scopolamine) in foodstuffs under Regulation (EC) No 1881/2006, consolidated version [70, 74]

Foodstuffs	Maximum level (µg/kg)	
	Atropine	Scopolamine
Processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children, containing millet, sorghum, buckwheat, maize or their derived products	1,0	1,0
	Sum of atropine and scopolamine	
Unprocessed millet and sorghum	5,0 as from 1 September 2022	
Unprocessed maize with the exception of unprocessed maize intended to be processed by wet milling and unprocessed maize for popping	15 as from 1 September 2022	
Unprocessed buckwheat	10 as from 1 September 2022	
Maize for popping	5,0 as from 1 September 2022	
Millet, sorghum and maize placed on the market for the final consumer		
Milling products of millet, sorghum and maize	10 as from 1 September 2022	
Buckwheat placed on the market for the final consumer		
Milling products of buckwheat	25 as from 1 September 2022	
Herbal infusions (dried product) with the exception of the herbal infusions referred to in below cell		
Herbal infusions (dried product) of anise seeds	50 as from 1 September 2022	
Herbal infusions (liquid)	0,20 as from 1 September 2022	

The EU Directive 46/2002/EC and the Hungarian legislation [(37/2004). IV. 26. decree of the Minister of Health (ESZCSM)] on food supplements do not provide specific guidance on substances harmful to health, their use in food supplements, the permitted amounts, limits, etc. [75, 76]. However, the Expert Panel convened after the accession to the European Union by the National Institute of Pharmacy and Nutrition (formerly the National Institute for Food and Nutrition Science, OÉTI) in 2006 has compiled a list of plants not recommended for use in food, including food supplements [77]. These include a number of plants or parts of plants containing tropane alkaloids, such as *Atropa belladonna*, *Hyosciamus niger*, *Mandragora officinarum*, *Scopolia* sp., *Datura stramonis*, *Solanum nigrum*, *S. dulcimara*, *Brugmansia* sp. It is worth noting that the fruit (fruit, goji berry) of *Lycium barbarum* was previously included in this negative list, given that a publication in 1989 [78] reported that the fruit contained (as determined by thin layer chromatography - TLC) 0.95% atropine and 0.29% (-)-hyoscyamine. The author also indicates that these tropane alkaloids are present in similar amounts in the root and in the fresh shoot. However, Drost-Karbowska, in her 1984 publication, does not report tropane alkaloids in *Lycium barbarum* fruit [79]. Adams, in 2006, detected 19 µg alkaloids/kg fruit using HPLC-MS techniques, while Potterat (2010) could not confirm the presence of tropane alkaloids in fruit [80, 81]. With reference to the latter data, the negative list mentioned above does not currently include *Lycium barbarum* fruit.

9. Presence of tropane alkaloids in food, RASFF alerts

The European Union's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) has 67 events (alerts, information, rejections at the border) related to tropane alkaloids between 2006 and the beginning of August 2022 [82]. The vast majority of affected foods are cereal products: millet (golden, brown) flour and products, sorghum, buckwheat, as well as foods for young children (cereal flakes), maize (flour, popcorn), spinach, cumin seeds, peppermint, muesli, oat and soy flakes, herbal teas, crisps (Figure 7). In all cases, tropane alkaloids were present as impurities in the products. In most cases, the source of tropane alkaloids was jimson weed (*Datura stramonium*) and black nightshade (*Solanum nigrum*), but in most cases only the presence/amount of atropine and scopolamine was reported in the RASFF database.

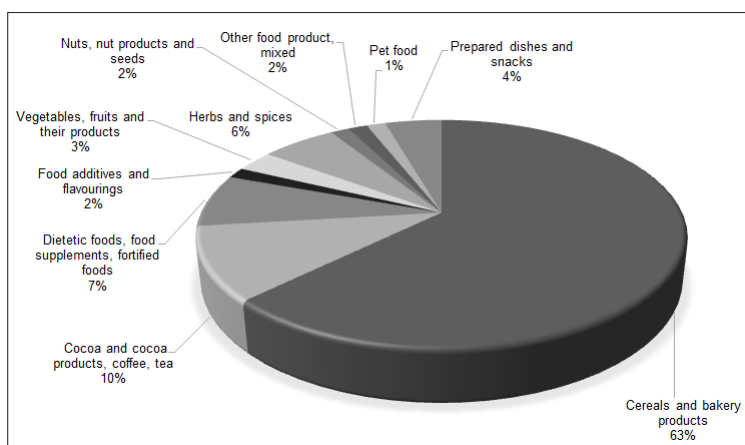


Figure 7 Distribution of food types in the European Union's RASFF system for tropane alkaloid notifications, 2006-2022 July

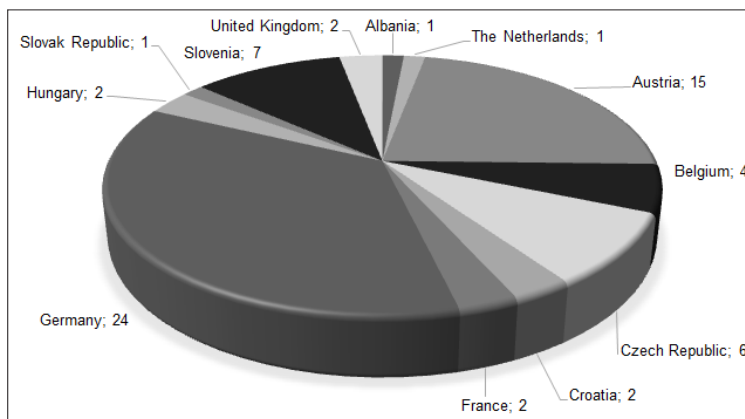


Figure 8. Distribution of RASFF cases involving tropane alkaloids by reporting country (2006-2022)

Most of the notifications came from Germany (24) and Austria (15) (**Figure 8**), but contaminated food reached more than 40 countries, affecting almost all EU Member States, but also China, Japan, Senegal, Bahrain, Switzerland, South Africa, Andorra, Bosnia and Herzegovina, etc. The highest number of notifications of tropane alkaloids was in 2015 (**Figure 9**), with Germany and Austria reporting 4-4 products and the Czech Republic reporting one case to RASFF.

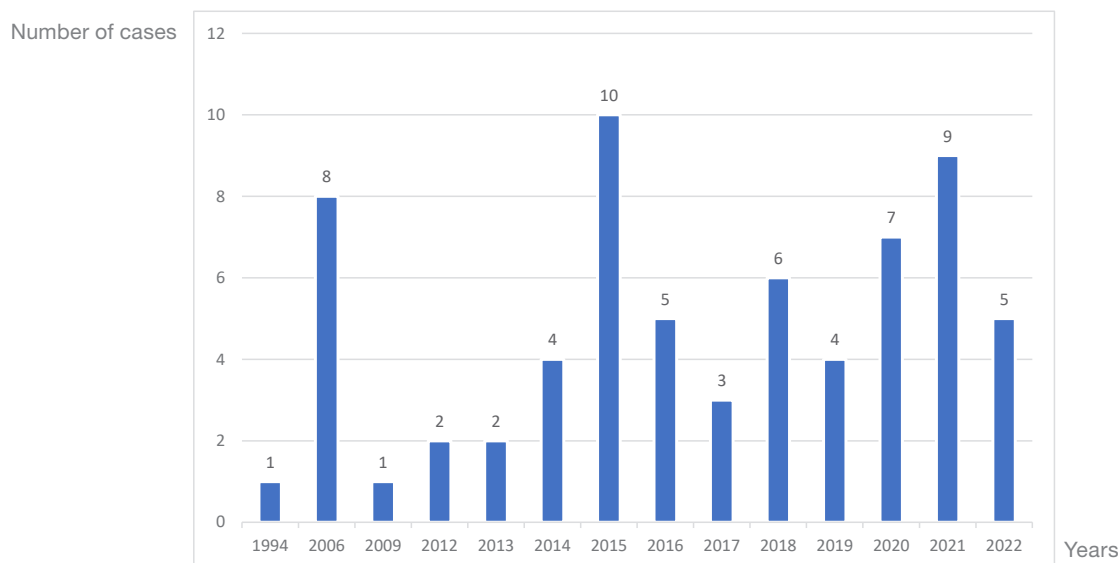


Figure 9 Number of RASFF notifications on tropane alkaloids by year, 1994, 2006-2022

Of the 67 incidents, 22 involved Hungary, either because the raw material originated from Hungary (11 cases) or because the product was or could have been placed on the Hungarian market (11 cases). Hungary has notified two cases of food contaminated with tropane alkaloids to the RASFF system. One of the foodstuffs is the caraway seed contaminated with jimson weed, which received a lot of press coverage in 2018, which was clearly reported on the RASFF portal as the source of contamination was a Hungarian product (2018.0774). The other Hungarian notification relates to a Polish oatmeal, in which the Hungarian authority also found jimson weed (2020.5838). Frozen yellow beans containing jimson weed seeds produced and marketed by different companies, which appeared on the website of the National Food Chain Safety Office (NFCSO) and in several press releases in 2021-2022, are not included in the RASFF.

In 2006, *Datura* seeds (130 seeds/kg) were found in organic millet from Hungary and Austria (2006.0833), and seeds of jimson weed were also found in red millet for animal feed in 2009 (2006.BYZ). In 2009, Slovenia reported to RASFF 110 µg/kg atropine and 47 µg/kg scopolamine in buckwheat flour from Hungary (2009.0558). In 2104, German authorities found atropine (46 µg/kg) and scopolamine (25 µg/kg) in brown millet (*Uroclora ramosa*) flour from Austria, where the raw material originated in Hungary and the Netherlands (2014.1652). In March 2015, three consecutive alerts were released from Austria included Hungarian raw material, with 481 µg/kg atropine and 533 µg/kg scopolamine in organic puffed millet, 384 µg/kg atropine and 388 µg/kg scopolamine in puffed millet and 304 µg/kg atropine and 358 µg/kg scopolamine in millet balls (2015.0338, 2015.0339, 2015.0399). In 2016, atropine (23.5 µg/kg) and scopolamine (9.5 µg/kg) were again detected in millet flour (2016.1298). The year 2018 was about caraway seeds (see later), in 2021 the German authorities detected atropine (100 - 238 µg/kg) in organic flaxseed meal from Hungary (2021.6052), in 2021 also the German authorities reported the presence of tropane alkaloids in Hungarian parsley in RASFF (2021.3836), but no specific measurement results are available in the database.

Tropane alkaloid contamination of products entering Hungary was reported in RASFF in 2006 in organic millet flours (2006.0737, 2006.0833), in 2014 in two cases in cereal-based baby foods from Germany (2014.1694, 2014.1596), in 2015 in brown millet and in a maize flour-based product (2015.0203, 2015.0210). In 2018, atropine and scopolamine were detected in vegetable source material from Poland (exact composition unknown) (2018.2009), in popcorn from France (2018.1447) and in organic Austrian muesli ((2018.2695) also marketed in Hungary. In 2020, Polish oatmeal contaminated with jimson weed seeds (2020.5838) and organic soybean meal containing atropine and scopolamine (2020.0366) were sold market. In 2022, multi-flavoured corn chips from Germany were sold in Hungary (2022.3840) (tropane alkaloid measurement results are not available on the RASFF website until the manuscript is closed).

According to the information on the RASFF site, the Member States concerned have recalled the contaminated products from the market, and there is no information on poisoning or adverse health effects.

It is also worth noting that in the last few years (between 2018 and 2022), the Hungarian authorities have reported and alerted consumers to the presence of tropane alkaloids and jimson weed in various foods, but these cases were not reported in the RASFF. In 2016, the Hungarian food safety authority (NFCSO) withdrew two extruded millet balls (gluten-free, extruded organic millet balls, peanut flavoured, from controlled organic farming, 75 g; lightly salted, gluten-free, extruded millet balls from controlled organic farming, 150 g), most likely produced domestically, due to high atropine and scopolamine content [83]. In 2020, muesli bars of different flavours from Germany were recalled from the market following a manufacturer's self-check [84]. In 2021-2022, the presence of jimson weed seeds was detected by the national authority in 1000 g of quick-frozen yellow beans marketed under different brands by different distributors [85, 86]¹.

10. Presence of tropane alkaloids in catering

Based on available literature and RASFF alert data, the most frequently contaminated processed foods with tropane alkaloids are those where cereals (wheat, maize, rye, oats, rice, millet), pseudo-cereals (buckwheat, teff, amaranth), legumes are used as raw materials. Unfortunately, they are often found in products for vulnerable groups such as baby foods, cereal-based foods for young children, breakfast cereals. Contamination of herbs with weed seeds may also occur. Due to confusion with certain herbs, health products and food supplements may also be potential sources of tropane alkaloids. Fortunately, the presence of tropane alkaloids in food of animal origin (mainly meat, but also milk, dairy products, eggs) is not expected, given that feed contaminated with tropane alkaloids tastes bad, is not consumed by the animal, is not absorbed by the digestive tract and is not absorbed by the body.

The above-mentioned foods and food ingredients are inevitably present in catering, so potential adverse health effects in this area also need to be addressed. If we look at the public news reports on tropane alkaloid poisonings from 2006 to 2022, the RASFF data, or the warnings and alerts of the national food safety authority (NFSCO) we can see that the most publicised of these was the following caraway seed event in 2018.

Based on press reports, it is known that in April 2018, consumers (mostly foreign tourists) were hospitalised with acute poisoning symptoms after eating food at a restaurant [87]. Based on the symptoms and after a systematic examination of the patients, it became clear that it was atropine poisoning. According to an article in the Hungarian journal *Gastronomy Magazine*, a few months earlier, in December 2017, a similar poisoning had occurred in a restaurant, and the authorities had come across a food, specifically a spice, caraway seed, which could have been responsible for the consumers' symptoms [87]. The food that had been implicated in the poisoning was goulash soup, which was (also) seasoned with caraway seeds in accordance with the traditional recipe [88]. Following the first case in December 2017, the authority drew the attention of consumers and the catering industry to the presence of caraway seeds contaminated with tropane alkaloids in several batches marketed by companies [89, 90]. The Hungarian authorities forwarded the results of the tests to the RASFF system, where the alert is listed with the reference number 2018.0774, and specific measurement data for whole caraway seeds are also available for atropine (16177.6 µg/kg) and scopolamine (4658.3 µg/kg). The interesting thing is that the RASFF alert identified Hungary as the origin of the product, but the press reports suggest that the spice may have reached the restaurants where the poisoning occurred via several points of entry (importer, trader, milling and packaging company, distributor), but the possible origin is more likely Egypt, but no confirmation is available on the NFSCO website or on the RASFF portal. It is also worth noting that a Hungarian baby food company has recalled an own product spiced with caraway seeds that may have been affected by the contamination, thus also complying with the principle of business liability. The authority, with the involvement of the distributors concerned, recalled the products still on the market, so that there were no further reports of poisoning, although the contaminated spice may have reached private households.

After the 2018 caraway seed poisonings, a summary presentation was given by a NFCSO staff member at the Hungalimentaria 2019 conference in 2019, in which the results of measurements were presented [90]. An average of 721 mg/kg (688-745 mg/kg) atropine and 237mg/kg (232-244 mg/kg) scopolamine were detected in ground spice caraway, 15.8 mg/kg (16.2-15.4 mg/kg) atropine and 4.5 mg/kg (4.3-4.6 mg/kg) scopolamine in whole caraway. In variously prepared wheat protein products, an average of 145 µg/kg atropine and 124 µg/kg scopolamine were present, while in baby food both tropane alkaloids were present in amounts below 10 µg/kg. Although the data have so far not been confirmed in any scientific publication, data published in this presentation certainly indicate that the batches of spice mixtures tested by the Hungarian food safety authority contained a significant proportion of jimson weed contamination. The contamination is visible to the naked eye in the whole crop, while in ground spices the weed seeds are obviously no longer recognisable.

As in the general food sector, organic, vegan, raw vegan and free-from products are becoming increasingly

¹ The NFSCO's product recall page only provides data for the last 6 months, so product recalls issued earlier can only be referred to on the basis of press releases.

popular in the catering sector. Organic vegetable ingredients may be contaminated with weed seeds, including tropane alkaloid seeds, due to the ban on the use of herbicides. In order to keep with tradition, a number of dishes made from cereals and pseudo-cereals (maize, millet, sorghum, buckwheat) are increasingly appearing on restaurant menus. Vegan products made from pure plant ingredients and products free of wheat and other gluten-containing ingredients offered to gluten-sensitive individuals can also be a source of plant contaminants, and therefore businesses in the food industry and catering sector should be aware of this potential risk.

11. Tropane alkaloid contamination of organic products

At present, under European legislation, a number of herbicides can be used in crop production under specific conditions to prevent the emergence and further growth of weeds in various crops. However, the use of chemicals is generally prohibited in organic farming, so farmers must also use methods other than chemical treatment to kill weeds. Given that alkaloid-containing weeds of tropane often appear in areas where various grain and legume crops and cereals are grown, in the absence of herbicides, weeds are often found in the harvested crop itself or in their seeds among the useful seeds.

The presence of weed seeds would not pose a risk if there were a significant difference in size, colour or specific weight between the seeds of the useful crop and the weed, since in these cases the seeds could be separated by using different cleaning devices. However, the seeds of millet, buckwheat, flaxseed, soybean and some other grain crops and herbs are very similar to the seeds of jimson weed in colour, size and thus no suitable technology is currently available to effectively remove weed seeds from the crop [48]. In non-organic farming, chemical weed control prevents the weed from germinating, while in organic farming, only time-consuming manual weed control and/or post-harvest laboratory control is an option, which is however complicated and costly to varying degrees depending on the method used, and therefore in most cases this is not a real option. Although there are few test results to support this claim, the fact that organic products are often found in RASFF alerts does indicate a higher risk of possible contamination of organic products with weed seeds. One publication is available in the literature on this topic. Cirilini et al. analysed 26 buckwheat products (flour, pasta, pastry) from organic, i.e. chemical-free production for tropane alkaloid content. Contamination was found in three samples (13.9-83.9 µg/kg atropine and 5.7-10.4 µg/kg scopolamine), with the highest levels found in one buckwheat flour at 83.9 µg/kg atropine and 10.4 µg/kg scopolamine [52]. Thus, tropane alkaloid contamination from weed seeds should be mentioned among the potential food safety risks of organic foods.

12. Summary

The contamination of certain food groups with tropane alkaloids from weed seeds poses a significant food safety risk and it is therefore recommended that the testing of relevant food raw materials, semi-finished and finished foods should be carried out in larger samples than is currently the case, either in official or service laboratories.

13. Update

In the first three months of 2023, three new tropane alkaloid alerts were added to the RASFF system. All three were reported by Germany, two were originated from the Netherlands and one from Poland. Organic hulled milled (2023.0140) contained 29 µg/kg atropine and 23 µg/kg scopolamine, popcorn (2023.1822) contained 16.7 µg/kg atropine and 2.3 µg/kg scopolamine and organic teff flour (2023.1823) contained 190.4 µg/kg atropine and 60.2 µg/kg scopolamine. The latter product was placed on the market in Hungary, NFCSO drew the attention of consumers to the contamination of the product in a press release and recalled the product from the market [91].

Acknowledgement

The author is grateful to Dr. Gyula Hegedüs and Roger Manton, lecturers of the Department of Languages for Business Communication, Budapest Business School Faculty of Commerce, Hospitality and Tourism, for their helpful assistance in translating the manuscript into English.

14. References

- [1] Lounasmaa M., and Tamminen T. (1993): The tropane alkaloids: Chemistry and Biology. In: The Alkaloids (Ed: G.A. Cordell), Academic Press, New York, Vol. 44 1-114.
- [2] Griffin W.J., Lin G.D. (2000): Chemotaxonomy and geographical relationship of tropane alkaloid producing plants. *Phytochemistry* 53 623-637. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00475-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00475-6)
- [3] Koleva I.I., Van Beek T.A., Soffers A.E., Dusemund B., Rietjens I.M. (2011): Alkaloids in the human food chain--natural occurrence and possible adverse effects. *Molecular Nutrition and Food Research* 56 30-52. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100165>

- [4] <https://www.wikidata.org/wiki/Q413762> (Acquired: 12.07.2022)
- [5] Gryniewicz G., Gadzikowska M. (2008): Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Acta Pol Pharm – Drug Res* **60** 439-463. http://if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2008/4_439.pdf
- [6] Passos D.I., Mironidou-Tzouveleki M. (2016): Hallucinogenic plants in the Mediterranean countries. In Victor R. Preedy eds. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse, Volume 2: Stimulants, Club and Dissociative Drugs, Hallucinogens, Steroids, Inhalants and International Aspects*, Chapter 71, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/C2013-0-14226-2> (Acquired: 18.07.2022)
- [7] <http://www.metmuseum.org/art/collection/search/367537> (Acquired: 10.07.2022)
- [8] Adamse P., van Egmond H.P., Noordam M.Y., Mulder P.P.J., de Nijs M. (2014): Tropane alkaloids in food: poisoning incidents. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* **6** (1) 15-24. <https://doi.org/10.3920/QAS2013.0314>
- [9] Friedman M., Levin C.E. (1989): Composition of Jimson Weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37** 998-1005. <https://doi.org/10.1021/jf00088a040>
- [10] Miraldi E., Masti A., Ferri S., Comparini I.B. (2001): Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* **72** 644-648. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00291-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00291-X)
- [11] Mroczek T., Głowniak K., Kowalska J. (2006): Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* **1107** 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.034>
- [12] Caligiani A., Palla G., Bonzanini F., Bianchi A., Bruni R. (2011): A validated GC-MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods. *Food Chemistry* **127** 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.141>
- [13] Jakabová S., Vincze L., Farkas A., Kilár F., Boros B., Felinger A. (2012): Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A* **1232** 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.036>
- [14] Padula L.Z., Bandoni A.L., Rondina R.V.D., Coussio J.D. (1976): Quantitative-determination of total alkaloids and scopolamine in *Datura ferox* growing in Argentina. *Planta Medica* **29** 357-360. DOI: 10.1055/s-0028-1097676
- [15] Vitale A.A., Acher A., Pomilio A.B. (1995): Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* **49** 81-89. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)90035-7)
- [16] Wilms J., Roder E., Kating H. (1977): Gas-Chromatographic determination of tropane alkaloids in organs of *Atropa Belladonna*. *Planta Medica* **31** 249-256.
- [17] Simola L.K., Nieminen S., Huhtikangas A., Ylinen M., Naaranlahti T., Lounasmaa M. (1988): Tropane alkaloids from *Atropa belladonna* 2. Interaction of origin, age, and environment in alkaloid production of callus-cultures. *Journal of Natural Products* **51** 234-242. <https://doi.org/10.1021/np50056a007>
- [18] Sporer F., Sauerwein M., Wink M. (1993): Diurnal and developmental variation of alkaloid accumulation in *Atropa belladonna*. *Acta Horticulturae* **331** 381-386. DOI: 10.17660/ActaHortic.1993.331.53
- [19] Ashtiania F., Sefidkonb F. (2011): Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants. *Journal of Medicinal Plants Research* **5** 6515-6522. DOI10.5897/JMPR11.482 https://academicjournals.org/article/article1380720036_Ashstiani%20and%20Sefidkon.pdf (Acquired: 06.08.2022)
- [20] Zarate R., Hermosin B., Cantos M., Troncoso A. (1997): Tropane alkaloid distribution in *Atropa baetica* plants. *Journal of Chemical Ecology* **23** 2059-2066. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006489.76006.cb> (Acquired: 06.08.2022)
- [21] Berkov S. (2001): Size and alkaloid content of seeds in induced autotetraploids of *Datura innoxia*, *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Pharmaceutical Biology* **39** 329-331. <https://doi.org/10.1076/phbi.39.5.329.5896>
- [22] Brown J.H. (1990): Atropine, scopolamine and related antimuscarinic drugs. In: *Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS and Taylor P, Pergamon Press, Oxford, 33-48.
- [23] Gadzikowska M., Gryniewicz G. (2002): Tropane alkaloids in pharmaceutical and phytochemical analysis. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **59** (2) 149-160. https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2002/2/149.pdf (Acquired: 06.08.2022)
- [24] Martindale (2011): *The complete drug reference*, online, Atropine, Pharmaceutical Press, London,

Date of monographs revision: 05 December 2011. <http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/> (Acquired: 12.07.2022)

- [25] Beermann B., Hellström K., Rosén A. (1971): The gastrointestinal absorption of atropine in man. *Clinical Science* **40** 95-106. <https://doi.org/10.1042/cs0400095>
- [26] Spina S.P., Taddei A. (2007): Teenagers with jimson weed (*Datura stramonium*) poisoning. *Canadian Journal of Emergency Medicine* **9** 467-469. <https://doi.org/10.1017/S1481803500015530>
- [27] Kohnen-Johannsen K.L., Kayser O. (2019): Tropane alkaloids: Chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules* **24** (4), 796; <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>
- [28] <http://www.drdiag.hu/kereso/diagnosztika.adatlap.php?id=84755> (Acquired: 07.08.2022)
- [29] <https://www.parentmcs.hu/?page=vegyul&id=8>(Acquired: 07.08.2022)
- [30] https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=529-17-9 (Acquired: 07.08.2022)
- [31] https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=50-36-2 (Acquired: 07.08.2022)
- [32] https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=402856-42-2 (Acquired: 07.08.2022)
- [33] Nagy európai természetkalauz. Összeáll. és szerk. Roland Gerstmeier. 2. kiadás. Budapest: Officina Nova. 1993. ISBN 963 8185 40 6
- [34] Pollesche J. (2019): The use of morphine and scopolamine to induce twilight sleep. Embryo Project Encyclopedia (2019-05-02). ISSN: 1940-5030 <http://embryo.asu.edu/handle/10776/13101> (Acquired: 07.08.2022)
- [35] Beverly R. (1705): The history and present state of Virginia, in four parts (University of North Carolina). Book II. The natural product and conveniencies in its unimprov'd state, before the English went thither. p. 24. <http://docsouth.unc.edu/southlit/beverley/beverley.html> (Acquired: 07.08.2022)
- [36] Szejnberg A. (2021): Albert Ladenburg (1842-1911) – The distinguished German chemist and historian of chemistry of the second half of the XIX century (To the 110th anniversary of his death). *Substantia* **5** (2) 153-164. doi: 10.36253/Substantia-1231
- [37] <https://www.nlm.nih.gov/exhibition/pickyourpoison/exhibition-cocaine.html?slide=3> (Acquired: 07.08.2022)
- [38] <http://www.euvs.org/en/discover/man-behind-the-bottle/mariani> (Acquired: 07.08.2022)
- [39] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vin_mariani_publicite156.jpg (Acquired: 07.08.2022)
- [40] <https://en.wikipedia.org/wiki/Coca-Cola> (Acquired: 07.08.2022)
- [41] <https://www.businessinsider.com/strategies-coca-cola-used-to-become-an-iconic-brand-2016-2#1-it-started-with-a-unique-market-tested-formula-1>(Acquired: 07.08.2022)
- [42] <https://www.encyclopedia.com/science/news-wires-white-papers-and-books/willstatter-richard-martin> (Acquired: 07.08.2022)
- [43] Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J.M., Cornwell T., Pastor I., Fridlender B. (2002): Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* **20** (12) 522-31. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02080-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02080-2)
- [44] VII. Ph. Eur (2011): Council of Europe, European pharmacopoeia, 7th Ed. Council of Europe, Strasbourg, France. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
- [45] Lin C.C., Chen, J.C. (2002): Medicinal herb *Erycibe henri* Prain ('Ting Kung Teng') resulting in acute cholinergic syndrome. *J Toxicology – Clinical Toxicology* **40** 185-187. <https://doi.org/10.1081/CLT-120004409>
- [46] Beltman W., Van Riel A.J.H.P., Wijnands-Kleukers A.P.G., Vriesman M.F., Van den Hengel-Koot I.S., De Vries I., Meulenbelt, J. (1999): Smartshops – Smart shops: a survey of products, claimed effects and medical-toxicological relevance. RIVM report 348802 017 [in Dutch]. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands, <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/348802017.html>
- [47] Abia W.A., Montgomery H., Nugent A.P., Elliott C.T. (2021): Tropane alkaloid contamination of agricultural commodities and food products in relation to consumer health: Learnings from the 2019 Uganda food aid outbreak. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **20** 501-525. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12664>
- [48] González-Gómez L., Morante-Zarcelero S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I (2022): Occurrence and chemistry of tropane alkaloids in foods, with a focus on sample analysis methods: A Review on Recent Trends and Technological Advances. *Foods* **11** 407. <https://doi.org/10.3390/foods11030407>

- [49] Mulder P.P.J., Pereboom-de Fauw D.P.K.H., Hoogenboom R.L.A.P., de Stoppelaar J., de Nijs M. (2015): Tropane and ergot alkaloids in grain-based products for infants és young children in the Netherlands in 2011–2014. *Food Addit Contam Part B Surveill* **8** 284-290. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1089947>
- [50] Mulder P.P.J., De Nijs M., Castellari M., Hortos M., MacDonald S., Crews C., Hajslova J. Stranska M. (2016): Occurrence of tropane alkaloids in food. EFSA supporting publication, 2016:EN-1140, 200. o., <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1140>
- [51] Marín-Sáez J., Romero-González R., Garrido Frenich A. (2017): Multi-analysis determination of tropane alkaloids in cereals and *Solanaceae* seeds by liquid chromatography coupled to single stage Exactive-Orbitrap. *J Chromatogr. A* **1518** 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.052>
- [52] Cirlini M., Demuth T.M., Biancardi A., Rychlik M., Dall'Asta C., Bruni R. (2018): Are tropane alkaloids present in organic foods? Detection of scopolamine and atropine in organic buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) products by UHPLC–MS/MS. *Food Chem* **239** 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.028>
- [53] Marín-Sáez, J.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. (2019): Reliable determination of tropane alkaloids in cereal based baby foods coupling on-line spe to mass spectrometry avoiding chromatographic step. *Food Chem* **275** 746-753. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.137>
- [54] Baslé Q., Mujahid C., Bessaire T. (2020): Application of a streamlined LC-MS/MS methodology for the determination of atropine and scopolamine in cereals from Asian and African countries. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Contro. Expo Risk Assess* **37** 1744-1754. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1800828>
- [55] González-Gómez L., Gañán J., Morante-Zarcelo S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I. (2020): Sulfonic acid-functionalized SBA-15 as strong cation-exchange sorbent for solid-phase extraction of atropine and scopolamine in gluten-free grains and flours. *Foods* **9** (12) 1854. <https://doi.org/10.3390/foods9121854>
- [56] Shimshoni J.A., Duebecke A., Mulder P.P.J., Cuneah O., Barel S. (2015): Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas peppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market. *Food Addit Contam Part A Chem Ana. Control Expo Risk Assess* **32** 2058-2067. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1087651>
- [57] González-Gómez L., Gañán J., Morante-Zarcelo S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I. (2022): Mesostructured silicas as cation-exchange sorbents in packed or dispersive solid phase extraction for the determination of tropane alkaloids in culinary aromatics herbs by HPLC-MS/MS. *Toxins* **14** 218. <https://doi.org/10.3390/toxins14030218>
- [58] Adamse P., van Egmond H.P. (2010): Tropane alkaloids in food. RIKILT - Institute of Food Safety, Wageningen University & Research centre, <https://edepot.wur.nl/160741>
- [59] Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Tropane alkaloids (from *Datura sp.*) as undesirable substances in animal feed. (2008) *The EFSA Journal* **691** 1-55. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.691>
- [60] European Commission (EC), 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Union* **L 140** 10. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32002L0032&from=EN> (Acquired: 07.08.2022)
- [61] Bania T.C., Chu J., Bailes D., O'Neill M. (2004): Jimson weed extract as a protective agent in severe organophosphate toxicity. *Acad Emerg Med* **11** (4) 335-338. <https://doi.org/10.1197/j.aem.2003.12.002>
- [62] Kerchner A., Farkas Á. (2020): Worldwide poisoning potential of *Brugmansia* and *Datura*. *Forensic Toxicology* **38** 30-41. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00500-2>
- [63] List G.R., Spencer G.F. (1976): Fate of Jimson weed seed alkaloids in soybean processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **53** 535-536. doi: 10.1007/BF02586254
- [64] Perharič L., Koželj G., Družina B., Stanovnik L. (2013): Risk assessment of buckwheat flour contaminated by thorn-apple (*Datura stramonium* L.) alkaloids: a case study from Slovenia. *Food Additives and Contaminants, Part A* **30** 321-330. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.743189>
- [65] Marín-Sáez J., Romero-González R., Garrido Frenich, A. (2019): Degradation of tropane alkaloids in baked bread samples contaminated with *Solanaceae* seeds. *Food Research International* **122** 585-592. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.027>
- [66] Marín-Sáez J., Romero-González R., Garrido Frenich A. (2019): Effect of tea making and boiling processes on the degradation of tropane alkaloids in tea and pasta samples contaminated

with Solanaceae seeds and coca leaf. *Food Chemistry* **287** 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.091>

- [67] Vera-Baquero F.L., Morante-Zarcero S., Sierra I. (2022): Evaluation of thermal degradation of tropane and opium alkaloids in gluten-free corn breadsticks samples contaminated with *Stramonium* Seeds and baked with poppy seeds under different conditions. *Foods* **11** 2196. <https://doi.org/10.3390/foods11152196>
- [68] Az Európai Parlament és a Tanács 178/2002/EK RENDELETE (2002. január 28.) az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L31/1** 463-486. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R0178&from=HU> (Acquired: 20.04.2022)
- [69] EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2013. Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* **11** (10) 3386. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3386>
- [70] A Bizottság (EU) 2016/239 rendelete (2016. február 19.) az 1881/2006/EK rendeletnek a bizonyos, csecsemők és kisgyermek számára készült gabona-alapú élelmiszerekben előforduló tropánalkaloidok felső határértékeinek tekintetében történő módosításáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L45** 3-5. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0239&from=EN> (Acquired: 08.04.2022)
- [71] A Bizottság 1881/2006/EK rendelete (2006. december 19.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L364** 5-24. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20170728&from=PL> (Acquired: 12.05.2022)
- [72] A Bizottság (EU) 2015/976 ajánlása (2015. június 19.) a tropán alkaloidok élelmiszerekben való előfordulásának nyomon követéséről. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L157** 97-98. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015H0976&from=HU> (Acquired: 04.05.2022)
- [73] EFSA (European Food Safety Authority), Arcella D., Altieri A., Horváth Zs. (2018): Scientific report on human acute exposure assessment to tropane alkaloids. *EFSA Journal* **16** (2) 5160. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5160>
- [74] A Bizottság (EU) 2021/1408 rendelete (2021. augusztus 27.) az 1881/2006/EK rendeletnek az egyes élelmiszerekben előforduló tropánalkaloidok felső határértékei tekintetében történő módosításáról. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L 304/1** <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32021R1408&from=EN> (Acquired: 12.04.2022)
- [75] Az Európai Parlament és a Tanács 2002/46/EK irányelve (2002. június 10.) az étrend-kiegészítőkre vonatkozó tagállami jogszabályok közelítéséről. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* **L183/51** <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=EN> (Acquired: 23.10.2020)
- [76] 37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet az étrend-kiegészítőkről. <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0400037.esc> (Acquired: 12.04.2022)
- [77] https://ogyei.gov.hu/etrend_kiegeszitokban_felhasznalasra_nem_javasolt_gyogynovenyek_es_ertekelesuk (Acquired: 29.06.2022)
- [78] Harsh M.L. (1989): Tropane alkaloids from *Lycium barbarum* Linn. in vivo and in vitro. *Current Science* **58** 817-818. Corpus ID: 88551086
- [79] Drost-Karbowska K., Hajdrych-Szauffer M., Kowalewski Z. (1984): Search for alkaloid-type basis in *Lycium halimifolium*. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **41** 127-129.
- [80] Adams M., Wiedenmann M., Tittel G., Bauer R. (2006): HPLC-MS trace analysis of atropine in *Lycium barbarum* berries. *Phytochemical Analysis* **17** 279-283. <https://doi.org/10.1002/pca.915>
- [81] Potterat O. (2010): Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Medica* **76** 7-19. DOI: 10.1055/s-0029-1186218
- [82] <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> (Acquired: 07.08.2022)
- [83] https://portal.nebih.gov.hu/kihelyezett-tanszek-kijelzo/-/asset_publisher/IDJzr2QmllY/content/extrudalt-kolesgolyo-termekeket-vont-ki-a-forgalombol-a-nebih https://www.mueller.co.hu/as-sets/download/19/2020-termekvisszahivas_Hafervoll-37919.pdf (Acquired: 12.07.2022)
- [84] https://www.csaladinet.hu/hirek/szabadido/hirek_erdekessegek/31281/nebih_figyelmeztetes_mergezo_gyomnoveny_kerulhetett_a_fagyasztott_zoldbabba (Acquired: 12.07.2022)

- [85] <https://portal.nebih.gov.hu/termekvisszahivas> (Acquired: 12.06.2022)
- [86] <https://vendeglatasmagazin.hu/ismet-sulyos-mergezest-okozott-fertozott-fuszerkomeny/> (Acquired: 28.06.2022)
- [87] https://index.hu/belfold/2018/04/26/mergezest_kapott_a_gulyastol_egy_csoport_turista/ (Acquired: 09.05.2020)
- [88] <https://portal.nebih.gov.hu/-/ismet-szenyezett-fuszerkomeny-visszahivasat-rendelte-el-a-hatosag> (Acquired: 09.05.2020)
- [89] <https://portal.nebih.gov.hu/-/ujabb-csattano-maszlaggal-szenyezett-fuszerkomeny-teteleket-azonositott-a-nebih-laboratoriuma> (Acquired: 09.05.2020)
- [90] https://wesslingtudaskozpont.hu/resources/hungalimentaria/archiv/2019/eloadasok/Sus%C3%A1n%20Judit%20-%202019Tox_hungalimentaria.pdf (Acquired: 06.08.2022)
- [91] <https://glutenerzekeny.hu/termekvisszahivas-teff-liszt-2023-03-18/>(Acquired: 21.03.2023)

Tejsavbaktérium-izolátumok egyes probiotikus tulajdonságainak *in vitro* vizsgálata

Kulcsszavak: probiotikum, tejsavbaktérium, antibiotikum-rezisztencia, antimikrobiális aktivitás

1. Összefoglalás

Antibiotikum-rezisztenciáért felelős géneket hordozó baktériumok nem használhatók fel élelmiszerek előállításához, ezért a probiotikus törzsek antibiotikum-rezisztencia profiljának feltárása, valamint az általuk termelt antimikrobiális anyagok megismerése elengedhetetlen a probiotikus törzsek szelektálása során. Vizsgálataink célja komplex *in vitro* tesztrendszer további elemeinek kidolgozása és értékelése volt, melyekkel gyorsan és hatékonyan lehet nagyszámú, feltételezetten probiotikus izolátumot szelektálni. Korábbi munkánk során erdélyi nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált baktériumtörzseket (n=217) teszteltünk és összesen 6 db Gram-pozitív, nem hemolizáló, kataláz-negatív, jól aggregálódó, jó sav- és epesav-tűrő képességű törzsre csökkentettük a mintaszámot. Jelen munkánkban az előszelektált törzsek (n=6) antibiotikum-rezisztenciáját és antimikrobiális anyagok termelésére való képességét vizsgáltuk. Az izolátumok mikrobaellenes aktivitását agardiffúziós lyukteszttel derítettük fel. Azt tapasztaltuk, hogy az E15, E66, E173, E198 és E216 azonosítószámú törzsek gátolták a *Salmonella Enteridis* ATCC 13076 törzs szaporodását éppúgy, mint a kontroll törzs (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356). Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok korongdiffúziós teszttel történtek. A *Levilactobacillus brevis* és a *Lactiplantibacillus plantarum* fajba tartozó hat izolátumunk több antibiotikummal szemben is rezisztensnek bizonyult, ezért nem használhatóak fel probiotikus termékek előállításához. Megállapítottuk, hogy *in vitro* tesztrendszerünk alkalmas a nem biztonságos izolátumok hatékony kiszűrésére.

¹ Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft. (Hungarian Dairy Research Institute Ltd.)

² Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék (Széchenyi István University, Albert Casimir Faculty at Mosonmagyaróvár, Department of Food Science)

³ Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola (Széchenyi István University, Wittmann Antal Multidisciplinary Doctoral School in Plant, Animal, and Food Sciences)

2. Bevezetés

A probiotikumok életképes mikrobák – jellemzően, de nem kizárólag baktériumok –, amelyek kellően nagy mennyiségben alkalmazva jótékonyan hatnak az emberi vagy az állati szervezet egészségi állapotára [1, 2, 3, 4]. Pozitív élettani hatásaik egy része (pl. károsodott mikrobiota helyreállítása, patogének kompetitív kiszorítása, savak és rövid szénláncú zsírsavak termelése) széles körűen elterjedt a közismert és részletesen tanulmányozott probiotikus nemzetségekben, másik részük (pl. rákkeltő anyagok semlegesítése, a bél védőgátjának megerősítése) gyakori egy probiotikus faj törzseinek többségében (ún. fajsintű hatások), míg a jótétemények harmadik csoportja (pl. neurológiai, immunológiai és endokrinológiai hatások) ritkán és egy adott faj esetében csupán néhány törzsnél jelentkezik (ún. törzsszintű hatások) [2].

Világszerte nagyszámú baktériumtörzset izolálnak azzal a céllal, hogy kiemelkedő tulajdonságú, feltételezeten probiotikus törzseket találjanak köztük. A drága és komplikált állatkísérleteket meg kell előznie egy *in vitro* vizsgálatokból álló preszelektációs rendszernek [5], mellyel gyorsan, egyszerűen és viszonylag olcsón kiválaszthatók azok a törzsek – akár több ezer izolátum közül is –, amelyek remélhetőleg probiotikusnak bizonyulnak a majdani *in vivo* kísérletekben [6, 7, 8].

Korábbi vizsgálataink során, Erdélyben előállított nyerstej-, aludttej-, valamint sajtmintákból izolált baktériumtörzseket (n=217) teszteltünk, és összesen 6 db Gram-pozitív, nem hemolizáló, kataláz-negatív, jól aggregálódó, jó sav- és epesav-tűrő törzset találtunk közöttük [9]. Egy, nem jól aggregálódó, gyengén sav- és epesav-tűrő izolátum (E10) tesztelését is célul tűztük ki. Jelen munkánkban az így előszelektált törzsek (n=6+1) antibiotikum-rezisztenciáját és antimikrobiális anyagok termelésére való képességét vizsgáltuk. Az antibiotikum-rezisztenciáért felelős géneket hordozó baktériumok nem használhatók fel élelmiszerek előállításához, ezért a probiotikus törzsek antibiotikum-rezisztencia profiljának feltárása, valamint az általuk termelt antimikrobiális anyagok megismerése elengedhetetlen a probiotikus törzsek szelektálása során [10].

Ilyen előzményeket követően, munkánk célja az *in vitro* tesztrendszer további elemeinek kidolgozása és értékelése volt, melynek keretében tehát a kiválasztott baktériumtörzsek antibiotikum-rezisztenciáját és antimikrobiális aktivitását vizsgáltuk és elvégeztük genotípusba sorolásukat is. Végző soron olyan probiotikus törzset szándékoztunk találni, amely antimikrobiális hatású anyagokat termel patogén mikroorganizmusokkal szemben, miközben nem rezisztens egyetlen antibiotikumra sem és genetikailag a *Lactobacillus* nemzetségbe, vagy annak valamelyik utódnemzetségébe tartozik [11].

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kísérletekbe bevont baktériumtörzsek

Ahogy azt az előzőekben említettük, korábbi munkánk [9] eredményei alapján, Erdélyben előállított nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált 7 db baktériumtörzset vontunk be a vizsgálatokba. A kiválasztott törzsek RAPD-PCR módszerrel meghatározott egy-egy klóncsoportot képviseltek. Hat izolátum kiválóan teljesített a klasszikus mikrobiológiai tesztek (telepmorfológia, Gram-festés, kataláz-próba, hemolízis-vizsgálat), az autoaggregáció-vizsgálat, valamint a sav- és epesav-tűrés tesztek során, a hetediket (E10) pedig azért vontunk be további kísérleteinkbe, mert az előzetes eredmények alapján ez szerepelt leggyengébben az összes vizsgálatban. Szándékunk volt megállapítani, hogy a további tesztek során képes lesz-e jobb eredményeket elérni, vagy továbbra is minden fontos tulajdonságban jelentősen alulmúlja a többi törzset.

Az izolátumok tartósítása és tárolása glicerines törzsoldatban történt. 3 ml táplevesbe belemostunk egy kacsnyi, MRS-CC agar, ill. MRS pH 5,4 agar felületéről levett törzset, majd inkubáltuk a törzs igényeinek megfelelően. Krio (fagyasztó) csőbe adagoltunk 300 µl-t a felszaporított tenyészetből és 900 µl 60%-os glicerindatát adtunk hozzá, vortexeltük és cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk kb. 30 mp-ig. A tárolás -80 °C-on történt, ultramély-fagyasztóban. A törzsek felélesztése és tenyésztése az 1. táblázatban feltüntetett paraméterek szerint történt.

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

Törzs	Belső azonosító	T / H / I / K*
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC 15906**	E10	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E15	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E66	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E92	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E173	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E198	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149**	E216	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN

Törzs	Belső azonosító	T / H / I / K*
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	B1	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	B4	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	B10	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	B40	CASO / 37 ± 1 / 24 / A
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 49775	B41	CASO / 37 ± 1 / 24 / A
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis ATCC 13076	B51	CASO / 37 ± 1 / 24 / A

*T: fenntartó tápközeg, H: tenyésztési hőfok (°C), I: tenyésztési idő (óra), K: tenyésztési körülmény (A: aerob, AN: anaerob).
 **Saját izolátumainkról a vizsgálatok végén, a genetikai azonosítás eredményeként derült ki, hogy mely fajba tartozó törzsek.

3.2. A szelektív tenyésztés körülményei, tápközegei és elkészítésük

3.2.1. Fiziológias sóoldat

A decimális hígítási sor előállításához használt hígítófolyadékhoz 8,5 g NaCl-ot mértünk be, majd 1 L desztillált vízben feloldottuk. Sterilizését autoklávban, 121 °C-on, 15 percig végeztük. A kazein-peptonos sóoldat hasonló módon készült, kiegészítve 1 g tripton (kazein-pepton) hozzáadásával.

3.2.2. Foszfát-puffer (PBS) oldat

Kereskedelmi forgalomból beszerzett 1 × PBS oldattal dolgoztunk (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország), amelyet felhasználás előtt 121 °C-on, 15 percen át steriliztünk.

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

A kereskedelmi forgalomban kapható MRS agart és levest (Oxoid, Basingstoke, Egyesült Királyság) a gyártó utasításai szerint készítettük el. Az ajánlott mennyiségeket (62 g, ill. 52 g) analitikai pontossággal bemértük, majd 1-1 L desztillált vízben feloldottuk. Fűthető mágneses keverővel segítettük a komponensek oldódását, ezt követően pedig autoklávban steriliztük a tápközegeket (121 °C-on, 15 percig). A pH-értéket (6,2) sterilizést követően ellenőriztük.

3.2.4. M17 agar és leves (Terzaghi szerint)

A gyártó (Biokar Diagnostics, Allonnen, Franciaország) utasításait követve, analitikai mérleggel 57,2 g-ot mértünk be a dehidratált M17 agarból, ill. 42,2 g-ot a levestől, majd 1000-1000 ml desztillált vízben feloldottuk őket. A komponensek teljes oldódásáig melegítettük a tápközegeket, majd hóálló üvegekbe adagoltuk és autoklávban, 121 °C-on, 20 percig steriliztük.

3.2.5. CASO agar és leves

A CASO agart és a CASO levest szintén a gyártó (Biolab) utasításai alapján készítettük el. 45 g, ill., 36 g mennyiségeket 1-1 L vízben oldottunk fel. Az oldódást követően standard paraméterek (121 °C, 15 perc) mellett, autoklávban hajtottuk végre a sterilizést.

3.2.6. Anaerob tenyésztés

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

3.3. Antimikrobiális aktivitás vizsgálata

3.3.1. A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

3.3.1.1. CASO agar

Elkészítése a 3.2.5. alfejezetben leírtak szerint történt.

3.3.1.2. Afilact® Fluid lizozim enzim

A Chr. Hansen cég (Hørsholm, Dánia) által előállított konzerválószer aktív összetevője a lizozim, amely számos Gram-pozitív baktérium szaporodását gátolja. A lizozim több mint 30 országban engedélyezett komponens az élelmiszerekben. A termék tojásfehérjéből kivont enzimet tartalmaz (E1105), az EU-ban korlátozottan használható sajtok tartósításához.

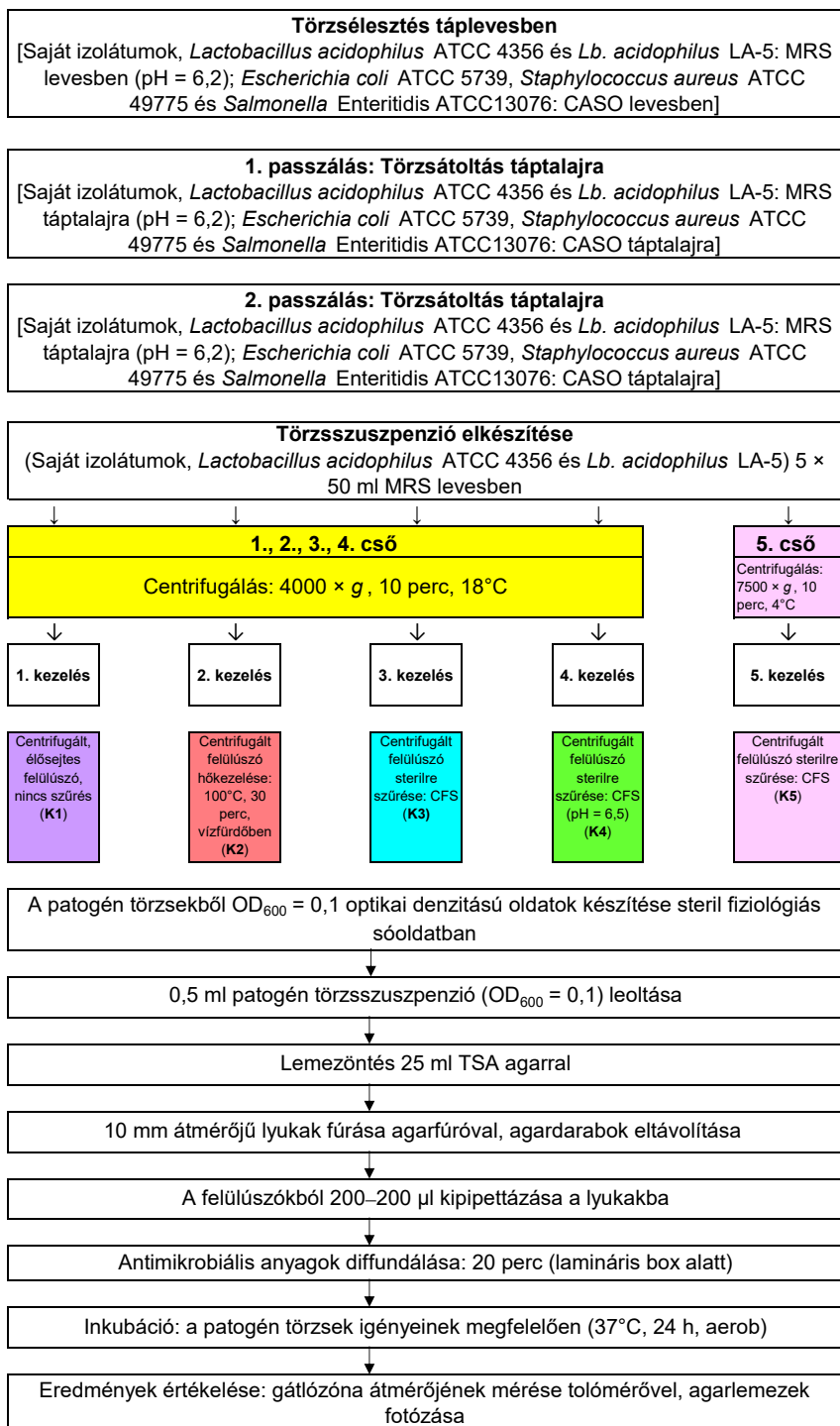
3.3.1.3. Flóraszcept

A Flóraszcept (Unilever, Budapest, Magyarország) fertőtlenítő hatású tisztítószer. Fő hatóanyaga a nátrium-hipoklorit, mely hatékony a baktériumok és a gombák ellen is. A terméket hígítatlan formában használtuk fel vizsgálatainkban.

3.3.2. Agardiffúziós lyukteszt

3.3.2.1. Patogén baktériumok szuszpenzióinak (inokulum) elkészítése

A törzseket felélesztettük, majd kétszer passzáltuk. A második passzálás utáni friss, 24 órás tenyészeteket használtuk fel a szuszpenziók előállításához. A táptalajon kinőtt telepekre 10 ml steril desztillált vizet pipettáztuk, majd óvatosan, lapos végű szélesztőpálca segítségével fellazítottuk a telepeket az agar felületéről. Ezután a szuszpenziókat átpipettáztuk a Petri-csészékből műanyag Falcon-csővekbe. A kívánt sejttűrűségeket az optikai denzitás elve alapján állítottuk be úgy, hogy 600 nm-es hullámhosszon mértünk BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA), ezután pedig az értékeket standardizáltuk, 0,1-re állítottuk minden egyes mintánál, hogy a mérési eredmények összehasonlíthatóak legyenek.



1. ábra. Az antimikrobiális aktivitás vizsgálatának folyamata

3.3.2.2. Agarlemezek elkészítése

Az előzőekben leírtak szerint előkészített baktériumszuszpenziókból 0,5-0,5 ml-t pipettáztunk a steril Petri-csészékbe, majd 45 °C-ra lehűtött CASO táptalajjal lemezeket öntöttünk. A tesztmikrobák táptalajbéli egyenletes eloszlása érdekében óvatos, körkörös, rotáló mozdulatokat hajtottunk végre a lemezöntést követően. A táptalaj megszilárdulása után, lelangolt és lehűtött steril agarfúróval lemezenként 4-4 db, 10 mm átmérőjű lyukat vágtunk az agarba. Az így kiszúrt agarkorongokat steril, egyszerhasználatos műanyaglándszával távolítottuk el a lemezekből.

3.3.2.3. Saját izolátumok felülúszóinak kezelése

A négy lyuk közül az elsőbe 200 µl steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk. Ez töltötte be a kontroll szerepét, hiszen a baktérium szaporodását nem gátolta, ugyanakkor jelezte, hogy a törzs életképes állapotban volt a kísérlet során. A másik három lyukba az izolátumok felülúszójának valamelyik kezelt változatából került 200-200 µl, ezzel megvalósult egy lemezen a három technikai ismétlés. Ezt követően a patogén baktérium igényeinek megfelelően inkubáltuk a lemezeket.

A vizsgálandó izolátumok felülúszóit öt eltérő kezelésnek vetettük alá. A lépések eleje megegyezett: minden törzsnél 5-5 db Falcon-csőbe mértünk 45 ml táplevest (MRS leves – De Man, Rogosa, Sharpe broth) és ebben élesztettük fel a törzseket, a számukra megfelelő körülmények biztosítva (37 °C, 24 h, anaerob közeg). Az inkubálás letelte után a mintaelőkészítések eltérőek voltak, ezeket az **1. ábrán** részletezzük.

1. kezelés: Az inkubálás után az összes törzsünk első számú Falcon-csővét 4000 g-n, 10 percen keresztül, 18 °C hőmérsékleten centrifugáltuk (Eppendorf Centrifuge 5804 R). A táplevest ezután leöntöttük róla és 1 × PBS oldatból 42 ml-t mértünk a cső aljában lévő pelletre, majd 10 mp-en keresztül vortexeltük. Ismételt centrifugálás után a felülúszót 50 ml-es, steril Falcon-csőbe öntöttük át.
2. kezelés: A lépések megegyeztek az 1. kezelés lépéseivel, de a második számú Falcon-csövek tartalmának steril Falcon-csőbe történő átöntése után ezeket a felülúszókat hőkezeltük (100 °C-os vízfürdőben, 30 percig).kezelés: A lépések megegyeztek az 1. kezelés lépéseivel, de a harmadik számú Falcon-csövek mintáinak esetében a második centrifugálás után a felülúszókat vizeletgyűjtő műanyagpohárba öntöttük, amiből 0,2 µm-es pórusátmérőjű membránszűrőn keresztül új, 50 ml-es, steril Falcon-csőbe átszűrtük.
3. kezelés: A négyes számú Falcon-csövekről egyszeri centrifugálás (4000 g, 10 perc, 18 °C) után a táplevest leöntöttük új, steril Falcon-csővekbe. Ezt követően a felülúszó (táplevest is tartalmazta) pH-értékét beállítottuk 6,5-re. A kívánt érték eléréséhez 1 M NaOH-ot használtunk, a pH-értéket pedig FiveEasy F20 típusú pH-mérővel (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) ellenőriztük. Az érték beállta után a felülúszót 0,2 µm-es pórusátmérőjű membránszűrőn keresztül új, 50 ml-es steril Falcon-csőbe átszűrtük.
4. kezelés: Az ötös számú Falcon-csövek centrifugálásához az előző kezeléseketől eltérő paramétereket alkalmaztunk. A mintákat 10 percen keresztül 7500 g-n és 4 °C-on centrifugáltuk, majd itt is leöntöttük a táplevest és 42 ml-nyi 1 × PBS oldattal töltöttük fel. Ismét centrifugáltunk a módosított beállítások szerint. Ezt követően a felülúszót vizeletgyűjtő műanyagpohárba öntöttük, amiből 0,2 µl-es pórusátmérőjű membránszűrőn keresztül új, 50 ml-es steril Falcon-csőbe átszűrtük.

3.3.2.4. Inkubálás és a gátlási zónák meghatározása

Az elkészített lemezeket 20 perces diffundálási idő után termosztátba helyeztük, ahol a patogén baktériumok igényei szerint történt az inkubálás, majd értékeltük az eredményeket. A gátlózána átmérőjét tolmérővel határoztuk meg. Minden egyes vizsgálatot 2–2 db párhuzamos lemezzel végeztünk el. Kétféle kimenetelt tapasztaltunk: a felülúszót tartalmazó lyuk körül gátlási zóna alakult ki, vagy a lyuk körül nem volt látható eltérés. Utóbbi azt jelentette, hogy a baktérium-felülúszó nem gátolta, de nem is serkentette az adott baktérium szaporodását.

3.4. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat

3.4.1. A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

3.4.1.1. De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar (pH = 6,2)

Elkészítése a 3.2.3. alfejezetben leírtak szerint történt.

3.4.1.2. Iso-Sensitest agar

A gyártó (Oxoid) által javasolt 31,4 g mennyiséget analitikai mérlegen bemértük és 1 L vízben feloldottuk. A komponensek teljes oldódását követően, 121 °C-on, 15 percig sterilizáltuk a táptalajokat.

3.4.1.3. *Lactobacillus* Susceptibility Medium (LSM)

Az LSM táptalaj elkészítéséhez szükség volt MRS (Oxoid) és Iso-Sensitest (Oxoid) táplevesekre. Ezekből a

következésképpen állítottuk elő az LSM táptalajt: összemértünk 900 ml Iso-Sensitest levest és 100 ml MRS levest, melyet 15 g agar-aggarral egészítettünk ki. A sterilizést standard paraméterek mellett (121 °C, 15 perc) végeztük.

3.4.1.4. Rezisztencia korongok

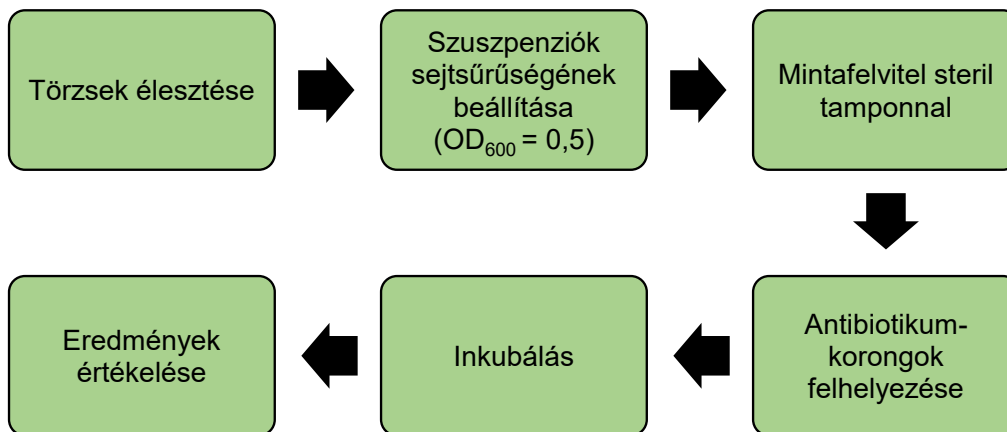
Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatainkban felhasznált érzékenységi korongok (Biolab) jellemzőit a **2. táblázat**ban foglaltuk össze.

2. táblázat. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatokhoz használt érzékenységi korongok hatóanyag-koncentrációi

Antibiotikum neve	Hatóanyag-koncentráció (µg)	Rövidítés
Ampicillin	10	AM10
Kloramfenikol	30	C30
Klindamicin	2	DA2
Eritromicin	15	E15
Gentamicin	10	CN10
Kanamicin	30	K30
Nalidixsav	30	NA30
Sztreptomycin	10	S10
Tetraciklin	30	TE30
Trimetoprim + Szulfametoxazol	1,25 + 23,75	SXT25
Vankomicin	30	VA30

3.4.2. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálatának folyamata

A **2. ábrán** láthatók az elvégzett antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok lépései.



2. ábra. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálat sémája

MRS táptalajon fellesztettük a baktériumtörzseinket, majd a számukra optimális körülmények biztosítása mellett inkubáltuk őket. Ezután egy szoliter telepet átoltottunk egy újabb MRS táptalaj felszínére, hogy biztosan egy telepből induljunk ki és ne kevert tenyésztettel dolgozzunk. 24 óra elteltével a felnövekedett telepekre 10 ml desztillált vizet pipettáztunk és feloldottuk benne a telepeket, figyelve arra, hogy a táptalajt ne keverjük bele a szuszpenzióba. Az oldatot a Petri-csésze tetejéről Falcon-csőbe pipettáztuk át. Ezt követően a sejtsuszpenziók sűrűségét $OD_{600} = 0,5$ értékre állítottuk be BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel. Minden egyes hígításnál visszaellenőriztük, hogy megfelelőek voltak-e a számításaink. Ezután steril tamponos mintavevő-pálcákkal vittük fel a sejtsuszpenziókat a táptalajok (MRS agar, ISO-Sensitest agar, LSM agar) felszínére oly módon, hogy a táptalaj teljes felületét borítsa a felvitt mintamennyiség. 15 percen keresztül állni hagytuk a Petri-csészéket, hogy a mikrobák alkalmazkodhassanak a körülményekhez. Mindezek után, kézi adagolóval felhelyeztünk Petri-csészénként 6 db antibiotikum-rezisztencia korongot (köztük 1 db üres korongot) és megfelelő körülményeket biztosítva inkubáltuk a lemezeket (37 °C, 24 h, anaerob viszonyok). Egy nap elteltével a lemezeken kialakult gátlózonákat tolómérővel megmértük. A gátlózonák méretéből mindig levontunk a korong átmérőjét (6 mm).

3.5. Genetikai azonosítás

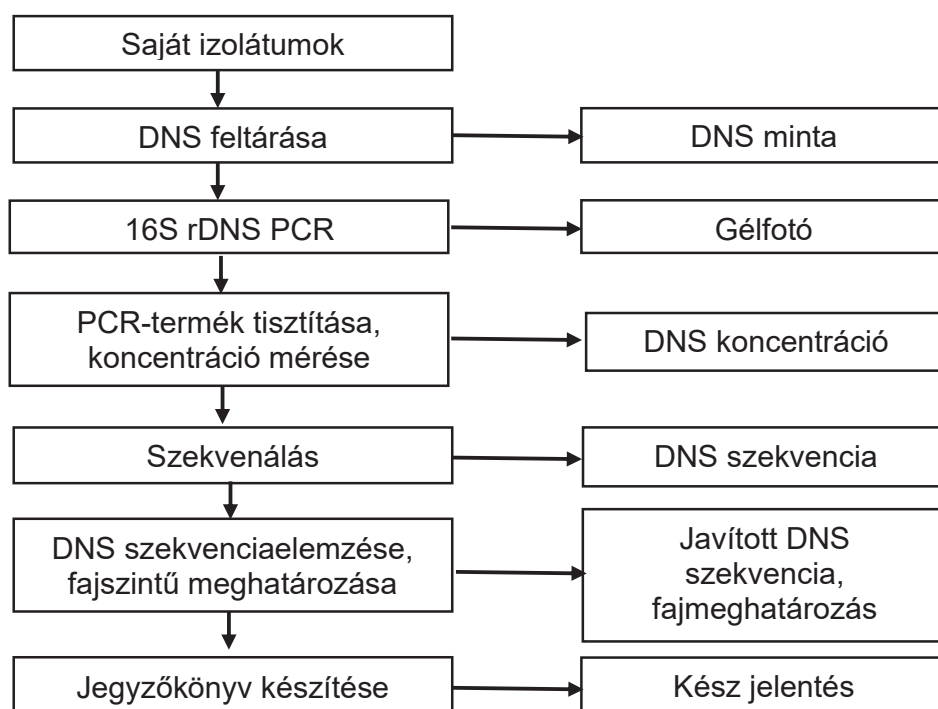
3.5.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A genetikai azonosításhoz szükséges anyagok, ill. eszközök köre az alábbiakban összegezhető:

- Baktérium-tisztatényészetek táptalajok felületén
- NucleoSpin Microbial DNA izoláló egységcsomag (Macherey-Nagel kit)
- DreamTaq Green PCR Master Mix 2x
- 27f és 1492r primerek
- Agarózgél
- EcoSafe gélfesték
- Gene Ruler 1kb plus DNA ladder
- GeneJet PCR purification kit (Thermo Fisher)

3.5.2. Azonosítás folyamata

A genetikai azonosítás lépései az **3. ábrán** láthatók.



3. ábra. A genetikai azonosítás lépései és az egyes lépések eredménye

A hét lépésből álló vizsgálati módszert a következőképpen hajtottuk végre: (1) genomi DNS feltárása; (2) 16S rDNS PCR futtatás; (3) agaróz gélelektroforézis; (4) gélfotó kiértékelése; (5) PCR termék tisztítása, DNS koncentráció és tisztaság meghatározása; (6) DNS nukleotid-sorrend meghatározása (szekvenálás); (7) szekvenciaelemzés, kiértékelés.

3.5.2.1. Genomi DNS feltárása

A baktériumtörzseket a glicerines stockból ritkító szélesztéssel felvittük MRS táptalaj felületére, majd egy éjszakán keresztül, 37 °C-on, anaerob körülmények között inkubáltuk. Ezt követően szoliter telepeket passzáltunk MRS táptalajra és megismételtük az inkubálást. A genomi DNS-tisztításhoz szükséges önálló telepeket 1,5 ml fiziológiás sóoldattal töltött Eppendorf csövekbe mostuk. A genomi DNS-tisztítás NucleoSpin Microbial DNA csomaggal (Macherey-Nagel, Düren, Németország) történt, a gyártó által megadott protokoll alapján [12].

3.5.2.2. 16S rDNS PCR futtatás

A kinyert DNS minták meglétéről polimeráz-lánreakcióval győződünk meg. Ehhez 1,5 ml-es Safe Seal Eppendorf-csőbe reakcióelegyet mértük össze az alábbi anyagokból: DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), 27f és 1492r primerek, molekuláris biológiai tisztaságú AccuGENE víz (Lonza, Basel, Svájc) és a saját izolátumok tisztított DNS-e. A vizsgálatot Mastercycler PCR (Eppendorf, Hamburg, Németország) géppel végeztük, amelyen a 16S rDNS programot futtatuk. Ennek beállításai a **3. táblázatban** láthatóak.

3. táblázat. A 16S rDNS program egyes ciklusainak paraméterei

Lépés	Folyamat neve	Hőmérséklet (°C)	Idő
1.	Felmelegítés	95	4 min
2.	Denaturáció	95	20 sec
3.	Primerek bekötődése	54	30 sec
4.	Lánchosszabbítás	72	1 min
5.	Elongáció	72	5 min
6.	Hőntartás	10	∞

*A 2-4. lépés összesen 40-szer játszódott le.

3.5.2.3. Agaróz gélelektroforézis

A program lejárta után, a felsokszorozott DNS-molekulák láthatóvá tételéhez agaróz gélelektroforézis technikát alkalmaztunk. Az 1%-os agarózgél elkészítéséhez 0,6 g agarózt (VWR) 60 ml 1 × TBE (tris-bórecetsav) oldatban kellett feloldanunk. Ezt követően forraltuk az elegyet az agar teljes feloldódásáig. A forralás utáni hűtés alatt mágneses keverővel kevertettük az oldatot és 6 µl DNS ECO Safe festékolatot (Pacific Image Electronics, Torrance, CA, USA) adtunk hozzá. A gélyöntés során gélyálcát és gélyésűt használtunk. Az agaróz megdermedése után a gélyésűt a gélből eltávolítottuk, a géllal töltött tálcát pedig az elektroforézis tankba helyeztük, amit pufferrel töltöttünk fel (1 × TBE oldat). A PCR reakció termékeit felvittük a zsebekbe és elkezdtük az elválasztást.

3.5.2.4. Gélfotó kiértékelése

A gélelektroforézis lefutását követően meggyőződünk róla, hogy minden minta terméke tartalmaz DNS-t. Ebben segítséget jelentett, hogy az elválasztás megkezdése előtt, a mintákkal együtt, molekulásúly markert adagoltunk a gélbe.

3.5.2.5. PCR termék tisztítása, DNS koncentráció és tisztaság meghatározása

Az egyes termékek DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher) mértük meg, majd egy külső céghez (MacroGen Europe, Amszterdam, Hollandia) küldtük szekvenáltatni a mintákat.

3.5.2.6. DNS nukleotidsorrend meghatározása (szekvenálás)

A munkafolyamatnak csak bizonyos részei történtek mosonmagyaróvári laboratóriumunkban. Ilyen volt a minták előkészítése, elküldése szekvenáltatásra, majd az eredmények kiértékelése. Az azonosítandó DNS mintákat 1,5 ml-es Eppendorf-csövekbe adagoltuk, majd azonosítószámmal ellátott matricákkal felcímkéztük, melyekre ráírtuk a primer nevét (27f, 1492r). A DNS szakaszok bázissorrendjét a forward és a reverse primerekkel is meghatároztuk, ezért minden DNS mintát kétfelé kellett szétmérni (5–10 µl). A szekvenáláshoz szükséges primereket is kiadagoltuk, szintén jelölve és feliratozva a reakciócsöveket. Miután minden csövet lezártunk, parafilmmel leragasztottuk azokat és elpostáztuk a szolgáltató cégnek (MacroGen Europe).

3.5.2.7. DNS szekvenciák elemzése és kiértékelése

A DNS-ek nukleotidsorrendjét a szolgáltató cég e-mailben küldte meg. A közölt linkről lehetett letölteni az állományokat. A fájlok kezeléséhez a Chromas és a ChromasPro programokat (Technelysium, Brisbane, Ausztrália) használtuk. A forward és a reverse primerekkel kapott szekvenciákat egymásba illesztettük, majd a kapott szekvencia elejéről és végéről az értékelhetetlen bázisokat trimmeltük. Ahol a két szekvencia eltért egymástól, ott a kromatogram által felajánlott javítást alkalmaztuk. Ezt követően a javított szekvencia innen kimásolható nukleotidsorrendjét a Basic Local Alignment Search Tool online weboldalán a “nucleotid blast” opcióval értékeltük [13].

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Antimikrobiális aktivitás vizsgálata

Izolátumaink mikrobaellenes hatásának megállapítása céljából végzett vizsgálatok eredményei a **4. táblázat**-ban láthatók.

4. táblázat. Az antimikrobiális aktivitás vizsgálatának eredményei (a gátlózónák értékei mm-ben megadva)

Gátló ágens	Kezelés**	Gátolandó patogén baktérium		
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 49775	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076
Flóraszept	Hígítatlan	8	14	9,0
Afilact Fluid	Hígítatlan	0	8	0,0
E10 izolátum	K1	0	0	0,0
	K2	0	0	0,0
	K3	0	0	0,0
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	0,0
E15 izolátum	K1	0	0	15,3
	K2	0	0	14,2
	K3	0	0	16,5
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	10,9
E66 izolátum	K1	0	0	7,3
	K2	0	0	13,8
	K3	0	0	13,7
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	11,7
E92 izolátum	K1	0	0	0,0
	K2	0	0	11,7
	K3	0	0	8,0
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	13,0
E173 izolátum	K1	0	0	20,8
	K2	0	0	22,3
	K3	0	0	17,5
	K4	0	0	5,8
	K5	0	0	20,5
E198 izolátum	K1	0	0	13,0
	K2	0	0	13,8
	K3	0	0	9,3
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	12,2
E216 izolátum	K1	0	0	16,0
	K2	0	0	15,0
	K3	0	0	15,0
	K4	0	0	0,0
	K5	0	0	18,0

* A mm-ben feltüntetett eredmények 9 technikai × 2 biológiai ismétlés átlagértékei.

** A kezelések részletes leírását a 3.3.2.3. alfejezet tartalmazza.

ATCC: American Type Culture Collection (egy amerikai, szabványos mikroorganizmus-referencia törzseket szolgáltató nonprofit szervezet. A szerk.)

A pozitív kontroll szerepét betöltő Flóraszept mindhárom patogén baktériumtörzs élettevékenységét gátolta, míg az Afilact Fluid lizozim enzim – az előzetes várákozásoknak megfelelően – csak a Gram-pozitív *Staph. aureus* törzs szaporodását akadályozta meg (**4. táblázat**).

Az E10-es izolátumunk semelyik kezelésének nem volt gátló hatása a tesztelt patogén baktériumokra. Ehhez képest, Miao és munkatársai [14] arról számoltak be, hogy a tibeti kefirből izolált *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 ún. F1 bakteriocint termel, mely széles antimikrobiális spektrummal rendelkezik. A bakteriocin hőállóan bizonyult és nem változott a természete 3,0-as, 6,0-os és 9,0-es pH-értékű közegekben sem. A nevezett szerzők összesen 49 db tejsavbaktérium-törzset izoláltak, melyeket sterilizett tejben tenyésztettek és a sejtmentes felülúszójuk antimikrobiális aktivitását vizsgálták agardiffúziós lyuktesztek segítségével. Hét törzs sejtmentes felülúszója fejtett ki gátló hatást *Escherichia colira*. Az egyes törzsek sejtmentes felülúszói az indikátor *E. coli*-val szemben 10,9±0,1 mm, valamint 12,0±0,4 mm nagyságú gátlózónát képeztek. Az E10-es izolátumunk sejtmentes felülúszójának kinyerése nem tejből történt, hanem 6,2-es pH-értékű MRS levesből, és ez okozhatta a két vizsgálat eredménye közti eltérést.

Az E15-ös törzs élősejtes tenyészet 15,3 mm átmérőjű gátlózónát produkált *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a holt sejtek is képesek voltak gátolni, ugyanis a 100 °C-os, 30 percig tartó hőkezelés ellenére az E15-ös törzs 14,2 mm-es gátlást fejtett ki a *Salm.* Enteritidis-re. A 6,5-es pH-értékre beállított közeg viszont nem tette lehetővé a nevezett kórokozó gátlását, amiből arra következtethetünk, hogy az E15-ös törzs savtermészetű antimikrobiális hatású anyagot termel. 7500 g-n végrehajtott centrifugálás hatására nem sikerült több antimikrobiális anyagot kinyerni és nagyobb gátlózónát produkálni.

Az E66-os törzs élő tenyészet (K1 kezelés) csupán 7,3 mm-es gátlózónát alakított ki, míg a K2 és a K3 kezelés fejtette ki a legnagyobb mértékű gátlóhatást a tesztelt *Salmonella* tenyészetrel szemben. A közel semleges pH-értékű CFS-nek (K4) nem volt semmilyen kimutatható hatása egyik patogén törzsre sem. Az intenzív K5 kezelés nem segítette elő nagyobb átmérőjű gátlózóna kialakulását.

Az E92-es törzs élő tenyészetének és semlegesített sejtmentes felülúszójának sem volt kimutatható gátlóhatása a tesztelt patogén baktériumokra. Leghatékonyabbnak a K5 kezelés bizonyult, amit a 13,0 mm-es gátlózóna bizonyított.

Az E173-as törzsnek mind az ötféle kezelése gátolta a *Salm.* Enteritidis szaporodását. A leghatékonyabb a hőpusztításon alapuló K2-es kezelés volt (22,3 mm-es gátlózóna). A törzs 6,5-es pH-értékre beállított sejtmentes felülúszója kismértékű, 5,8 mm-es gátlást fejtett ki a *Salm.* Enteritidis-re. Ez azt bizonyítja, hogy az E173-as törzs nem kizárólag savas természetű antimikrobiális anyagokat termel.

Az E198-as törzs hővel előlt tenyészet 13,8 mm-es, míg az élő tenyészet 13,0 mm-es gátlózónát alakított ki a *Salm.* Enteritidis-szel beoltott agarlemezen. A K4 kezelésnek egyik patogén törzsre sem volt érzékelhető hatása.

Az E216-os törzs K1 és K5 kezelése (16,0 mm, ill. 18,0 mm) – ellentétben a K4 kezeléssel – kifejezetten hatékonyan bizonyult a szalmonellózis kórokozójával szemben.

Összességében megállapítottuk, hogy egyik tesztelt izolátumunknak sem volt kimutatható hatása az *E. coli* és a *Staphylococcus aureus* vizsgált törzseire. Eredményeink hasonlóak Maragkoudakis és munkatársai [15] eredményeihez, akik nyerstejből *Lb. acidophilus* ACA-DC 295, Cheddar sajtból *Lcb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 3345, Kasserli sajtból *Lcb. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4038, valamint Feta sajt sólevéből *Lactiplantibacillus plantarum* ACA-DC 146 törzseket izoláltak és azok antimikrobiális aktivitását tesztelték agardiffúziós lyuktesztekkel. Megállapították, hogy a 29 db tejsavbaktérium izolátum sejtmentes felülúszójának egyike sem gátolta a patogén *E. coli*, a *Salm.* Typhimurium és a *Helicobacter pylori* törzseinek szaporodását.

4.2. Antibiotikum-rezisztencia vizsgálat

A standardizált antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok során felmerült, hogy a tejsavbaktériumok tenyésztéséhez általánosan használt MRS tápközeg antagonistá hatást fejthet ki az egyes antibiotikumokkal szemben. A gátlóhatások kiküszöbölésének érdekében fejlesztették ki az LSM tápközeg, amely 90%-ban Iso-Sensitest agarból és 10%-ban MRS agarból áll. Az LSM táptalaj (Lipase Salt Mannitol közeg) – a vonatkozó nemzetközi szabvány [16] ajánlásainak megfelelően – bizonyítottan elősegíti a laktobacillusok és a bifidobaktériumok szaporodását, miközben minimalizálja a potenciális antagonizmust a tápközeg komponensei és a tesztelt antimikrobiális szerek között [17]. Vizsgálataink eredményei az **5. táblázat**ban láthatók.

Mind a *Lb. acidophilus* ATCC 4356, mind az előszelektált izolátumaink rezisztensnek bizonyultak vankomicinre és nalidixsavra, amire magyarázatul szolgál Charteris és munkatársainak [18] közlése, miszerint a *Lactobacillus* fajok eredendően nalidixsav-rezisztensek. Wolupeck és munkatársai [19] *Lactobacillus* törzsek antibiotikum-rezisztenciáját tanulmányozva azt tapasztalták, hogy az összes törzsük rezisztens ciprofloxacinnra, gentamicinre, sztreptomycinre és vankomicinre, ugyanakkor viszont érzékeny tetraciklinre, valamint kloramfenikolra. A mi izolátumaink – és a *Lb. acidophilus* ATCC 4356 is – hasonlóképpen érzékenynek mutatkoztak az utóbbi két antibiotikumra.

Említést érdemel, hogy a *Lb. acidophilus* ATCC 4356 nem szaporodott Iso-Sensitest táptalajon, a vizsgálat eredménye ezért értékelhetetlennek bizonyult (**5. táblázat**). Huys és munkatársai [17] szintén arra a következtetésre jutottak, hogy az Iso-Sensitest tápközeg általánosságban nem ajánlható tejsavbaktériumok antibiotikum-érzékenységének tesztelésére.

5. táblázat. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok eredményei (a gátlási zónák értékei mm-ben értendők)*

Törzs	Táptalaj	Üres korong	Antibiotikum**										
			CN10	C30	VA30	S10	E15	DA2	AM10	TE30	K30	NA30	SXT25
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Iso-Sensitest		Nem értékelhető										
	MRS	0,0	0,0	25,2 ± 1,6	0,0	8,7 ± 2,3	23,5 ± 0,8	0,0	9,0 ± 3,5	21,0 ± 7,0	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	11,5 ± 4,6	23,8 ± 1,5	0,0	10,2 ± 4,7	25,5 ± 2,9	0,0	0,0	18,8 ± 6,9	0,0	0,0	0,0
E10 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	17,0 ± 2,2	20,0 ± 2,3	0,0	13,2 ± 2,7	29,5 ± 3,5	7,7 ± 0,8	0,0	26,7 ± 4,6	2,5 ± 2,1	0,0	4,7 ± 2,7
	MRS	0,0	0,0	25,5 ± 2,1	0,0	0,0	21,2 ± 4,6	11,0 ± 7,6	5,7 ± 1,0	20,3 ± 4,1	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	12,1 ± 2,8	23,0 ± 0,6	0,0	7,2 ± 2,8	22,3 ± 5,6	12,3 ± 4,5	0,0	21,0 ± 1,9	0,0	0,0	5,5 ± 3,2
E15 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	17,2 ± 4,1	24,2 ± 4,9	0,0	12,2 ± 0,8	25,2 ± 2,6	0,0	0,0	10,8 ± 2,0	8,5 ± 2,4	0,0	17,0 ± 2,4
	MRS	0,0	2,7 ± 0,5	25,0 ± 0,9	0,0	0,0	20,3 ± 1,9	0,0	0,0	12,5 ± 2,6	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	14,3 ± 0,5	23,5 ± 2,3	0,0	3,0 ± 0,9	21,8 ± 2,3	0,0	0,0	10,0 ± 2,0	0,0	0,0	22,7 ± 1,2
E66 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	18,7 ± 0,8	21,2 ± 2,9	0,0	11,7 ± 0,5	25,3 ± 0,8	0,0	0,0	10,8 ± 2,0	8,8 ± 2,1	0,0	16,0 ± 1,3
	MRS	0,0	2,0 ± 0,9	25,2 ± 1,6	0,0	0,0	22,2 ± 1,6	0,0	5,7 ± 1,2	14,3 ± 0,8	2,3 ± 0,5	0,0	0,0
	LSM	0,0	14,5 ± 1,5	21,8 ± 3,4	0,0	4,3 ± 2,1	22,2 ± 1,5	0,0	0,0	12,7 ± 0,8	2,5 ± 1,0	0,0	22,7 ± 1,2
E92 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	17,1 ± 2,7	19,4 ± 3,8	0,0	8,6 ± 2,7	18,2 ± 4,6	0,0	8,6 ± 4,0	8,3 ± 1,7	6,0 ± 1,9	0,0	14,3 ± 3,3
	MRS	0,0	7,3 ± 1,0	21,4 ± 2,2	0,0	1,0 ± 0,1	17,6 ± 1,9	0,0	10,2 ± 1,8	10,2 ± 2,9	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	13,9 ± 2,4	15,1 ± 2,0	0,0	5,6 ± 1,5	18,7 ± 2,6	0,0	7,7 ± 2,5	8,4 ± 1,8	2,9 ± 2,3	0,0	20,7 ± 4,5
E173 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	15,4 ± 1,4	22,6 ± 1,1	0,0	7,3 ± 2,2	21,7 ± 5,2	0,0	7,8 ± 3,6	10,7 ± 1,2	5,1 ± 0,8	1,8 ± 1,1	16,3 ± 2,4
	MRS	0,0	5,9 ± 1,1	23,4 ± 2,0	0,0	1,3 ± 0,7	22,8 ± 2,3	0,0	8,7 ± 3,7	11,7 ± 4,2	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	12,9 ± 2,3	21,7 ± 2,2	0,0	5,2 ± 0,8	21,6 ± 2,3	0,0	17,6 ± 2,1	10,8 ± 0,8	0,0	4,2 ± 4,4	21,6 ± 3,6
E198 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	15,0 ± 2,2	19,8 ± 2,9	0,0	6,4 ± 0,7	20,4 ± 3,0	0,0	8,7 ± 3,2	9,8 ± 2,0	2,7 ± 0,7	0,0	21,9 ± 1,6
	MRS	0,0	7,2 ± 1,8	21,0 ± 2,1	0,0	0,0	18,2 ± 2,7	0,0	10,8 ± 3,5	10,8 ± 2,4	0,0	0,0	0,0
	LSM	0,0	13,6 ± 1,8	20,0 ± 2,3	0,0	4,8 ± 1,7	19,9 ± 4,1	0,0	7,2 ± 3,0	9,9 ± 2,5	1,8 ± 0,7	0,0	22,3 ± 1,4
E216 izolátum	Iso-Sensitest	0,0	14,8 ± 2,0	23,1 ± 1,5	0,0	8,8 ± 2,0	20,2 ± 1,9	6,7 ± 1,3	9,1 ± 5,0	12,4 ± 1,0	5,3 ± 2,6	0,0	17,2 ± 2,5
	MRS	0,0	3,0 ± 1,7	21,8 ± 3,3	0,0	0,0	17,8 ± 2,8	7,8 ± 1,4	20,9 ± 2,9	11,1 ± 1,3	0,0	0,0	12,0 ± 2,1
	LSM	0,0	11,7 ± 1,2	22,4 ± 1,7	0,0	4,3 ± 1,1	19,1 ± 1,8	7,8 ± 1,2	13,1 ± 3,6	11,6 ± 2,4	0,0	0,0	18,0 ± 1,7

* A mm-ben feltüntetett gátlózona-átmérők 3 technikai × 2 biológiai ismétlés átlag- és szórásértékei.

** CN10: 10 µg gentamicin, C30: 30 µg kloramfenikol, VA30: 30 µg vankomicin, S10: 10 µg sztreptomycin, E15: µg eritromicin, DA2: 2 µg klindamicin, AM10: 10 µg ampicillin, TE30: 30 µg tetraciklin, K30: 30 µg kanamicin, NA30: 30 µg nalidixsav, SXT25: 1,25 µg trimetoprim + 23,75 µg szulfametoxazol.

4.3. Genetikai azonosítás

A genetikai azonosítás eredményeit a **6. táblázat** foglalja össze. Látható, hogy az erdélyi nyerstej-, aludttej- és sajtminiókból izolált törzsek mindegyike a laktobacillusok közé tartozott **[11]**. A szekvenálás nyomán sikerült egy *Lcb. paracasei* subsp. *tolerans*-t, öt *Levilactobacillus brevis*-t és egy *Lpb. plantarum*-ot beazonosítani. A pontosság 99-100%-os volt, tehát az azonosítás mindenhol egyértelmű eredményt hozott.

6. táblázat. A genetikai azonosítás eredményeinek összefoglalása

Izolátum	Azonos/ összes nukleotid száma	Eltérő	Hiányzó	Azonosított törzs
		bázispárok száma		
E10	1070 / 1070 (100%)	0	0	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC 15906
E15	1199 / 1200 (99,9%)	1	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E66	1194 / 1194 (100%)	0	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E92	1118 / 1120 (99,8%)	2	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E173	995 / 999 (99,6%)	4	3	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E198	1185 / 1198 (98,9%)	13	11	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E216	1102 / 1102 (100%)	0	0	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149

5. Következtetések

A probiotikus törzsek szelektálására szolgáló *in vitro* tesztrendszer további elemeinek kimunkálására és alkalmazására irányuló törekvésünk összességében sikeres volt. Az egyes lépéseket nem feltétlenül szükséges tovább finomítani, hiszen már jelenlegi formájukban is alkalmasak akár nagyobb izolátummennyiség előszelektálására. Amennyiben a törzseket probiotikumként tervezzük felhasználni, érdemes lehet számos, egyéb patogén mikrobára gyakorolt gátló aktivitásukat tesztelni, valamint az átadható antibiotikum-rezisztenciagének jelenlétét molekuláris biológiai módszerekkel feltérképezni. Az *in vitro* tesztrendszer összes elemének alkalmazása során, izolátumaink között nem találtunk olyat, amely teljes biztonsággal alkalmazható lenne probiotikus termékek előállításához. Ugyanakkor bebizonyosodott, hogy tesztrendszerünk alkalmas a nem biztonságos izolátumok hatékony kiszűrésére.

6. Köszönetnyilvánítás

Hatvan Zoltán köszöni az Innovációs és Technológia Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatását (projekt azonosító: ÚNKP-21-2-I-SZE-32).

A szerzők köszönik a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból finanszírozott RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt támogatását.

7. Irodalom

- [1] Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66 pp. 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- [2] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11 pp. 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [3] Fijan, S., Frauwallner, A., Varga, L., Langerholc, T., Rogelj, I., Lorber, M., Lewis, P., Povalej-Bržan, P. (2019): Health professionals' knowledge of probiotics: an international survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 3128. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173128>

- [4] Fijan, S., ter Haar, J.A., Varga, L. (2021) Probiotic microorganisms and their benefit to human health. In *Advances in Probiotics: Microorganisms in Food and Health*, eds. Dhanasekaran, D., Sankaranarayanan, A. pp. 3-22. Academic Press and Elsevier: London, San Diego, Cambridge, Oxford. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00001-0>
- [5] Süle, J., Varga, L., Varga, K., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) Probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas kísérleti rendszer egyes elemeinek kidolgozása (Developing basic elements of an experimental system for selection of probiotic bacterial strains). *Magyar Állatorvosok Lapja* 144 (közlésre benyújtva).
- [6] Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015): Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* 6 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
- [7] Williams, C.F., Walton, G.E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G.R. (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual Review of Food Science and Technology* 6 pp. 329-350. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015429>
- [8] Antal, O., Némethné Szerdahelyi, E., Takács, K. (2020): *In vitro* humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén (Application of *in vitro* human digestion models in the field of nutrition science). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 66 pp. 3141-3157.
- [9] Süle, J., Varga, L., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) *In vitro* tesztrendszer alkalmazása probiotikus baktériumtörzsek szelektálására (Application of an *in vitro* test system for the selection of probiotic bacterial strains). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 68 pp. 3904-3927.
- [10] Ouwehand, A.C., Forssten, S., Hibberd, A.A., Lyra, A., Stahl, B. (2016): Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine* 48 pp. 246-255. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>
- [11] Zheng, J.S., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 70 pp. 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- [12] URL¹: <https://www.mn-net.com/media/pdf/91/f9/1f/Instruction-NucleoSpin-Microbial-DNA.pdf> (Hozzáférés: 2022. 05. 03.)
- [13] URL²: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Hozzáférés: 2022. 04. 11.)
- [14] Miao, J.Y., Guo, H.X., Ou, Y.W., Liu, G., Fang, X., Liao, Z.L., Ke, C., Chen, Y.J., Zhao, L.C., Cao, Y. (2014): Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control* 42 pp. 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.041>
- [15] Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. (2006): Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16 pp. 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- [16] International Organization for Standardization (ISO), International Dairy Federation (IDF) (2010): Milk and milk products – Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB). International Standard ISO 10932:2010(E) and IDF 223:2010(E). ISO, Geneva, Switzerland and IDF, Brussels, Belgium.
- [17] Huys, G., D'Haene, K., Swings, J. (2002): Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Letters in Applied Microbiology* 34 pp. 402-406. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01109.x>
- [18] Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (2001): Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection* 64 pp. 2007-2014. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.12.2007>
- [19] Wolupeck, H.L., Morete, C.A., DallaSanta, O.R., Luciano, F.B., Madeira, H.M.F., de Macedo, R.E.F. (2017): Methods for the evaluation of antibiotic resistance in *Lactobacillus* isolated from fermented sausages. *Ciência Rural* 47 e20160966. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160966>

In vitro evaluation of certain probiotic properties of lactic acid bacteria isolates

Keywords: probiotic, lactic acid bacteria, antibiotic resistance, antimicrobial activity

1. Abstract

Bacteria carrying genes responsible for antibiotic resistance cannot be used in food production. For this reason, exploring the antibiotic resistance profile of probiotic candidates and the antimicrobial substances they produce are essential for probiotic strain selection. The aim of this study was to develop and evaluate additional elements of a complex *in vitro* test system for rapid and efficient selection of a large number of putative probiotic isolates. In a previous work, we had tested bacterial strains (n=217) isolated from Transylvanian raw sheep milk, cultured sheep milk, and sheep cheese samples and we reduced the sample number to a total of six Gram-positive, non-hemolytic, catalase-negative, well-aggregating, good acid and bile acid tolerating strains. In this research, we investigated the antibiotic resistance and antimicrobial production capacity of the pre-selected strains (n=6). The antimicrobial activity of the isolates was determined by the agar well diffusion assay. Strains E15, E66, E173, E198, and E216 were found to inhibit the growth of both *Salmonella Enteridis* ATCC 13076 and the control strain (i.e., *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356). Antibiotic resistance tests were performed by the agar disk diffusion method. All six isolates belonging to the species of *Levilactobacillus brevis* and *Lactiplantibacillus plantarum* were found to be resistant to several antibiotics and, therefore, cannot be used for the manufacture of commercial probiotic products. In conclusion, our *in vitro* test system proved to be capable of effectively screening out unsafe isolates.

¹ Hungarian Dairy Research Institute Ltd

² Széchenyi István University, Albert Casimir Faculty at Mosonmagyaróvár, Department of Food Science

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

Judit SÜLE
László VARGA
Zoltán HATVAN
Zoltán KERÉNYI

jsule@mtki.hu
vargal@mtk.nyme.hu
info@ovargazdasz.hu
kerenyiz68@gmail.com

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

2. Introduction

Probiotics are viable microbes - typically, but not exclusively, bacteria - that, when administered in sufficiently large quantities, exert positive effects on human or animal health [1, 2, 3, 4]. Some of their physiological benefits (e.g., restoration of damaged microbiota, competitive exclusion of pathogens, production of acids and short-chain fatty acids) are widespread in the well-known and extensively studied probiotic genera, whereas others (e.g., neutralization of carcinogens, strengthening of the intestinal barrier) are common in the majority of strains of a probiotic species (so-called species-level effects), while a third group of beneficial effects (e.g., neurological, immunological, and endocrinological effects) are rare and occur in only a few strains of a given species (so-called strain-level effects) [2].

A large number of bacterial strains are being isolated worldwide with the aim of finding strains with superior properties that are believed to be probiotic. Expensive and complicated animal studies must be preceded by a pre-selection system of *in vitro* studies [5], which can quickly, easily, and relatively cheaply select strains - from thousands of isolates - that are hoped to be probiotic in subsequent *in vivo* experiments [6, 7, 8].

In a previous study, we tested bacterial strains (n=217) isolated from raw milk, cultured milk and cheese samples produced in Transylvania and found a total of 6 Gram-positive, non-hemolytic, catalase-negative, well-aggregating, good acid and bile acid tolerating strains [9]. We also aimed to test one isolate (E10), which is not well-aggregating and has poor acid and bile acid tolerance. In this work, we investigated the antibiotic resistance and antimicrobial production capacity of the pre-selected strains (n=6+1). Bacteria carrying genes responsible for antibiotic resistance cannot be used for food production, therefore, the elucidation of the antibiotic resistance profile of probiotic strains and the knowledge of the antimicrobial substances they produce is essential for the selection of probiotic strains [10].

With this in mind, the aim of the present research was to develop and evaluate further elements of the *in vitro* test system, which included the assessment of antibiotic resistance and antimicrobial activity of the selected bacterial strains and their genotyping. Ultimately, we aimed to find probiotic strains that show antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, while not being resistant to any antibiotics and genetically belonging to the genus *Lactobacillus* or one of its descendant genera [11].

3. Materials and methods

3.1 Bacterial strains used in this study

As mentioned above, based on the results of a previous work [9], seven bacterial strains isolated from raw sheep milk, fermented sheep milk and sheep cheese samples produced in Transylvania were included in this study. The selected strains represented a single clonal group as determined by RAPD-PCR. Six of the isolates performed excellently in the classical microbiological tests (i.e., colony morphology, Gram staining, catalase assay, hemolysis test), the auto-aggregation test and the acid and bile acid tolerance tests, whereas the seventh (E10) was included in our further experiments because it performed the least well in all the tests based on preliminary results. Our intention was to find out if it would perform better in further tests or if it would continue to significantly underperform the other strains in all important traits.

Isolates were preserved and stored in glycerol stock solution. A loopful of the strain taken from the surface of MRS-CC agar or MRS pH 5.4 agar was washed into 3 ml of medium and incubated according to the requirements of the specific strain. 300 µl of bacterial culture and 900 µl of 60% glycerol solution were added to a freezer tube. They were vortexed and then frozen in liquid nitrogen for about 30 s. Storage was at -80 °C in an ultra-low freezer. Strains were revived and cultured as shown in **Table 1**.

Table 1. Revival and maintenance conditions of isolated and control bacterial strains involved in this study

Strain	Internal identifier	M / T / P / C*
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC 15906**	E10	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E15	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E66	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E92	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E173	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869**	E198	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149**	E216	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN

Strain	Internal identifier	M / T / P / C*
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	B1	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	B4	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	B10	MRS / 37 ± 1 / 72 / AN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	B40	CASO / 37 ± 1 / 24 / A
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 49775	B41	CASO / 37 ± 1 / 24 / A
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. Enteritidis ATCC 13076	B51	CASO / 37 ± 1 / 24 / A

*M: maintenance medium, T: incubation temperature (°C), P: incubation period (hour), C: incubation conditions (A: aerobic, AN: anaerobic).

**Bacterial isolates were identified to species level, based on the results of genetic tests, at the end of the study.

3.2. Conditions and media used for selective culturing

3.2.1. Physiological saline solution

For the dilution fluid used to prepare the decimal dilution series, 8.5 g of NaCl was added and dissolved in 1 L of distilled water. Sterilization was carried out in an autoclave at 121 °C for 15 min. The casein peptone solution was prepared in a similar manner with the addition of 1 g of tryptone (casein peptone).

3.2.2. Phosphate buffer solution (PBS)

We used commercially available 1 × PBS solution (Biolab Zrt., Budapest, Hungary), which was sterilized at 121 °C for 15 min before use.

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

The commercially available MRS agar and broth (Oxoid, Basingstoke, UK) were prepared according to the manufacturer's instructions. The recommended amounts (62 g and 52 g, respectively) were measured analytically and dissolved in 1 L of distilled water each. A heated magnetic stirrer was used to assist dissolution of the components, followed by sterilization of the media in an autoclave (121 °C for 15 min). The pH (6.2) was checked after sterilization.

3.2.4. M17 agar and broth (according to Terzaghi)

Following the manufacturer's instructions (Biokar Diagnostics, Allonnes, France), 57.2 g of dehydrated M17 agar and 42.2 g of broth were weighed on an analytical balance and dissolved in 1000 ml of distilled water each. The culture media were heated until the components were completely dissolved, then transferred to heat-resistant vials and sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 min.

3.2.5. CASO agar and broth

CASO agar and CASO broth were also prepared according to the manufacturer's (Biolab) instructions. 45 g and 36 g, respectively, were dissolved in 1 L of water each. After dissolution, sterilization was performed in an autoclave under standard parameters (121 °C, 15 min).

3.2.6 Anaerobic culturing

Anaerobic conditions were generated during the trials as follows: agar plates were incubated in AnaeroPack Rectangular jars (Merck, Darmstadt, Germany) with GENbox anaerobic salt (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The presence of anaerobic conditions was indicated by the change from white to blue color of the Microbiologic Aerotest indicator (Merck).

3.3. Antimicrobial activity testing

3.3.1. Materials and tools needed for this study

3.3.1.1. CASO agar

It was prepared as described in subsection 3.2.5.

3.3.1.2 Afilact® Fluid lysozyme enzyme

The active ingredient in the preservative, produced by Chr. Hansen (Hørsholm, Denmark), is lysozyme, which inhibits the growth of a number of Gram-positive bacteria. Lysozyme is an approved food

ingredient in more than 30 countries. The product contains an enzyme extracted from egg white (E1105) and is suitable for use in the EU for the preservation of cheese.

3.3.1.3. Flóraszept

Flóraszept (Unilever, Budapest, Hungary) is a disinfectant. Its main active ingredient is sodium hypochlorite, which is effective against both bacteria and fungi. The product was used undiluted in our experiments.

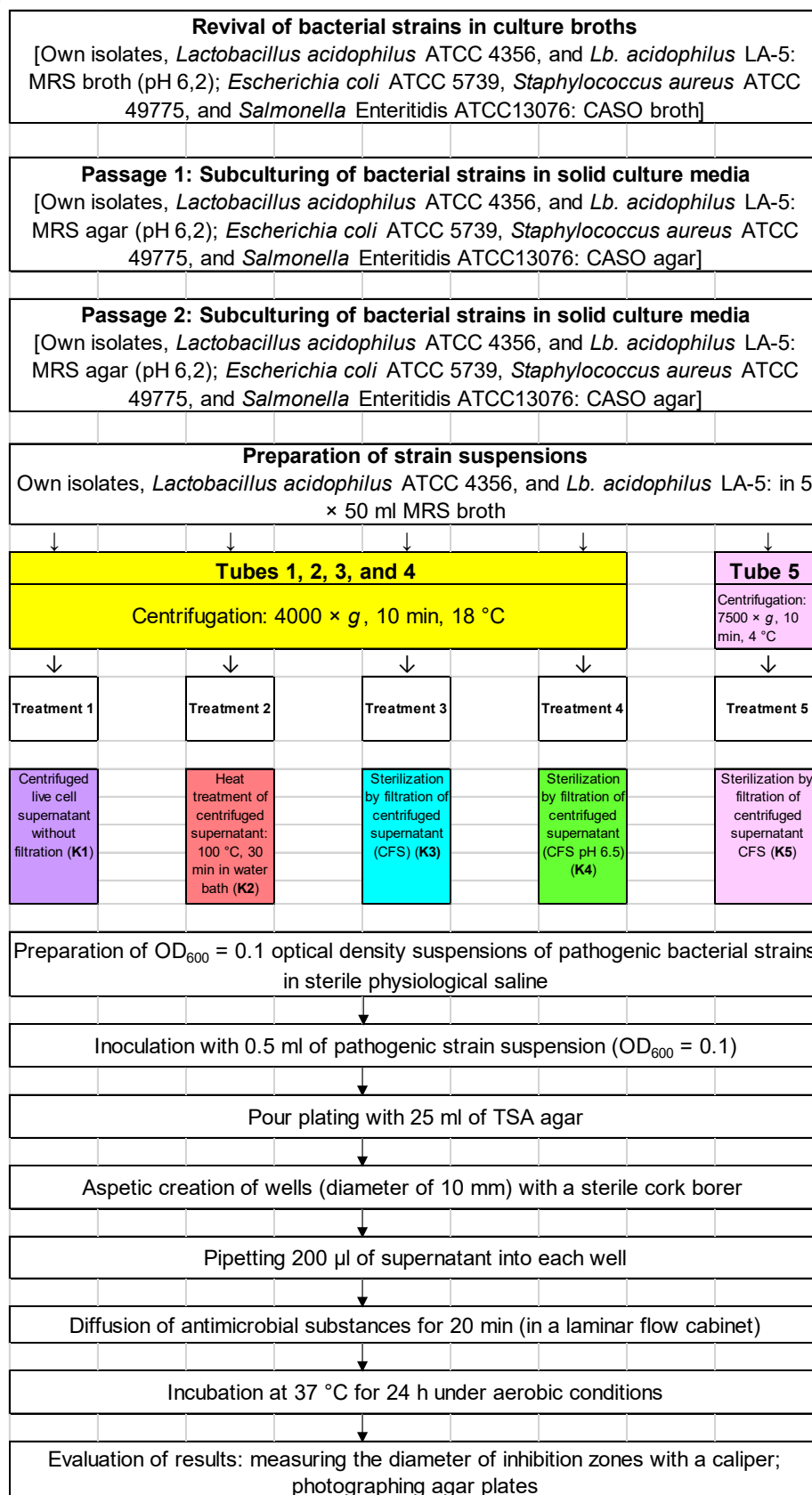


Figure 1. The process of antimicrobial activity testing

3.3.2. Agar well diffusion assay

3.3.2.1. Preparation of pathogenic bacteria suspensions

The bacterial strains were revived and then passed twice. After the second passaging, 24 h fresh cultures were used to prepare suspensions. 10 ml of sterile distilled water was pipetted onto the colonies grown on the medium and the colonies were carefully loosened from the agar surface using a flat-ended cell spreader. The suspensions were then pipetted from the Petri dishes into plastic Falcon tubes. Cell densities were adjusted, based on the principle of optical density, by measuring at 600 nm wavelength with a BioMate 160 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). The values were standardized to 0.1 for each sample to allow comparison of the measurement results.

3.3.2.2. Preparation of agar plates

0.5-0.5 ml of the bacterial suspensions prepared as described above were pipetted into sterile Petri dishes and plates were then poured with CASO agar cooled to 45 °C. To ensure uniform distribution of microbes in the medium, gentle circular rotating movements were performed upon pouring of agar plates. After the culture medium had solidified, 4 wells of 10 mm in diameter were punched in each agar plate using a sterilized cork borer. The agar disks were aseptically removed from the plates.

3.3.2.3. Treatment of own isolate supernatants

200 µl of sterile physiological saline was pipetted into the first of the four wells. This served as a control because it did not inhibit bacterial growth, indicating that the strain was in a viable state. In the other three wells, 200 µl aliquots of the supernatant from one of the treatments of a specific isolate was added, thus achieving three technical replicates on one plate. The plates were then incubated according to the requirements of the particular bacterial pathogen.

The supernatants of the isolates to be tested were subjected to five different treatments. The first phase of the treatments was identical in that five Falcon tubes each were filled with 45 ml of MRS broth (De Man, Rogosa, Sharpe broth) and each strain was thus revived under optimum growth conditions (i.e., 37 °C, 24 h, anaerobiosis). After incubation, however, the sample preparation procedures were different as shown in **Figure 1**.

Treatment 2: The steps were the same as in treatment 1, but after pouring the contents of the second set of Falcon tubes into a sterile Falcon tube, these supernatants were heat treated (in a water bath set at 100 °C for 30 min).

Treatment 3: The steps were the same as in treatment 1, but for samples from Falcon tubes no. 3, after the second centrifugation, the supernatants were poured into a plastic urine collection cup and filtered through a membrane filter with 0.2 µm pore size into a sterile 50 ml Falcon tube.

Treatment 4: After a single centrifugation (4000 g, 10 min, 18 °C) of Falcon tubes no. 4, the culture medium was poured into new sterile Falcon tubes. The pH of the supernatant (containing the broth) was then adjusted to 6.5. 1 M NaOH was used to reach the desired value, and the pH was checked with a FiveEasy F20 pH meter (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA). After adjustment, the supernatant was filtered through a membrane filter with 0.2 µm pore size into a sterile 50 ml Falcon tube.

Treatment 5: The centrifugation parameters of Falcon tubes no. 5 were different from those used in the previous treatments. The samples were centrifuged at 7500 g for 10 min at 4 °C, and the culture medium was also drained and filled with 42 ml of 1 × PBS solution. Then centrifugation followed according to the modified settings. The supernatant was poured into a plastic urine collection beaker and filtered through a membrane filter with 0.2 µm pore size into a sterile 50 ml Falcon tube.

3.3.2.4 Incubation and measurement of inhibition zones

Following 20 min of diffusion, the plates were placed in a thermostat and incubated according to the requirements of the pathogenic bacteria. The diameter of inhibition zones was measured with a caliper. Each test was performed with two parallel plates. Two types of outcomes were observed, i.e., either an inhibition zone developed around the well containing the supernatant or no change was visible around it. The latter meant that the bacterial supernatant neither inhibited nor stimulated bacterial growth.

3.4. Antibiotic susceptibility testing

3.4.1. Materials and tools needed for the study

3.4.1.1 De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (pH 6.2)

It was prepared as described in subsection 3.2.3.

3.4.1.2. Iso-Sensitest agar

As recommended by the manufacturer (Oxoid), 31.4 g of product was dissolved in 1 L of water. After complete dissolution of the components, the media were sterilized at 121 °C for 15 min.

3.4.1.3 Lactobacillus Susceptibility Medium (LSM)

MRS (Oxoid) and Iso-Sensitest (Oxoid) media were required for the preparation of LSM agar. 900 ml of Iso-Sensitest broth and 100 ml of MRS broth were mixed together and 15 g of agar-agar was also added. Sterilization was carried out under standard parameters (121 °C, 15 min).

3.4.1.1.4. Antibiotic-impregnated filter paper disks

The characteristics of the antibiotic susceptibility disks (Biolab) used in this study are summarized in **Table 2**.

Table 2. Active substance concentrations of antibiotic sensitivity disks used for antibiotic resistance testing

Name of antibiotic	Concentration of active substance (µg)	Abbreviation
Ampicillin	10	AM10
Chloramphenicol	30	C30
Clindamycin	2	DA2
Erythromycin	15	E15
Gentamicin	10	CN10
Kanamycin	30	K30
Nalidixic acid	30	NA30
Streptomycin	10	S10
Tetracycline	30	TE30
Trimethoprim + Sulfamethoxazole	1.25 + 23.75	SXT25
Vancomycin	30	VA30

3.4.2 Process for antibiotic resistance testing

Figure 2 illustrates the steps of the antibiotic resistance tests performed.

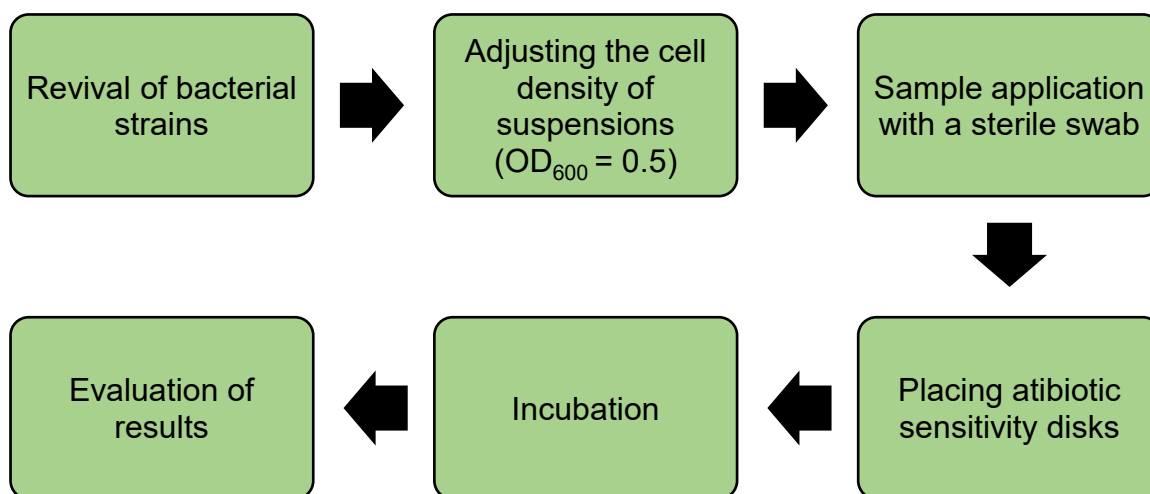


Figure 2. Scheme of antibiotic resistance testing

We revived our bacterial strains on MRS medium and incubated them under optimal conditions. We then inoculated a solitary colony onto the surface of a new MRS medium to ensure that we were starting from a single colony and not working with mixed cultures. After 24 h, 10 ml of distilled water was pipetted onto the grown colonies to dissolve them, taking care not to mix medium into the suspension. The solution was pipetted from the top of the Petri dish into a Falcon tube. The density of the cell suspensions was then adjusted to $OD_{600} = 0.5$ using a BioMate 160 UV-Vis spectrophotometer. For each dilution, we checked

whether our calculations were correct. Cell suspensions were then applied to the surface of the media (MRS agar, ISO-Sensitest agar, LSM agar) with sterile swabs in such a way that the entire surface of the media was covered by the applied sample volume. The Petri dishes were allowed to stand for 15 min to let the microbes adapt to the conditions. Six antibiotic resistance disks (including 1 blank disk) were placed in each Petri dish, which were then incubated under optimum conditions (37 °C, 24 h, anaerobiosis). After 1 d of incubation, the inhibition zones were measured with a caliper. The diameter of the disk (6 mm) was always subtracted from the size of the zones.

3.5. Genetic identification

3.5.1. Materials

The specific materials used for genetic identification included:

- Bacterial cultures on the surface of agar media
- NucleoSpin Microbial DNA isolation kit (Macherey-Nagel kit)
- DreamTaq Green PCR Master Mix 2x
- 27f and 1492r primers
- Agarose gel
- EcoSafe nucleic acid staining solution
- Gene Ruler 1kb plus DNA ladder
- GeneJet PCR purification kit (Thermo Fisher)

3.5.2. Identification process

The steps of genetic identification are shown in **Figure 3**.

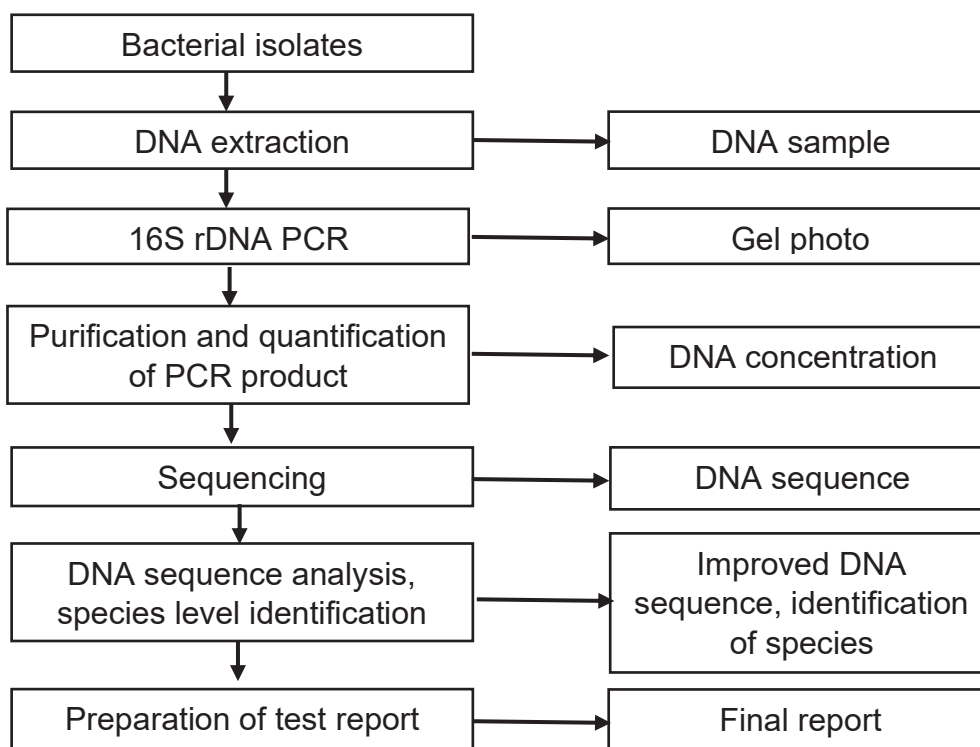


Figure 3. Steps of genetic identification and the result of each step

The seven-step assay method was performed as follows: (1) extraction of genomic DNA; (2) 16S rDNA PCR run; (3) agarose gel electrophoresis; (4) evaluation of gel photo; (5) Purification of PCR product, determination of DNA concentration and purity; (6) DNA sequencing; (7) sequence analysis, evaluation.

3.5.2.1. Extraction of genomic DNA

Glycerol-containing stock solutions of bacterial strains were spread with a loop on MRS agar plates and incubated overnight at 37 °C under anaerobic conditions. Solitary colonies were transferred to MRS agar plates and incubated again. The solitary colonies required for genomic DNA extraction were washed into Eppendorf

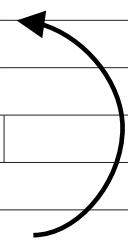
tubes filled with 1.5 ml of physiological saline. Genomic DNA purification was performed using the NucleoSpin Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol [12].

3.5.2.2. 16S rDNA PCR

The DNA samples extracted were verified by polymerase chain reaction. For this purpose, a reaction mixture of DreamTaq Green PCR Master Mix (2×), primers 27f and 1492r, AccuGENE water of molecular biological purity (Lonza, Basel, Switzerland) and purified DNA from the bacterial isolates was weighed in a 1.5 ml Safe Seal Eppendorf tube. The assay was performed on a Mastercycler PCR machine (Eppendorf, Hamburg, Germany) running the 16S rDNA program. The specific settings are shown in **Table 3**.

Table 3. Parameters for each cycle of the 16S rDNS program

Step no.	Name of process	Temperature (°C)	Time
1	Warm up	95	4 min
2	Denaturation	95	20 sec
3	Annealing	54	30 sec
4	Extension	72	1 min
5	Elongation	72	5 min
6	Maintaining temperature	10	∞



*Steps 2-4 were repeated a total of 40 times.

3.5.2.3. Agarose gel electrophoresis

Upon completion of the program, agarose gel electrophoresis was used to visualize the amplified DNA molecules. To prepare a 1% agarose gel, 0.6 g of agarose (VWR) was dissolved in 60 ml of 1 × TBE (Tris/Borate/EDTA buffer) solution. The mixture was then boiled until the agar was completely dissolved. During cooling after boiling, the solution was stirred with a magnetic stirrer and 6 µl of DNA ECO Safe staining solution (Pacific Image Electronics, Torrance, CA, USA) was added. A gel tray and gel comb were used for gel casting. After solidification of the agarose, the comb was removed from the gel and the tray was placed in the electrophoresis tank, which was filled with buffer (1×TBE solution). PCR reaction products were added to the wells and separation was started.

3.5.2.4. Evaluation of gel photo

After running gel electrophoresis, we checked whether the products all samples contained DNA. To this end, a DNA size marker was added to the gel with the samples before starting the separation.

3.5.2.5 Purification of PCR product, determination of DNA concentration and purity

The DNA concentration and purity of each product were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher) and sent to an external company (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands) for sequencing.

3.5.2.6. DNA nucleotide sequence determination (sequencing)

Only a part of the workflow was done in our laboratory located in Mosonmagyaróvár, Hungary. This included the preparation of samples, sending them for sequencing, and the evaluation of results. The DNA samples to be identified were dispensed into 1.5 ml Eppendorf tubes, which were labeled with a sticker bearing the identification number and the name of the primer (i.e., 27f, 1492r). DNA was sequenced with both forward and reverse primers. For this reason, each sample was split in two (5-10 µl). The primers to be used for sequencing were also dispensed and labelled. Finally, all tubes were sealed with parafilm and sent to the service provider (Macrogen Europe).

3.5.2.7. Analysis and evaluation of DNA sequences

The service provider sent the nucleotide sequences of DNA samples via email. The files could be downloaded from the link provided. The Chromas and ChromasPro programs (Technelysium, Brisbane, Australia) were used to manage the files. The sequences obtained with forward and reverse primers were aligned and the non-evaluable bases were trimmed from the beginning and end of the resulting sequence. Where the two sequences differed, the correction offered by the chromatogram was applied. The corrected nucleotide sequence that could be extracted from here was then evaluated using the "nucleotide blast" option of the Basic Local Alignment Search Tool online [13].

4. Results and discussion

4.1. Antimicrobial activity tests

The results of tests carried out to determine the antimicrobial activity of our isolates are shown in **Table 4**.

Table 4. Results of antimicrobial activity tests (diameter of inhibition zone expressed in mm)*

Inhibitory agent	Treatment**	Bacterial pathogen to be inhibited		
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 49775	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076
Flóraszept	Undiluted	8	14	9.0
Afilact Fluid	Undiluted	0	8	0.0
Isolate E10	K1	0	0	0.0
	K2	0	0	0.0
	K3	0	0	0.0
	K4	0	0	0.0
	K5	0	0	0.0
Isolate E15	K1	0	0	15.3
	K2	0	0	14.2
	K3	0	0	16.5
	K4	0	0	0.0
	K5	0	0	10.9
Isolate E66	K1	0	0	7.3
	K2	0	0	13.8
	K3	0	0	13.7
	K4	0	0	0.0
	K5	0	0	11.7
Isolate E92	K1	0	0	0.0
	K2	0	0	11.7
	K3	0	0	8.0
	K4	0	0	0.0
	K5	0	0	13.0
Isolate E173	K1	0	0	20.8
	K2	0	0	22.3
	K3	0	0	17.5
	K4	0	0	5.8
	K5	0	0	20.5
Isolate E198	K1	0	0	13.0
	K2	0	0	13.8
	K3	0	0	9.3
	K4	0	0	0.0
	K5	0	0	12.2
Isolate E216	K1	0	0	16.0
	K2	0	0	15.0
	K3	0	0	15.0
	K4	0	0	0.0
	K5	0	0	18.0

* Values are means of 9 technical × 2 biological replicates.

** For a detailed description of the treatments, see subsection 3.3.2.3.

ATCC: American Type Culture Collection [a U.S.-based nonprofit organization that provides standard microbial reference strains (Ed.)].

Flóraszept, which served as a positive control, inhibited the growth of all three pathogenic bacterial strains, whereas the lysozyme-containing Afilact Fluid only inhibited the growth of gram-positive *Staph. aureus*, as was expected (**Table 4**).

No treatment of the E10 isolate had an inhibitory effect on the pathogenic bacteria tested. By comparison, Miao et al. [14] have reported that *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 isolated from Tibetan kefir produces a so-called F1 bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum. The bacteriocin was found to be heat resistant and its nature did not change at pH values of 3.0, 6.0, and 9.0. A total of 49 lactic acid bacteria strains were isolated by the named authors. The isolates were cultured in sterilized milk and the antimicrobial activity of their cell-free supernatants was tested by the agar well diffusion assay. The cell-free supernatants of seven strains showed an inhibitory activity against *Escherichia coli*. The cell-free supernatants of strains produced an inhibition zone of 10.9±0.1 mm and 12.0±0.4 mm against the indicator *E. coli*. The cell-free supernatant of our isolate E10 was not recovered from milk, but from MRS broth with pH 6.2, and this may have caused the difference between the results of the two studies.

The live cell culture of strain E15 produced an inhibition zone of 15.3 mm in diameter for *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Interestingly, dead cells of this isolate were also able to inhibit *Salm.* Enteritidis because, despite being heated at 100 °C for 30 min, strain E15 produced an inhibition zone of 14.2 mm. In contrast, the medium adjusted to pH 6.5 had no inhibitory effect on salmonellae, indicating that the antimicrobial agent synthesized by strain E15 is of acidic nature. Centrifugation at 7500 g did not result in the extraction of increased levels of antimicrobial substances and an extended inhibition zone.

The viable culture of strain E66 (treatment 1) formed an inhibition zone of only 7.3 mm in diameter, whereas treatments K2 and K3 showed the highest level of inhibition against the *Salmonella* strain tested in this study. Treatment 4 had no detectable effect on any of the pathogenic strains. The intensive treatment 5 did not promote the formation of a larger zone of inhibition.

Neither the live culture nor the neutralized cell-free supernatant of isolate E92 had any detectable inhibitory effect on the pathogenic bacteria tested. Treatment 5 proved to be the most effective, as demonstrated by the 13.0 mm zone of inhibition.

All five treatments of strain E173 inhibited the growth of *Salm.* Enteritidis. The most effective method was heat destruction based treatment 2 with an inhibition zone of 22.3 mm. The cell-free supernatant of this isolate at pH 6.5 slightly inhibited *Salm.* Enteritidis (inhibition zone of 5.8 mm). This demonstrates that strain E173 does not exclusively produce antimicrobials of an acidic nature.

The heat-killed and live cultures of strain E198 produced inhibition zones of 13.8 mm and 13.0 mm, respectively, against *Salm.* Enteritidis. Treatment 4, however, had no detectable effect on any bacterial pathogenic tested.

Unlike treatment 4, treatments 1 and 5 of strain E216 were found to be highly effective against *Salm.* Enteritidis, producing inhibition zones of 16.0 mm and 18.0 mm, respectively.

Overall, none of our lactic acid bacteria isolates had a detectable effect on the tested strains of *E. coli* and *Staph. aureus*. Our results are similar to those of Maragkoudakis et al. [15], who isolated *Lb. acidophilus* ACA-DC 295 from raw milk, *Lcb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 3345 from Cheddar cheese, *Lcb. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4038 from Kasseri cheese, and *Lactiplantibacillus plantarum* ACA-DC 146 from the brine of Feta cheese and tested the antimicrobial activity of these isolates by the agar well diffusion method. It was found that none of the cell-free supernatants of the 29 lactic acid bacteria isolates inhibited the growth of pathogenic *E. coli*, *Salm.* Typhimurium and *Helicobacter pylori* strains.

4.2. Antibiotic resistance testing

Standardized antibiotic resistance studies have suggested that the MRS culture medium commonly used for culturing lactic acid bacteria may have an antagonistic effect against certain antibiotics. The *Lactobacillus* Susceptibility Medium (LSM), consisting of 90% Iso-Sensitest agar and 10% MRS agar, was developed to eliminate these inhibitory effects. LSM has been shown to promote the growth of lactobacilli and bifidobacteria, as recommended by the relevant international standard [16], while minimizing potential antagonism between the medium components and the antimicrobials tested [17]. Our findings are shown in **Table 5**.

Table 5. Results of antibiotic susceptibility tests (diameter of inhibition zone expressed in mm)*

Strain	Culture medium	Empty disk	Antibiotic**										
			CN10	C30	VA30	S10	E15	DA2	AM10	TE30	K30	NA30	SXT25
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Iso-Sensitest		-										
	MRS	0.0	0.0	25.2 ± 1.6	0.0	8.7 ± 2.3	23.5 ± 0.8	0.0	9.0 ± 3.5	21.0 ± 7.0	0.0	0.0	0.0
	LSM	0.0	11.5 ± 4.6	23.8 ± 1.5	0.0	10.2 ± 4.7	25.5 ± 2.9	0.0	0.0	18.8 ± 6.9	0.0	0.0	0.0
Isolate E10	Iso-Sensitest	0.0	17.0 ± 2.2	20.0 ± 2.3	0.0	13.2 ± 2.7	29.5 ± 3.5	7.7 ± 0.8	0.0	26.7 ± 4.6	2.5 ± 2.1	0.0	4.7 ± 2.7
	MRS	0.0	0.0	25.5 ± 2.1	0.0	0.0	21.2 ± 4.6	11.0 ± 7.6	5.7 ± 1.0	20.3 ± 4.1	0.0	0.0	0.0
	LSM	0.0	12.1 ± 2.8	23.0 ± 0.6	0.0	7.2 ± 2.8	22.3 ± 5.6	12.3 ± 4.5	0.0	21.0 ± 1.9	0.0	0.0	5.5 ± 3.2
Isolate E15	Iso-Sensitest	0.0	17.2 ± 4.1	24.2 ± 4.9	0.0	12.2 ± 0.8	25.2 ± 2.6	0.0	0.0	10.8 ± 2.0	8.5 ± 2.4	0.0	17.0 ± 2.4
	MRS	0.0	2.7 ± 0.5	25.0 ± 0.9	0.0	0.0	20.3 ± 1.9	0.0	0.0	12.5 ± 2.6	0.0	0.0	0.0
	LSM	0.0	14.3 ± 0.5	23.5 ± 2.3	0.0	3.0 ± 0.9	21.8 ± 2.3	0.0	0.0	10.0 ± 2.0	0.0	0.0	22.7 ± 1.2
Isolate E66	Iso-Sensitest	0.0	18.7 ± 0.8	21.2 ± 2.9	0.0	11.7 ± 0.5	25.3 ± 0.8	0.0	0.0	10.8 ± 2.0	8.8 ± 2.1	0.0	16.0 ± 1.3
	MRS	0.0	2.0 ± 0.9	25.2 ± 1.6	0.0	0.0	22.2 ± 1.6	0.0	5.7 ± 1.2	14.3 ± 0.8	2.3 ± 0.5	0.0	0.0
	LSM	0.0	14.5 ± 1.5	21.8 ± 3.4	0.0	4.3 ± 2.1	22.2 ± 1.5	0.0	0.0	12.7 ± 0.8	2.5 ± 1.0	0.0	22.7 ± 1.2
Isolate E92	Iso-Sensitest	0.0	17.1 ± 2.7	19.4 ± 3.8	0.0	8.6 ± 2.7	18.2 ± 4.6	0.0	8.6 ± 4.0	8.3 ± 1.7	6.0 ± 1.9	0.0	14.3 ± 3.3
	MRS	0.0	7.3 ± 1.0	21.4 ± 2.2	0.0	1.0 ± 0.1	17.6 ± 1.9	0.0	10.2 ± 1.8	10.2 ± 2.9	0.0	0.0	0.0
	LSM	0.0	13.9 ± 2.4	15.1 ± 2.0	0.0	5.6 ± 1.5	18.7 ± 2.6	0.0	7.7 ± 2.5	8.4 ± 1.8	2.9 ± 2.3	0.0	20.7 ± 4.5
Isolate E173	Iso-Sensitest	0.0	15.4 ± 1.4	22.6 ± 1.1	0.0	7.3 ± 2.2	21.7 ± 5.2	0.0	7.8 ± 3.6	10.7 ± 1.2	5.1 ± 0.8	1.8 ± 1.1	16.3 ± 2.4
	MRS	0.0	5.9 ± 1.1	23.4 ± 2.0	0.0	1.3 ± 0.7	22.8 ± 2.3	0.0	8.7 ± 3.7	11.7 ± 4.2	0.0	0.0	0.0
	LSM	0.0	12.9 ± 2.3	21.7 ± 2.2	0.0	5.2 ± 0.8	21.6 ± 2.3	0.0	17.6 ± 2.1	10.8 ± 0.8	0.0	4.2 ± 4.4	21.6 ± 3.6
Isolate E198	Iso-Sensitest	0.0	15.0 ± 2.2	19.8 ± 2.9	0.0	6.4 ± 0.7	20.4 ± 3.0	0.0	8.7 ± 3.2	9.8 ± 2.0	2.7 ± 0.7	0.0	21.9 ± 1.6
	MRS	0.0	7.2 ± 1.8	21.0 ± 2.1	0.0	0.0	18.2 ± 2.7	0.0	10.8 ± 3.5	10.8 ± 2.4	0.0	0.0	0.0
	LSM	0.0	13.6 ± 1.8	20.0 ± 2.3	0.0	4.8 ± 1.7	19.9 ± 4.1	0.0	7.2 ± 3.0	9.9 ± 2.5	1.8 ± 0.7	0.0	22.3 ± 1.4
Isolate E216	Iso-Sensitest	0.0	14.8 ± 2.0	23.1 ± 1.5	0.0	8.8 ± 2.0	20.2 ± 1.9	6.7 ± 1.3	9.1 ± 5.0	12.4 ± 1.0	5.3 ± 2.6	0.0	17.2 ± 2.5
	MRS	0.0	3.0 ± 1.7	21.8 ± 3.3	0.0	0.0	17.8 ± 2.8	7.8 ± 1.4	20.9 ± 2.9	11.1 ± 1.3	0.0	0.0	12.0 ± 2.1
	LSM	0.0	11.7 ± 1.2	22.4 ± 1.7	0.0	4.3 ± 1.1	19.1 ± 1.8	7.8 ± 1.2	13.1 ± 3.6	11.6 ± 2.4	0.0	0.0	18.0 ± 1.7

* Values are means ± SD of 3 technical × 2 biological replicates.

** CN10: 10 µg gentamicin, C30: 30 µg chloramphenicol, VA30: 30 µg vancomycin, S10: 10 µg streptomycin, E15: µg erythromycin, DA2: 2 µg clindamycin, AM10: 10 µg ampicillin, TE30: 30 µg tetracycline, K30: 30 µg kanamycin, NA30: 30 µg nalidixic acid, SXT25: 1.25 µg trimethoprim + 23.75 µg sulfamethoxazole.

Both *Lb. acidophilus* ATCC 4356 and our pre-selected isolates were found to be resistant to vancomycin and nalidixic acid, which is explained by the report of Charteris and et al. [18] that *Lactobacillus* species are inherently resistant to nalidixic acid. Wolupeck et al. [19], studying the antibiotic resistance of lactobacilli, found that all of their strains were resistant to ciprofloxacin, gentamicin, streptomycin, and vancomycin, but were sensitive to tetracycline and chloramphenicol. Our isolates (and *Lb. acidophilus* ATCC 4356) were similarly sensitive to the latter two antibiotics (Table 5).

It is worth mentioning that *Lb. acidophilus* ATCC 4356 could not grow in Iso-Sensitest agar (Table 5). Huys et al. [17] also concluded that Iso-Sensitest agar cannot be recommended for use in antibiotic susceptibility testing of lactic acid bacteria.

4.3. Genetic identification

The results of genetic identification are summarized in Table 6. All seven strains isolated from Transylvanian raw milk, fermented milk, and cheese samples were found to belong to lactobacilli [11]. Sequencing resulted in the identification of one *Lcb. paracasei* subsp. *tolerans*, five *Levilactobacillus brevis*, and one *Lpb. plantarum* with an accuracy percentage of 99-100.

Table 6. Results of genetic identification

Isolate	Number of identical / total nucleotides	Number of		Identified strain
		differing	missing	
		base pairs		
E10	1070 / 1070 (100%)	0	0	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC 15906
E15	1199 / 1200 (99,9%)	1	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E66	1194 / 1194 (100%)	0	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E92	1118 / 1120 (99,8%)	2	0	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E173	995 / 999 (99,6%)	4	3	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E198	1185 / 1198 (98,9%)	13	11	<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869
E216	1102 / 1102 (100%)	0	0	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149

5. Conclusions

Overall, our efforts to develop and apply additional elements of an *in vitro* test system for the selection of probiotic strains have been successful. Further refinement of the individual steps may not be necessary, as they are already suitable for pre-selection of even high numbers of isolates. If the strains are to be used as probiotics, it may be worthwhile to test their inhibitory activity on a number of other pathogenic microbes and to explore the presence of transferable antibiotic resistance genes by molecular biology methods. Using all the elements of the *in vitro* test system, we have found no isolates that could safely be used for the manufacture of probiotic products. However, our test system has been shown to be capable of effectively screening out unsafe isolates.

6. Acknowledgments

Zoltán Hatvan is grateful for the financial support of the New National Excellence Program of the Ministry of Innovation and Technology (project ID: ÚNKP-21-2-I-SZE-32).

The authors thank the Recovery and Resilience Facility and the National Recovery Fund for supporting this study (project no.: RRF-2.3.1-21-2022-00001).

7. References

- [1] Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66 pp. 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- [2] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11 pp. 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [3] Fijan, S., Frauwallner, A., Varga, L., Langerholc, T., Rogelj, I., Lorber, M., Lewis, P., Povalej-Bržan, P. (2019): Health professionals' knowledge of probiotics: an international survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 3128. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173128>
- [4] Fijan, S., ter Haar, J.A., Varga, L. (2021) Probiotic microorganisms and their benefit to human health. In *Advances in Probiotics: Microorganisms in Food and Health*, eds. Dhanasekaran, D., Sankaranarayanan, A. pp. 3-22. Academic Press and Elsevier: London, San Diego, Cambridge, Oxford. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00001-0>
- [5] Süle, J., Varga, L., Varga, K., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) Probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas kísérleti rendszer egyes elemeinek kidolgozása (Developing basic elements of an experimental system for selection of probiotic bacterial strains). *Magyar Állatorvosok Lapja* 144 (közlésre benyújtva).
- [6] Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015): Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* 6 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
- [7] Williams, C.F., Walton, G.E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G.R. (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual Review of Food Science and Technology* 6 pp. 329-350. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015429>
- [8] Antal, O., Némethné Szerdahelyi, E., Takács, K. (2020): *In vitro* humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén (Application of *in vitro* human digestion models in the field of nutrition science). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 66 pp. 3141-3157.
- [9] Süle, J., Varga, L., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) *In vitro* tesztrendszer alkalmazása probiotikus baktériumtörzsek szelektálására (Application of an *in vitro* test system for the selection of probiotic bacterial strains). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 68 pp. 3904-3927.
- [10] Ouwehand, A.C., Forssten, S., Hibberd, A.A., Lyra, A., Stahl, B. (2016): Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine* 48 pp. 246-255. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>
- [11] Zheng, J.S., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 70 pp. 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- [12] URL¹: <https://www.mn-net.com/media/pdf/91/f9/1f/Instruction-NucleoSpin-Microbial-DNA.pdf> (Hozzáférés: 2022. 05. 03.)
- [13] URL²: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Hozzáférés: 2022. 04. 11.)
- [14] Miao, J.Y., Guo, H.X., Ou, Y.W., Liu, G., Fang, X., Liao, Z.L., Ke, C., Chen, Y.J., Zhao, L.C., Cao, Y. (2014): Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control* 42 pp. 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.041>
- [15] Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. (2006): Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16 pp. 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- [16] International Organization for Standardization (ISO), International Dairy Federation (IDF) (2010): Milk and milk products – Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB). International Standard ISO 10932:2010(E) and IDF 223:2010(E). ISO, Geneva, Switzerland and IDF, Brussels, Belgium.
- [17] Huys, G., D'Haene, K., Swings, J. (2002): Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Letters in Applied Microbiology* 34 pp. 402-406. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01109.x>

- [18] Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (2001): Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection* 64 pp. 2007-2014. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.12.2007>
- [19] Wolupeck, H.L., Morete, C.A., DallaSanta, O.R., Luciano, F.B., Madeira, H.M.F., de Macedo, R.E.F. (2017): Methods for the evaluation of antibiotic resistance in *Lactobacillus* isolated from fermented sausages. *Ciência Rural* 47 e20160966. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160966>

Húsiparban alkalmazott összetett fűszerkeverékek minősége

Kulcsszavak: ásványi elemek, ízfokozók, komplex fűszerkeverékek, húsipar, minőség, kémiai összetétel, biztonság, tulajdonságok

1. Összefoglalás

A húsfeldolgozó iparban nagy jelentőséggel bírnak a többfunkciós komplex fűszerkeverékek, amelyek egyszerűsítik és felgyorsítják az élelmiszer-előállítást. A kutatás célja egy fűszerkeverék-előállító vállalat által gyártott termékek minőségének meghatározása volt. Megállapították, hogy az érzékszervi, fizikai és kémiai paraméterek tekintetében a fokhagymát és grillfűszereket tartalmazó készítmény összetétele megfelel az előírásoknak. A fokhagymakészítményben a gyártó által nem bejelentett étkezési só jelenlétét mutattuk ki. Élelmi rost az összes vizsgált fűszerkeverékben kimutatható mennyiségben volt jelen. A fokhagymakészítmény Al-, Li-, Mg-, P-, Si-, Sr-, Te-, tartalma, illetve megnövekedett Mo-, Ti-, V- és W-tartalma miatt különbözött a többi komplex készítménytől. A második számú keverék viszonylag nagy mennyiségben tartalmazott Ca-ot, Cr-ot és Fe-at, de kimutatható mennyiségben nem tartalmazott a gyártó által az E551 adalékként bejelentett Si-ot. A grillfűszer összetétele a Mn, Na és Zn magas tartalma miatt tűnt ki, egy másik aroma-keverék pedig a magas Cu-tartalom miatt. Meg kell jegyezni, hogy az egyik fűszerkeverékben E627 és E631 ízfokozókat, míg egy grillkeverékben pedig E450 stabilizátort és emulgeálószeret találtunk.

Számos szakértő szerint ezek az összetevők veszélyt jelentenek az emberi szervezetre, mivel bél- és gyomorpanaszokat okozhatnak. Ebben a tekintetben meg kell érteni, hogy mely élelmiszer-adalékanyagokat kell kizárni az ember étrendjéből, melyek különösen veszélyesek, és melyeket lehet a húskészítmények összetevőként biztonságosan fogyasztani időről időre kis mennyiségben.

¹ Dél-uráli Állami Egyetem Cseljabinszk

² Dél-uráli Állami Agráregyetem Troitck

³ LLC „Antey”

* *Corresponding author*

Natalya NAUMOVA
Aleksandr LUKIN
Evgenii VELISEVICH
Irina RODIONOVA
Sergey PIROZHINSKY
Yulia EREMINA

n.naumova@inbox.ru
lukin3415@gmail.com
velisevich@gmail.com
rodionova@yandex.ru
laap25@yandex.ru
eremina@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0586-6359>
<https://orcid.org/0000-0003-4753-3210>
<https://orcid.org/0000-0002-9371-4517>
<https://orcid.org/0000-0002-5092-5824>
<https://orcid.org/0000-0002-7665-8082>
<https://orcid.org/0000-0002-9859-1886>

2. Bevezetés

Az élelmiszer-adalékanyagok használata a húsparban egyszerűsíti és felgyorsítja a termelést, csökkentik termelési költségeket, és bizonyos mértékig segítenek megoldani a minőséggel, biztonsággal és tartósítással kapcsolatos problémákat. A fűszerkeverékek felhasználása általános gyakorlat Oroszországban a legkeresettebb húskészítmények, a füstölt húskészítmények, félkész termékek, kolbászok előállításának technológiáiban [1, 2, 3].

Az utóbbi időben nagy érdeklődés övezi a többfunkciós komplex fűszerkeverékeket, amelyek közé az ízesítők, a vízmegkötő foszfátkészítmények, a színtabilizátorok, valamint a húskészítmények mikrobiális és nem mikrobiális romlását lassító tartósítószerke és antioxidánsok is tartoznak [4, 5, 6].

Minden élelmiszer-adalékanyagot minőségvizsgálatnak kell alávetni, és bizonyítani kell, hogy a fogyasztók egészsége szempontjából biztonságosak [7, 8, 9, 10, 11]. Tanulmányunk célja a húsparban használt, néhány komplex élelmiszer-adalékanyag minőségének meghatározása.

3. Anyag és módszer

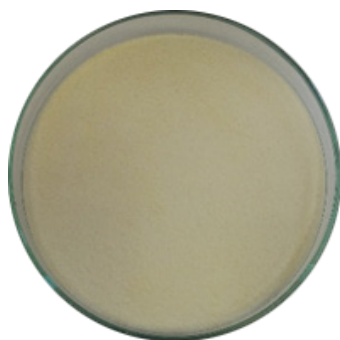
A kutatás alapanyaga egy orosz gyártó, (Moszkvai régió), által gyártott komplex élelmiszer-adalékanyag volt, a TU 10.89.19-008-58251238-20 specifikációnak megfelelően, a következő összetevőkkel:

- 1. minta (aromakeverék): dextróz, maltodextrin, étkezési só, E621, E627, E631, élesztőkivonat, fokhagyma-, bors-, kardamonnal és korianderrel készült kivonatok; E551;
- 2. minta (grillfűszer-keverék 1): dextróz, E450-E452, maltodextrin, E300, E301, étkezési só, E1442, E407, E415, granulált növényi alapú húsleves, E508, bors- és zellerkivonat, E551;
- 3. minta (grillfűszer-keverék 2): étkezési só, granulált növényi alapú húsleves, fűszerek (hagyma, fokhagyma, bors, kömény), E621, "Grill" aroma, zeller- és köménymagkivonat, E551;
- 4. minta (fokhagymakészítmény): dextróz, fokhagymapor, fokhagymakivonat, E551.

A termékek érzékszervi tulajdonságait a GOST 15113.3-77 szabvány szerint vizsgáltuk. A nedvességtartalmat a GOST 15113.4-77 szabvány, az étkezési sót a GOST 15113.7-77 szabvány, a fém- és egyéb idegenanyag-szennyeződések, a gabonakártevőkkel való szennyezettséget a GOST 15113.2-77 szabvány, a fehérje- és élelmirost-tartalmat az Oroszországban általánosan elfogadott módszerekkel [12] határoztuk meg. Az ásványianyag-tartalmat a MUK 4.1.1482-03 és MUK 4.1.1483-03 irányelvek szerint elemeztük.

4. Eredmények és diszkusszió

A vizsgált keverékek megjelenésüket tekintve (**1. ábra**) a rájuk jellemző állagú, gazdag illatú, finomra őrölt, laza porok voltak, amelyek rendre, fehér színű (aroma keverék), krémszínű (fokhagyma készítmény), világos krémszínű (grill fűszer) és krémszínű, szürke árnyalatú ('grill fűszerkeverék 2' készítmény).



1. minta (Aromakeverék)



2. minta (Grillfűszer-keverék 1)



3. minta (Grillfűszer-keverék 2)



4. minta (Fokhagymakészítmény)

1. ábra. A vizsgált adalékanyagok megjelenése

A vizsgálati eredmények alapján a nyersanyagok minőségének érzékszervi, fizikai és kémiai mutatói megfeleltek a tájuk vonatkozó követelményeknek (**1. táblázat**).

Előzetesen meg kell jegyezni, hogy az árukat kísérő dokumentumok, nevezetesen a termékleírások nem határozták meg a vizsgált készítmények összetételének egyes tápanyagok tartalmára vonatkozó (minimális vagy maximális) határértékeket. E tekintetben nehéz volt összehasonlítani a kapott eredményeket a fehérje- és zsírtartalom tekintetében a gyártó által megadott értékekkel. Ettől függetlenül a fokhagyma készítmény fehérjetartalma 4,6-szorosa volt a deklarált értéknek, az aromakészítmény – 2,9-szerese, a grill fűszerkeverék – 2,2-szerese, a hikoridió készítmény - 1,9-szerese. Az alapanyagok fehérjetartalmát elsősorban a növényi alapú húsleves, valamint az E621 és E627 ízfokozók jelenléte okozta.

1. táblázat. Az élelmiszeradalékok minőségi jellemzői

Mért jellemző	A termék leírásában deklarált érték	Eredmények			
		Aroma-készítmény	Grill fűszerkeverék 1	Grill fűszerkeverék 2	Fokhagymakészítmény
Fizikai és kémiai jellemzők					
Nedvességtartalom, m/m%	< 15,0	4,8±0,3	5,5±0,2	5,7±0,3	11,7±0,3
Fémes szennyezők tömegaránya, %	< 0,001	Nem volt kimutatható			
Kártevő-fertőzöttség	Nem megengedett				
Idegenanyag m/m%					
Fő összetevők					
Fehérje m/m %	Összetétel szerint	4,1±0,2 (1,4*)	2,4±0,1 (1,1*)	18,0±1,3 (9,3*)	3,2±0,2 (0,7*)
Konyhasó m/m %	Nem jelezték	19,3±1,6	9,4±0,7	44,5±3,2	3,5±0,2
Élelmi rosttartalom, g/100 g		3,5±0,2	1,8±0,1	1,5±0,1	6,0±0,5
Megjegyzés: * a gyártó által megadott érték szerint, g/100 g					

Különösen érdekes volt az étkezési só, amely a húskészítmények előállításánál használt komplex élelmiszer-adalékanyagok részeként számos funkciót tölt be. Nevezetesen befolyásolja a termék nedvességtartalmát, hozamát, vízakaktivitását, tárolás közbeni eltarthatóságát stb. [13]. Mennyisége a 'grill fűszerkeverék 1'-ben maximális, a fokhagymában pedig minimális volt 1:6, ami az előbbinél megfelelő, az utóbbinál pedig elfogadhatatlan (mivel nem szerepel az adalékanyag összetételében).

A növényi összetevők (fokhagymapor), karragének (E407) és a xantálgumi (E415) jelenléte a vizsgált termékekben további vizsgálatok elvégzését tette szükségessé a bennük lévő élelmi rostok mennyiségének megállapítására. Megállapítottuk, hogy a vizsgált minták közül a fokhagymakészítményben volt a legmagasabb az élelmi rostok szintje, ami fontos például a darált hús készítésekor, mivel az élelmi rostok befolyásolják annak tapadását, valamint funkcionális és technológiai tulajdonságait (nedvességtartalom, zsírtartó képesség stb.) [14]. Emellett az élelmi rostok bevitelle a húskészítményekbe megoldja a szükséges konzisztencia elérésének és a termék tulajdonságainak javításának technológiai problémáját, valamint megakadályozza a zsírosodást [15].

Figyelembe véve, hogy a fűszerkeverékek összetevői sókat, fénoxidokat és egyéb kémiai vegyületeket tartalmaztak, részletesen megvizsgáltuk ásványi összetételüket (**2. táblázat**). A fokhagymakészítmény ebből a szempontból kiemelhető, mivel különbözött a többi komplex terméktől a jelenlévő ásványi anyagok széles listája miatt (22 elemet tartalmazott). A készítményben Al-ot, Li-ot, M-ot, P-t, Si-ot, Sr-ot, Te-t mutattunk ki, valamint megnövekedett Mo-, Ti-, V- és W-tartalma is. Ez a fűszerkeverék volt az egyetlen, amely csak annyit tartalmazott, amelynek szintje nem haladta meg a TR CU 021/2011 és a SanPiN 2.3.2.1078-01 szabványait. Figyelembe véve a fenti élelmiszer-adalékanyag összetételét, megállapítható, hogy annak ásványi anyagértékéhez elsősorban a fokhagymapor járult hozzá. Ezzel kapcsolatban összehasonlítottuk a szárított fokhagymában található egyes ásványi elemek mennyiségére vonatkozó, több tudományos közleményben [16, 17] közzétett adatokat a kapott eredményekkel. Megállapítottuk, hogy a fokhagymakészítményből hiányzott egy fontos makrotápanyag, a K, amelynek jelenléte a hasonló nyersanyagokban meghaladta a nyolcezer mg/kg mennyiséget. A Ca-tartalom tagadhatatlanul alacsony volt (25,2 a 3976 mg/kg-mal ellentétben), a Fe-, Na-, Mg- és P-tartalom megfelelt az általánosan ismert adatoknak (rendre 36; 378; 561 és 3435 mg/kg).

2. táblázat. Az élelmiszeradalékok ásványi összetevői

Vizsgált elem	Eredmények mg/kg			
	Aroma keverék	Grill fűszerkeverék	Grill fűszerkeverék 2	Fokhagymakészítmény
Al	3,55±0,22	-	1,45±0,09	4,38±0,27
B	-	0,74±0,03	0,80±0,01	0,52±0,02
Ba	-	0,15±0,01	-	0,13±0,01
Ca	-	-	28,03±1,17	25,21±1,11
Cr	0,50±0,02	2,50±0,12	4,80±0,33	0,11±0,01
Cu	1,15±0,07	-	0,75±0,04	0,33±0,02
Fe	2,50±0,11	7,87±0,41	16,00±1,20	6,22±0,38
Li	-	1,48±0,09	-	2,88±0,13
Mg	0,60±0,02	2,50±0,14	3,45±0,25	65,20±3,04
Mn	0,30±0,01	1,75±0,12	-	0,27±0,01
Mo	-	-	-	0,047±0,002
Na	25,00±1,90	94,90±4,18	28,00±1,81	75,52±5,08
P	2,50±0,12	115,02±8,32	7,50±0,44	496,11±20,41
Pb	-	-	-	0,088±0,003
Si	1,50±0,08	161,14±9,16	-	381,09±17,63
Sn	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,13±0,01
Sr	-	0,05±0,01	-	0,26±0,02
Te	-	1,60±0,08	-	2,28±0,14
Ti	-	-	-	0,59±0,02
V	-	-	-	0,11±0,01
W	-	-	-	0,096±0,004
Zn	4,50±0,20	12,50±1,03	7,50±0,31	3,15±0,16

A 'grill fűszerkeverék 2' viszonylag magas Ca, Cr és Fe-tartalommal rendelkezett. Ugyanakkor az ásványi összetételében nem mutatták ki a Si-t, annak ellenére, hogy a gyártó állítása szerint az E551 csomósodást-gátló anyag (szilícium-dioxid) jelen van benne.

A 'grillkeverék 1' összetételét a Mn, Na és Zn megnövekedett tartalma, az aroma fűszerkeveréket pedig csak Cu-tartalma különböztette meg a hasonló termékektől.

Tudnivaló, hogy bizonyos anyagok kis dózisban ugyan, de gyakran fogyasztva, nagyobb veszélyt jelenthetnek az emberi szervezetre, mint a nagy, de ritkán fogyasztott adagok. Ilyen például a citromsav (E330), amelynek a termékekben lévő tartalma nem szabályozott, de gyomorfekélyes egyéneknél gyomorgörcsöt okozhat [10]. Ha áttekintjük a vizsgált fűszerkeverékek összetevőinek listáját, feltűnik az E627 és E631 jelenléte az aromakeverékben, és az E450 jelenléte a grill fűszerkeverékben. Több szakértő szerint ezek az összetevők károsak, mert bél- és gyomorpanaszokat okozhatnak [7, 8]. Ezért fontos megérteni, hogy mely élelmiszer-adalékanyagokat kell kizárni az ember étrendjéből, melyek különösen veszélyesek, és melyek azok, amelyeket kis mennyiségben, húskészítmények részeként, időnként biztonságosan fogyaszthatunk [10].

5. Következtetések

A vizsgált fűszerkeverékek érzékszervi, fizikai és kémiai paraméterek tekintetében megfeleltek az előírásoknak. A fokhagymakészítmény mintájában azonban a gyártó által nem deklarált étkezési só jelenlétét mutattuk ki. Az élelmi rostok minden vizsgált adalékanyagban jelen voltak. A fokhagymakészítmény mintája kiemelkedett a többi vizsgált termék közül magas Al-, Li-, Mg-, P-, Si-, Sr-, Te-tartalma, valamint a Mo, Ti, V és W jelenléte miatt. A hikoridió adalékanyagban viszonylag magas volt a Ca, Cr és Fe mennyisége. A készítmény-minta a többi vizsgált készítmény közül kiemelkedett az Al-, Li-, Mg-, P-, Si-, mennyisége miatt, de nem tartalmazta

a gyártó által az E551 részeként bejelentett Si-ot. A fokhagymakészítmény Sr-, Te- tartalma, valamint a Mo, Ti, V és W jelenléte miatt volt kiugró összetételű. A grill fűszerkeverék összetételét a megnövekedett Mn, Na és Zn tartalom jellemezte, míg az aroma készítményben a Cu értéke volt magas.

6. Összeférhetlenségek

Kijelentjük, hogy nem állunk olyan pénzügyi és személyes kapcsolatban más személyekkel vagy szervezetekkel, amelyek helytelenül befolyásolhatnák munkánkat, nincs semmilyen szakmai vagy egyéb személyes érdekelttségünk semmilyen termékben, szolgáltatásban és/vagy cégben, amely úgy értelmezhető, hogy befolyásolná a jelen dolgozat tartalmát.

7. Köszönetnyilvánítás

A munkát az Orosz Föderáció kormányának 211-es törvénye, a № 02.A03.21.0011 számú szerződés támogatta.

8. Irodalom

- [1] Agapkin, A. M. (2021): A little more on the classification and brief description of food additives. *Food Products Commodity Expert*, 5, pp. 382-386. <https://doi.org/10.33920/igt-2105-07>
- [2] Kantsurova, E. S., Kozlikin, A. V. (2020): The use of food additives in the production of semi-finished meat products. *Electronic scientific journal*, 5(34), pp. 24-26.
- [3] Belyaeva, M. A., Gulvansky, R. A., Spassky, K. G. (2019): The role of food additives in the production of minced meat semi-finished products. *Food Industry*, 3, pp. 54-57.
- [4] Krasulya, O. N., Shumsky, Yu. A., Pechurina, O. P. (2021): Experience in the implementation of management systems in the production, storage, and sale of food additives. *Meat Industry*, 2, pp. 18-22.
- [5] Zharinov, A. I., Kuznetsova, O. V. (2021): Food additives and ingredients: features of use in technology of meat products. *Meat technologies*, 2(218), pp. 30-33. <https://doi.org/10.33465/2308-2941-2021-05-30-35>.
- [6] Andreenkov, V. A., Alekhina, L. V., Mansvetova, E. V. (2015): New complex food additives for semi-smoked and boiled-smoked sausages. *Meat Industry*, 9, pp. 16-18.
- [7] Bisemalieva, H. F. (2021): Food additives, their impact on human health. *Eurasian Scientific Association*, 2-3 (72), pp. 142-143.
- [8] Maksimov, G. G., Aznabaeva, Yu. G., Zapasnaya, A. V. (2020): Food additives as a risk factor for exacerbation of chronic diseases. *Diary of the Kazan medical school*, 3 (29), pp. 31-42.
- [9] Ablyamitova, K. R., Letyagina, E. N. (2020): Food additives and food safety. *Agri-food policy of Russia*, 4, pp. 2-5.
- [10] Tolstova, N. Yu., Kuznetsova, R. V. (2020): Food additives and their impact on human health. *Science and Education*, 3(3), p. 293.
- [11] Agapkin, A. M., Ibragimova, N. A. (2021): Prohibited food additives: rationing, side effects, liability for violation of the law. *Economy and Entrepreneurship*, 2(127), pp. 1121-1124. <https://doi.org/10.34925/EIP.2021.127.2.224>.
- [12] Skurikhin, I. M., Tutelyan, V. A. (1998): *Guide to methods for analysis of food quality and safety*. Moscow, Brandes, Medicine, 342 p.
- [13] Mokretsov, I. V., Sidorov, S. A. (2018): Substantiation of the level of salt introduction into minced meat of fermented sausages for baby food. *Resource saving environmentally friendly technologies for storage and processing of agricultural products: Collection of articles based on the materials of the international scientific-practical conference dedicated to the 75th anniversary of the Kurgan region*. pp. 329-333.
- [14] Pryanishnikov, V. V. (2016): Food fibers in the technology of semi-finished meat products. *Rational nutrition, food additives and biostimulants*, 5, pp. 25-26.
- [15] Tyurina, L. E., Tabakov, N. A. (2011): *Production technology of functional meat products*. Krasnoyarsk, Krasnoyarsk State Agrarian University, 102 p.
- [16] Sidelnikova, N. A., Smirnova, V. V. (2019): Resource-saving technologies of deep processing of garlic. *Innovations in the agro-industrial complex: problems and prospects*, 4 (24), pp. 253-262.
- [17] Sidorenko, T. A. (2009): The use of local fruit and berry raw materials in the production of natural food additives [Belarus]. *Food and processing industry. Abstract journal*, 1, p. 223.

Natalya NAUMOVA¹, Aleksandr LUKIN^{1*}, Evgenii VELISEVICH¹,
Irina RODIONOVA², Sergey PIROZHINSKY³, Yulia EREMINA³

DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2023/1-3-ENG>

Arrived: December 2021- Accepted: June 2022

Identification of Quality of Complex Flavour Mixtures Used in Meat Industry

Keywords: mineral elements, taste enhancers, complex food additives, meat industry, quality, chemical composition, safety, properties

1. Abstract

Multifunctional complex flavour mixtures, which simplify and speed up food production, are of great importance in the meat processing industry. The aim of the research was to identify the quality of complex food spice mixes prepared by a producer. It was found that the compositions of the grill spice mix met the regulations in terms of organoleptic, physical, and chemical parameters. The garlic mixture sample revealed the presence of edible salt, not declared by the manufacturer. Dietary fiber was present in all the mixes under study. Garlic 1:6 sample differed from the other complex additives by the increased content of Al, Li, Mg, P, Si, Sr, Te, as well as the presence of Mo, Ti, V, and W. The 'grill spice mix' had relatively high amounts of Ca, Cr, and Fe, but did not contain detectable amount of Si, declared by the manufacturer as part of E551. The composition of the grill spice mix stood out because of the high content of Mn, Na, and Zn, an aroma mixture – Cu. It should be noted that E627 and E631 flavor enhancers were found in an aroma mixture, whereas E450 stabilizer and emulsifier was found in a grill aroma mixture.

According to a number of experts, these components pose a threat to the human body as they can cause intestinal and stomach disorders. In this regard, it is necessary to understand which food additives need to be excluded from a person's diet, which are especially dangerous, and which are safe to consume from time to time in small quantities as part of meat products.

¹ South Ural State University

² South Ural State Agrarian University

³ LLC „Antey”

* *Corresponding author*

Natalya NAUMOVA
Aleksandr LUKIN
Evgenii VELISEVICH
Irina RODIONOVA
Sergey PIROZHINSKY
Yulia EREMINA

n.naumova@inbox.ru
lukin3415@gmail.com
velisevich@gmail.com
rodionova@yandex.ru
laap25@yandex.ru
eremina@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0586-6359>
<https://orcid.org/0000-0003-4753-3210>
<https://orcid.org/0000-0002-9371-4517>
<https://orcid.org/0000-0002-5092-5824>
<https://orcid.org/0000-0002-7665-8082>
<https://orcid.org/0000-0002-9859-1886>

2. Introduction

The use of food spice mixtures in the meat industry simplifies and speeds up production, reduces the cost of goods and to a certain extent helps to solve problems of their quality, safety, and preservation. Food additives have come into common use in the production of smoked meat products, semi-finished products, sausages, which are the most demanded meat products in this country [1, 2, 3].

Recently a great deal of interest has been drawn to multifunctional complex food flavour mixes, which include flavorings, water-binding phosphate preparations, color stabilizers, as well as preservatives and antioxidants that slow down microbial and non-microbial spoilage of meat products [4, 5, 6].

All food additives must be tested for quality and prove safe for the health of consumers [7, 8, 9, 10, 11]. The purpose of the study was to identify the quality of complex spice mixtures for the meat industry.

3. Materials and methods

The material for the research were complex food additives produced by a Russian producer (Moscow Region) in accordance with TU 10.89.19-008-58251238-20 specification, having the following ingredients:

- Sample 1 (aroma mixture) dextrose, maltodextrin, edible salt, E621, E627, E631, yeast extract, extracts of garlic, pepper, cardamon, and coriander; E551;
- Sample 2 (grill mixture 1) dextrose, E450-E452, maltodextrin, E300, E301, edible salt, E1442, E407, E415, granulated vegetable-based broth, E508, extracts of pepper and celery, E551;
- Sample 3 (grill mixture 2) edible salt, granulated vegetable-based broth, spices (onion, garlic, pepper, caraway), E621, "Grill" flavoring, extracts of celery and caraway seeds, E551;
- Sample 4 (garlic product) dextrose, garlic powder, garlic extract, E551.

Organoleptic characteristics of the additives were tested according to GOST 15113.3-77. Moisture content was determined according to GOST 15113.4-77, edible salt – according to GOST 15113.7-77, metal and foreign impurities, contamination with grain pests – according to GOST 15113.2-77, protein and food fibers – using the generally accepted methods [12], minerals – according to MUK 4.1.1482-03 and MUK 4.1.1483-03 guidelines.

4. Results and discussion

In terms of appearance (**Figure 1**) the additives under study were finely ground loose powders with specific rich odors, characteristic of their constituent spices, of white color, white color with a cream hue (garlic), light cream color (grill mixture), and creamy color with a gray hue (hickory).

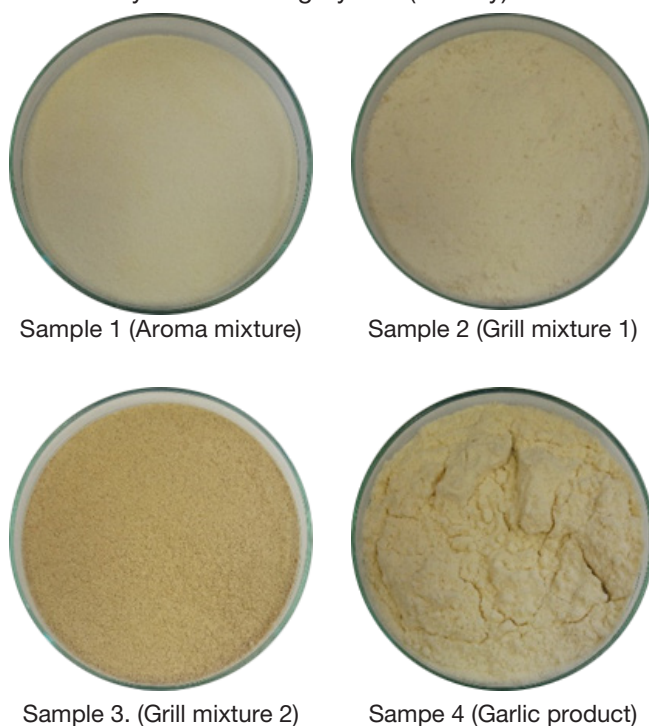


Figure 1. Appearance of spice mixture products

Based on the test results, organoleptic, physical, and chemical indicators of the quality of the raw materials were compliant with the regulations (Table 1).

It should be noted upfront that the documents accompanying the goods, namely specifications, did not specify the limits (minimum or maximum) for the content of certain nutrients in the composition of the mixtures under study. In this regard, it was difficult to compare the obtained results in terms of the amount of protein and fat with the levels declared by the manufacturer. Regardless of this, the garlic spice mixture had protein content 4.6 times higher than the regulated value, the aroma mixture – 2.9 times, the grill mixture – 2.2 times, the hickory product – 1.9 times. The protein content in the raw materials was primarily due to the presence of vegetable-based broth, and E621 and E627 flavor enhancers.

Table 1: The Quality of Spice Mixtures

Indicator	Declared in Product Specification	Results			
		Aroma mixture	Grill mixture	Hickory product	Garlic product
Physical and Chemical Indicators					
Mass fraction of moisture, %	not more than 15.0	4.8±0.3	5.5±0.2	5.7±0.3	11.7±0.3
Mass fraction of metallic impurities, %	not more than 0.001	not detected			
Pests infestation	not allowed				
Foreign impurities					
Main Components					
Mass fraction of protein, %	as per the composition	4.1±0.2 (1.4*)	2.4±0.1 (1.1*)	18.0±1.3 (9.3*)	3.2±0.2 (0.7*)
Mass fraction of edible salt, %	not stated	19.3±1.6	9.4±0.7	44.5±3.2	3.5±0.2
Dietary fiber content, g/100 g		3.5±0.2	1.8±0.1	1.5±0.1	6.0±0.5
<i>Note:</i> * as declared by the manufacturer in the specification, g/100 g					

Of particular interest was edible salt, which performs several functions as part of complex food flavour mixtures used in the production of meat products. Namely, it affects the moisture content in the product, its yield, water activity, shelf-life stability during storage, etc. [13]. Its content was maximum in 'grill spice mixture 2' and minimum in Garlic, which is acceptable for the first one and is unacceptable for the second (as not declared in the composition of the product).

The presence of plant ingredients (garlic powder), carrageenans (E407), and xantal gums (E415) in the tested additives prompted further study of the amount of dietary fiber in them. It was found that the dietary fiber level in the garlic sample was the highest among the tested samples, which is important, for example, when making minced meat, as dietary fiber affects its adhesive, as well as functional and technological properties (moisture, fat holding capacity, etc.) [14]. Also, the introduction of dietary fiber into meat products solves the technological problem of obtaining the necessary consistency and improving the properties of the product, as well as preventing fattening out [15].

Taking into account that the composition of food flavour mixtures included salts, metal oxides, and other chemical compounds, their mineral composition was studied in detail (Table 2). The garlic sample can be singled out in this respect, as it differed from the other complex mixtures by the extensive list of minerals present (containing 22 elements), the increased content of Al, Li, Mg, P, Si, Sr, Te, as well as the presence of Mo, Ti, V, and W. This product was the only one containing lead, the level of which did not exceed standards of TR CU 021/2011 and SanPiN 2.3.2.1078-01. Taking into account the composition of the above spice mixture we can see that the main contribution to its mineral value was made by garlic powder. In this regard, we compared the data on the amount of certain mineral elements contained in dried garlic published in a number of scientific papers [16, 17] with the results obtained. It was found that the garlic sample lacked K, an important macronutrient, the content of which in similar raw materials was 8622 mg/kg. The content of Ca was undeniably low (25.2 against 3976 mg/kg), the levels of Fe, Na, Mg and P were consistent with the generally known data (36; 378; 561 and 3435 mg/kg respectively).

Table 2: Mineral Composition of Flavour Mixtures

Tested Element	Test Results, mg/kg			
	Aroma mixture	Grill mixture 1	Grill mixture 2	Garlic product
Al	3.55±0.22	-	1.45±0.09	4.38±0.27
B	-	0.74±0.03	0.80±0.01	0.52±0.02
Ba	-	0.15±0.01	-	0.13±0.01
Ca	-	-	28.03±1.17	25.21±1.11
Cr	0.50±0.02	2.50±0.12	4.80±0.33	0.11±0.01
Cu	1.15±0.07	-	0.75±0.04	0.33±0.02
Fe	2.50±0.11	7.87±0.41	16.00±1.20	6.22±0.38
Li	-	1.48±0.09	-	2.88±0.13
Mg	0.60±0.02	2.50±0.14	3.45±0.25	65.20±3.04
Mn	0.30±0.01	1.75±0.12	-	0.27±0.01
Mo	-	-	-	0.047±0.002
Na	25.00±1.90	94.90±4.18	28.00±1.81	75.52±5.08
P	2.50±0.12	115.02±8.32	7.50±0.44	496.11±20.41
Pb	-	-	-	0.088±0.003
Si	1.50±0.08	161.14±9.16	-	381.09±17.63
Sn	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.13±0.01
Sr	-	0.05±0.01	-	0.26±0.02
Te	-	1.60±0.08	-	2.28±0.14
Ti	-	-	-	0.59±0.02
V	-	-	-	0.11±0.01
W	-	-	-	0.096±0.004
Zn	4.50±0.20	12.50±1.03	7.50±0.31	3.15±0.16

The ‘grill spice mix 2’ had relatively high levels of Ca, Cr, and Fe. At the same time Si was not detected in its mineral composition, despite the presence of the anti-caking agent E551 (silica), as stated by the manufacturer.

The ‘Grill mixture2’ composition was distinguished by the increased content of Mn, Na, and Zn, the aroma mixture – only in Cu content.

It is a known fact that small doses of a substance, if consumed frequently, can pose a greater threat to the human body than large but rarely consumed ones. For example, citric acid (E330), the content of which in products is not regulated, can cause an attack in patients with stomach ulcer [10]. If we refer to the list of ingredients in the tested products, we can notice the presence of E627 and E631 in the aroma mixture and E450 in the grill mixture. According to a number of experts, these are harmful components because they can cause intestinal and stomach disorders [7, 8]. So, it is vital to understand which food additives need to be excluded from a person’s diet, which are especially dangerous, and which are safe to consume from time to time in small quantities as part of meat products [10].

5. Conclusions

The tested food flavour mixtures met the regulations in terms of organoleptic, physical, and chemical parameters. However, the garlic sample revealed the presence of edible salt, not declared by the manufacturer. Dietary fiber was present in all the tested products. The garlic sample stood out from the other products under study because of the high content of Al, Li, Mg, P, Si, Sr, Te, and presence of Mo, Ti, V, and W. The ‘grill spice mix 2’ had relatively high amounts of Ca, Cr, and Fe, but did not contain Si, declared by the manufacturer as part of E551. Grill Combi PF composition was distinguished by the increased content of Mn, Na, and Zn, whereas Aroma Perfect – Cu.

6. Conflicts of interest

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

7. Acknowledgement

The work was supported by Act 211 of the Government of the Russian Federation, contract N° 02.A03.21.0011.

8. References

- [1] Agapkin, A. M. (2021): A little more on the classification and brief description of food additives. *Food Products Commodity Expert*, 5, pp. 382-386. <https://doi.org/10.33920/igt-2105-07>
- [2] Kantsurova, E. S., Kozlikin, A. V. (2020): The use of food additives in the production of semi-finished meat products. *Electronic scientific journal*, 5(34), pp. 24-26.
- [3] Belyaeva, M. A., Gulvansky, R. A., Spassky, K. G. (2019): The role of food additives in the production of minced meat semi-finished products. *Food Industry*, 3, pp. 54-57.
- [4] Krasulya, O. N., Shumsky, Yu. A., Pechurina, O. P. (2021): Experience in the implementation of management systems in the production, storage, and sale of food additives. *Meat Industry*, 2, pp. 18-22.
- [5] Zharinov, A. I., Kuznetsova, O. V. (2021): Food additives and ingredients: features of use in technology of meat products. *Meat technologies*, 2(218), pp. 30-33. <https://doi.org/10.33465/2308-2941-2021-05-30-35>.
- [6] Andreenkov, V. A., Alekhina, L. V., Mansvetova, E. V. (2015): New complex food additives for semi-smoked and boiled-smoked sausages. *Meat Industry*, 9, pp. 16-18.
- [7] Bisemaliev, H. F. (2021): Food additives, their impact on human health. *Eurasian Scientific Association*, 2-3 (72), pp. 142-143.
- [8] Maksimov, G. G., Aznabaeva, Yu. G., Zapasnaya, A. V. (2020): Food additives as a risk factor for exacerbation of chronic diseases. *Diary of the Kazan medical school*, 3 (29), pp. 31-42.
- [9] Ablyamitova, K. R., Letyagina, E. N. (2020): Food additives and food safety. *Agri-food policy of Russia*, 4, pp. 2-5.
- [10] Tolstova, N. Yu., Kuznetsova, R. V. (2020): Food additives and their impact on human health. *Science and Education*, 3(3), p. 293.
- [11] Agapkin, A. M., Ibragimova, N. A. (2021): Prohibited food additives: rationing, side effects, liability for violation of the law. *Economy and Entrepreneurship*, 2(127), pp. 1121-1124. <https://doi.org/10.34925/EIP.2021.127.2.224>.
- [12] Skurikhin, I. M., Tutelyan, V. A. (1998): *Guide to methods for analysis of food quality and safety*. Moscow, Brandes, Medicine, 342 p.
- [13] Mokretsov, I. V., Sidorov, S. A. (2018): Substantiation of the level of salt introduction into minced meat of fermented sausages for baby food. *Resource saving environmentally friendly technologies for storage and processing of agricultural products: Collection of articles based on the materials of the international scientific-practical conference dedicated to the 75th anniversary of the Kurgan region*. pp. 329-333.
- [14] Pryanishnikov, V. V. (2016): Food fibers in the technology of semi-finished meat products. *Rational nutrition, food additives and biostimulants*, 5, pp. 25-26.
- [15] Tyurina, L. E., Tabakov, N. A. (2011): *Production technology of functional meat products*. Krasnoyarsk, Krasnoyarsk State Agrarian University, 102 p.
- [16] Sidelnikova, N. A., Smirnova, V. V. (2019): Resource-saving technologies of deep processing of garlic. *Innovations in the agro-industrial complex: problems and prospects*, 4 (24), pp. 253-262.
- [17] Sidorenko, T. A. (2009): The use of local fruit and berry raw materials in the production of natural food additives [Belarus]. *Food and processing industry. Abstract journal*, 1, p. 223.

A flexitáriánus, vegetáriánus és vegán étrendek összehasonlító elemzése

Kulcsszavak: egészséges táplálkozás, flexitáriánus, vegetáriánus, vegán, alternatív táplálkozási forma, fenntartható mezőgazdaság

1. Összefoglalás

Háttérinformáció: Az egészség megőrzésének egyik legfontosabb eleme az egészséges táplálkozás. Egyes étrendek, mint a flexitáriánus, vegetáriánus és vegán táplálkozási trendek társíthatók az egészséges életmóddal, melynek köszönhetően napjainkban egyre népszerűbbé váltak.

Cél: Kéziratunk megírásának célja az, hogy áttekintést adjon a flexitáriánus, vegetáriánus és vegán étrendek jellemzőiről, a kritikai elemzésnek alávetett és összehasonlított szakirodalmak segítségével.

Módszerek: A cikk anyagához a Google Scholar, Medline, PubMed és Science Direct adatbázisokban elektronikus keresést végeztünk. A kéziratunk összefoglalja a flexitáriánus, vegetáriánus és vegán étrendekről gyűjtött cikkek információit, továbbá keresi a táplálkozási irányzatok összefüggéseit is.

Eredmények: A vegán (100%-ban növényi alapú étrend), vegetáriánus (növényi eredetű termékekben gazdag étrend) és flexitáriánus (növényi alapú, de a minőségi állati eredetű termék (pl.: hús) fogyasztást előnyben részesítő étrend) táplálkozási irányzatok kerültek az eredmények középpontjába.

Következtetés: A flexitáriánus, vegetáriánus és vegán étrendek a táplálkozási ajánlások betartásával hozzájárulnak az egészséges életmódhoz és a fenntartható mezőgazdasághoz. A diéták közös alapja a természeti értékek megbecsülése és az egészség megőrzése.

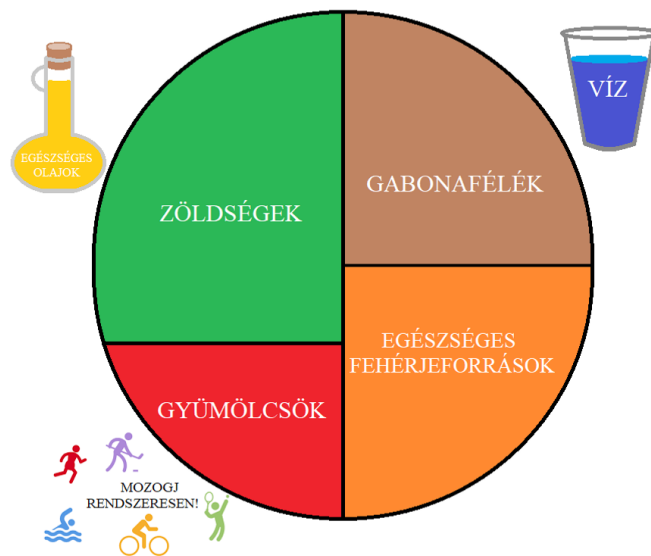
¹ Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Vízgazdálkodási és Természeti Ökoszisztémák Tanszék

² SISAF Nanotechnology Drug Delivery, Ulster University

* *Levelező szerző*

2. Bevezetés

Az egészséges táplálkozás nagyban hozzájárul az egészséges életmódhoz és a betegségek megelőzéséhez [1, 2, 3]. Ezért számos egészséges táplálkozásra vonatkozó ajánlást fogalmaztak meg a táplálkozástudományi szakemberek hazai és nemzetközi szinteken. Ezek közül a legújabb ajánlás az OKOSTÁNYÉR (1. ábra).



1. ábra. OKOSTÁNYÉR a kiegyensúlyozott étkezésért (módosított séma) [4]

Az OKOSTÁNYÉR legnagyobb arányban ($\frac{1}{2}$ részben) változatos és színes formában van tele zöldségekkel és gyümölcsökkel. A burgonya magas vércukoremelő hatása miatt nem ezen egységben foglal helyet [4].

A teljes kiőrlésű gabonaféléknek az egészséges táplálkozásban is nagy szerepe van, melyek az OKOSTÁNYÉR-ban $\frac{1}{4}$ részt foglalnak el. Többek között a teljes kiőrlésű búza, árpa, quinoa, zab vagy barna rizs is jelentős hatással vannak a humán szervezet egyensúlyi állapotaira (például a vércukor- és inzulinegyensúlyra) [4].

A fehérjeforrások (az OKOSTÁNYÉR $\frac{1}{4}$ -ét foglalják el, mint hal, baromfi, bab, dió) szintén hozzájárulnak az egészséghez a fogyasztási ajánlások betartásával. A legtöbb fehérjeforrásnak jó kiegészítői lehetnek a saláták az étlapon, míg a vörös húsok vagy a feldolgozott húsipari termékek (szalonna, kolbász) mérsékelt fogyasztása ajánlott [4].

Az egészséges növényi olajok, például az olíva, a repce, a szójabab, a kukorica, a napraforgó és a földimogyoró olaj mértékletes fogyasztása javasolt. Az ivóvíz a legegészségesebb folyadékforrás, így annak fogyasztása ajánlott a cukros italok vagy gyümölcslevek helyett [4].

Mindemellett az OKOSTÁNYÉR legfőbb üzenete az, hogy a legnagyobb hangsúlyt az étrend minőségére fektessünk, például arra, hogy milyen típusú szénhidrátokat vagy zsiradékokat használjunk [4].

Az egészséges táplálkozás alapelvei mellett számos alternatív táplálkozási irányzat került a fókuszba, amelyek közül a flexitáriánus [5], a vegetáriánus [6] és a vegán [7] étrendek a legjelentősebbek. Ezek a széles körben ismert és követett táplálkozási trendek jól strukturált formában maximalizálják az emberi energia- és tápanyag-szükségletet. Továbbá a flexitáriánus, vegetáriánus és vegán táplálkozási irányzatok szoros összefüggést mutatnak az ökológiai gazdálkodás, a környezetbarát és a fenntartható mezőgazdaság filozófiájával [8, 9].

A kézirat fő célja a flexitáriánus, vegetáriánus és vegán táplálkozási irányzatok jellemzőinek bemutatása. Továbbá fontosnak tartottuk a bemutatott táplálkozási trendek táplálkozás- jellemzőinek összehasonlító elemzését az egészséges táplálkozás nyújtotta lehetőségekkel.

3. Anyag és módszer

Az áttekintő dolgozat elkészítéséhez elektronikus keresést végeztünk a Google Scholar, Medline, PubMed és Science Direct adatbázisokban. A kulcsszavak között a flexitáriánus, vegetáriánus, vegán, egészséges

táplálkozás, fenntartható mezőgazdaság, biogazdálkodás szerepeltek. Kéziratunkat a legújabb és legjelentősebb irodalmak elemzésével végeztük, hogy bemutassuk a flexitáriánus, vegetáriánus és vegán étrendek jelentőségét az egészséges életmód és az egészséges táplálkozás szempontjából.

4. Eredmények

4.1. A flexitáriánus étrend

A flexitáriánus kifejezést először 1992-ben fogalmazták meg, amely az utóbbi időben egyre népszerűbb táplálkozási irányzattá nőtte ki magát. A flexitáriánusok (a flexibilis és vegetáriánus szavak összevonásával: „rugalmas vegetáriánusok”) főként növényi eredetű élelmiszereket választanak. Emellett fogyasztanak húst és egyéb állati eredetű termékeket is. A diéta nem követi a merev szabályokat, de figyel a húsfogyasztás mennyiségének és gyakoriságának csökkentésére. A flexitáriánusok nem korlátozzák étkezési tervükben a fogyasztásra szánt hússok típusát sem [10]. A vizsgált táplálkozási irányzatok közül a vegán étrend különbözik leginkább a flexitáriánus étrendtől. A vegánok csak növényi eredetű ételeket fogyasztanak. Az egészséges táplálkozás elvét követő flexitáriánus diéta lehetővé teszi az összes makro- és mikrotápanyag (pl. komplex fehérje vagy B₁₂ vitamin) biztosítását az emberi szervezet számára a minőségi húsfogyasztás által (2. ábra).



2. ábra: Flexitáriánus táplálkozási piramis (módosított séma) [11]

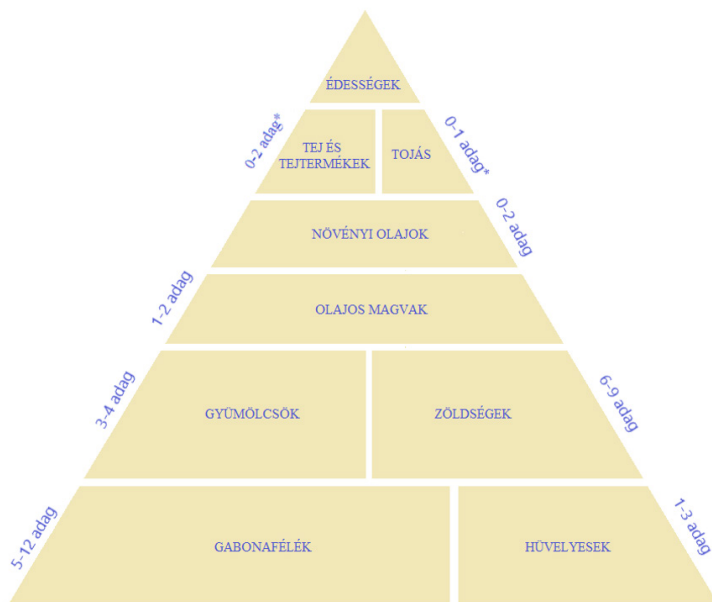
Számos tanulmányt végeztek a flexitáriánus étrend mélyebb megismerése céljából, amelyek közül néhányat az 1. táblázatban foglaltunk össze.

1. táblázat: A flexitáriánus étrend megismerésére szolgáló irodalmi hivatkozások

	A közlemények témái	Hivatkozási szám
Flexitáriánus étrend	Motivációk és jövőbeli tervek a flexitáriánus étrendben	[12]
	A flexitáriánus fogyasztók felmérése	[13]
	A flexitáriánus étrend egészségügyi és környezeti hatásai	[14]
	Flexitáriánus étrend az egészséges bolygóért	[15]
	A flexitáriánus és vegán étrend költségei, környezeti és egészségügyi hatásai	[16]
	Flexitáriánus, vegetáriánus és pescetáriánus étrend	[17]
	Flexitarianizmus Hollandiában	[18]

4.2. Vegetáriánus étrend

A vegetarianizmus növényben gazdag speciális étrend. Általában a vegetarianizmus alatt a hús és a húsalapú termékek kizárását értjük az egyén étrendjéből. A vegetarianizmusnak azonban különböző típusai vannak, mint például az ovo-vegetáriánus, a lakto-vegetáriánus és a lakto-ovo-vegetáriánus étrend, amikor az emberek állati eredetű termékeket, például tojást, tejet vagy tejtermékeket fogyasztanak (például: sajt). A legtöbb esetben a vegetáriánus étrend megválasztása pozitív hatással van az emberi szervezetre. Egyes esetekben azonban, a vegetarianizmus az életminőségre is negatív hatással lehet (például vas- vagy B₁₂-hiány alakulhat ki), a hús kerülése vagy az állati eredetű termékek fogyasztásának hiánya miatt. Fontos megemlíteni, hogy különböző tényezők is vezethetnek a vegetáriánus étrend adaptálásához, mint például etikai megfontolások, a vegetarianizmus jótékony hatásai az emberi egészségre vagy környezeti hatások [6] (3. ábra).



* Ha nem fogyaszt tej és tejterméket vagy tojást, a B12 vitamin biztosítása szükséges.
Egyéb életmódbeli ajánlások: napi mozgás, vízfogyasztás, napozás.

3. ábra: Vegetáriánus táplálkozási piramis (módosított séma) [19]

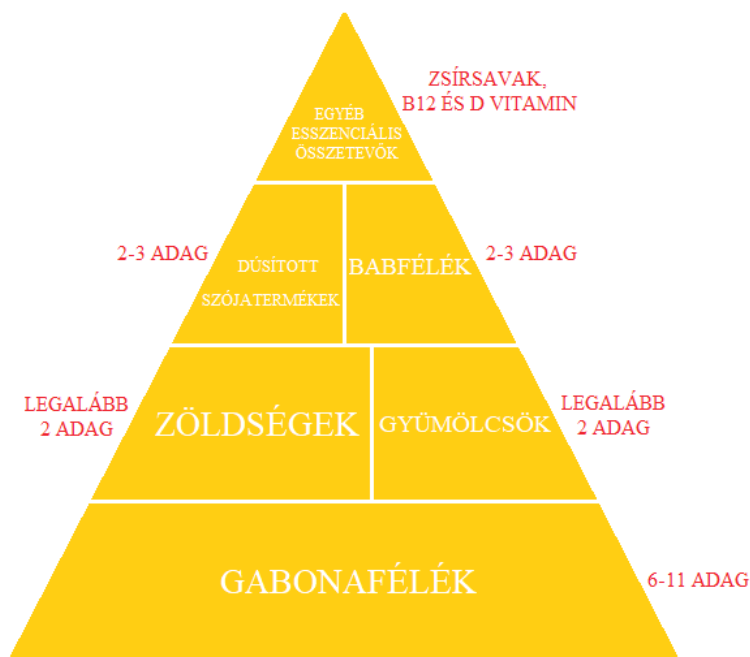
Számos tanulmány született a vegetáriánus étrenddel kapcsolatban, amelyek közül néhányat a 2. táblázatban foglaltunk össze. Egyes esetekben olyan publikációkat találtunk, melyek a vegán étrenddel való összehasonlítását is magukba foglalják.

2. táblázat: Fedezze fel a vegetáriánus étrendet különböző tanulmányokkal

	A közlemények témái	Hivatkozási szám
Vegetáriánus étrend	A vegetáriánus étrend és a cukorbetegség	[20]
	A vegetáriánus étrend és az egészség	[21]
	Vegetáriánus csecsemők, gyermekek és serdülők	[22]
	A növényi alapú étrend és a testtömeg összefüggései	[23]
	Növényi alapú étrend és az agy egészsége	[24]
	Vegetarianizmus és I. típusú cukorbetegség összefüggései a gyermekek táplálkozásában	[25]
	A vegetarianizmus és a vérnyomás összefüggései	[26]
	A vegetarianizmus és a szív- és érrendszeri betegségek összefüggései	[27]
	Vegetáriánus gyerekek és serdülők Németországban	[28]
	Indiai vegetáriánus étrend	[29]

4.3. Vegán étrend

A veganizmus fő jellemzője, hogy tiltja az állati eredetű termékek fogyasztását. A vegán étrend egyre jobban láthatóvá válik a közösségi médiában, köszönhetően az új információknak, tapasztalatoknak és a témával kapcsolatos nyílt vitáknak. Az étrend követése számos hasznos egészségügyi előnnyel rendelkezik, például hozzájárulhat a szív- és érrendszeri betegségek, 2-es típusú cukorbetegség és a rák kockázatának csökkentéséhez. A veganizmus a teljes életmódot körülölelő táplálkozási irányzat, amely sok esetben etikai meggyőződésből is adódik. A rosszul összeállított 100 %-ban növényi alapú étrend hajlamosíthatja az egyéneket makrotápanyagok pl.: fehérjék és mikrotápanyagok pl.: B₁₂-vitamin, D-vitamin, vas-, cink-, kalcium- és jód hiányára. Ezek a makro- és mikrotápanyagok nélkülözhetetlenek a szervezet normál működéséhez. A vegán étrend potenciális hatással van az emberi egészségre, a fogyasztott élelmiszerek hatóanyag tartalmával, mint antioxidánsok (polifenolok), mikrotápanyagok (C-, E-vitamin) és szénhidrátban gazdag élelmiszerek [30] (4. ábra).



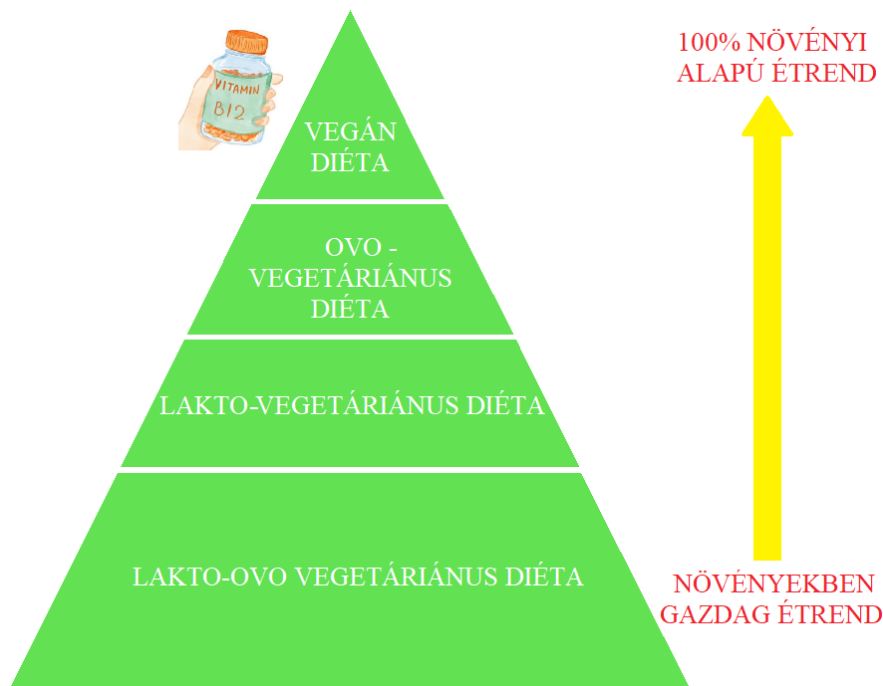
4. ábra: Vegán táplálkozási piramis (módosított séma) [31]

A kézirat további részében összegyűjtöttünk néhány releváns kéziratot a vegán étrendről (3. táblázat).

3. táblázat: A vegán étrend jellemzőit összefoglaló irodalmi hivatkozások

	A közlemények témái	Hivatkozási szám
Vegán étrend	A vegán táplálkozási irányzat elemzése	[32]
	Információk a vegán étrendről	[33]
	Nemek közötti különbségek a vegánok/vegetáriánusok között	[34]
	A vegetáriánus és vegán táplálkozási irányzat pszichopatológiája	[35]
	A vegán férfi	[36]
	A veganizmus és a gyermekkori ételallergia	[37]
	A veganizmus és a férfiak	[38]

Végezetül a növényben gazdag étrend és a 100 %-ban növényi alapú étrend összehasonlítása látható a vegán és vegetáriánus emberek táplálkozási piramisán keresztül (5. ábra).



5. ábra: Növényekben gazdag étrend és 100%-ban növényi alapú étrend (Módosított séma) [39]

5. Következtetés

Az összehasonlított étrendek közül a flexitáriánus biztosítja a szervezet számára a legbiztonságosabb tápanyagbevitelt a jó minőségű húsfogyasztás révén. A vegetáriánus étrend bizonyos típusai (pl.: ovo-lakto vegetáriánus étrend) szintén hozzájárulnak az emberi szervezet makro- és mikrotápanyag-szükségletének teljes kielégítéséhez. A vegán (100 %-ban növényi alapú táplálkozási irányzat) étrend követőinek számos jótékony hatása mellett fehérje-, B₁₂-vitamin és vashiány is előfordulhat. Vegán étrend esetén ezeknek az összetevőknek a pótlása szükséges. Emellett mindhárom étrend kulcsszerepet játszik a modern, fenntartható táplálkozásban, a fenntartható mezőgazdaságban és a környezetvédelemben.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Skerrett P. J., Willett W. C. (2010) Essentials of Healthy Eating: A Guide. *Journal of Midwifery & Women's Health*. 55(6): 492-501. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2010.06.019>
- [2] Wahl D. R., Villinger K., König L. M., Ziesemer K., Schupp H. T., Renner B. (2017) Healthy food choices are happy food choices: Evidence from a real life sample using smartphone based assessment. *Scientific Reports*. 7: 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17262-9>
- [3] Bergens O., Veen J., Montiel-Rojas D., Edholm P., Kadi F., Nilsson A. (2020): Impact of healthy diet and physical activity on metabolic health in men and women. *Medicine*. 99(16): 1-6. DOI: 10.1097/MD.00000000000019584.
- [4] E-literature: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-eating-plate/>
- [5] Derbyshire E. J. (2017) Flexitarian Diets and Health: A review of the Evidence-Based Literature. *Frontiers in Nutrition*. 3: 1-8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00055>
- [6] Hargreaves S. M., Raposo A., Saraiva A., Puppini Zandonadi R. (2021) Vegetarian Diet: An Overview through the Perspective of Quality of Life Domains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(8): 1-23. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084067>
- [7] Radnitz C., Ni J., Dennis D., Cerrito B. (2020) Health Benefits of a Vegan Diet: Current Insights. *Nutrition and Dietary Supplements*. 12: 57-85. <https://doi.org/10.2147/NDS.S191793>
- [8] Zhang X., Yao G., Vishwakarma S., Dalin C., Kornarek A. M., Kanter D. R., Davis K. F., Pfeifer K., Zhao J., Zou T., D'Odorico P., Folberth C., Rodriguez F. G., Fanzo J., Rosa L., Dennison W., Musumba M., Heyman A., Davidson E. A. (2021) Quantitative assessment of agricultural sustainability reveals diver-

gent priorities among nations. *One Earth*. 4: 1262-1277. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.08.015>

- [9] Springmann M., Clark M. A., Rayner M., Scarborough P., Webb P. (2021) The global and regional costs of healthy and sustainable dietary patterns: a modelling study. *Lancet Planetary Health*.: 1-11. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00251-5](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00251-5)
- [10] E-literature: https://www.foodunfolded.com/article/the-flexitarian-diet?gclid=Cj0KCQjw8p2MBhCiARlsADDUFVFiGXlQK0lar0CpJmgs-FQKYSJ_UiPnU1FT_IgVqPP7x10XCOFeo1saAoSpEALw_wcB
- [11] E-literature: <https://www.thebodyarchitectsinc.com/blog/what-is-the-flexitarian-diet>
- [12] Malek L., Umberger W. J. (2021) How flexible are flexitarians? Examining diversity in dietary patterns, motivations and future intentions. *Cleaner and Responsible Consumption*. 3: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.clrc.2021.100038>
- [13] Dagevos H. (2021) Finding flexitarians: Current studies on meat eaters and meat reducers. *Trends in Food Science & Technology*. 114: 530-539. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.021>
- [14] Himics M., Giannakis E., Kushta J., Hristov J., Sahoo A., Perez-Dominguez I. (2022) Co-benefits of a flexitarian diet for air quality and human health in Europe. *Ecological Economics*. 191: 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2021.107232>
- [15] Sijtsema S. J., Dagevos H., Nassar G., van Haaster de Winter M., Snoek H. M. (2021) Capabilities and Opportunities of Flexitarians to Become Food Innovators for a Healthy Planet: Two Explorative Studies. *Sustainability*. 13(20): 1-17. <https://doi.org/10.3390/su132011135>
- [16] Kidd B., Mackay S., Vandevijvere S., Swinburn B. (2021) Cost and Greenhouse gas emissions of current, healthy, flexitarian and vegan diets in Aotearoa (New Zealand). *BMJ Nutrition, Prevention & Health*. 4(1): 275-284. DOI: 10.1136/bmjnph-2021-000262
- [17] Wozniak H., Larpin C., Mestral de C., Guessous I., Reny J.-L., Stringhini S. (2020) Vegetarian, pescatarian and flexitarian diets: sociodemographic determinants and association with cardiovascular risk factors in a Swiss urban population. *British Journal of Nutrition*. 124: 844-852. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114520001762>
- [18] Verain M. C. D., Dagevos H., Jaspers P. (2022) Flexitarianism in the Netherlands in the 2010 decade: Shifts, consumer segments and motives. *Food Quality and Preference*. 96: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104445>
- [19] E-literature: <http://www.differencebetween.net/object/comparisons-of-food-items/difference-between-vegetarian-and-vegan/>
- [20] Powlak R. (2017) Vegetarian Diets in the Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. *Diabetes Spectrum*. 30(2): 82-88. <https://doi.org/10.2337/ds16-0057>
- [21] McEvoy C., Temple N., Woodside J. V. (2012) Vegetarian diets, low-meat diets and health: a review. *Public Health Nutrition*. 15(12): 2287-2294. <https://doi.org/10.1017/S1368980012000936>
- [22] Baroni L., Goggi S., Battino M. (2019) Planning Well-balanced Vegetarian Diets in Infants, Children, and Adolescents: The VegPlate Junior. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 119(7): 1067-1074. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.06.008>
- [23] Tran E., Dale H. F., Jensen C., Lied G. A. (2020) Effects of Plant-Based Diets on Weight Status: A Systematic Review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 13: 3433-3448. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S272802>
- [24] Medawar E., Huhn S., Villringer A., Witte A. V. (2019) The effects of plant-based diets on the body and the brain: a systematic review. *Translational Psychiatry*. 9: 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0552-0>
- [25] Tromba V., Silvestri F. (2021) Vegetarianism and type I diabetes in children. *Metabolism Open*. 11: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2021.100099>
- [26] Yokoyama Y., Nishimura K., Barnard N. D., Takegami M., Watanabe M., Sekikawa A., Okamura T., Miyamoto Y. (2014) Vegetarian Diets and Blood Pressure A Meta-analysis. *JAMA Internal Medicine*. 174(4): 577-587. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.14547
- [27] Oliveira B., Aranha L. N., dos Santos Gomes Olivares P., Guilherme Rocha Negro T., Rosa G., Moraes de Oliveira G. M. (2021) Vegetarian Diets and Cardiovascular Risk in Women. *Int J Cardiovasc Sci*. 34(4): 461-470. DOI: 10.36660/ijcs.20210010
- [28] Patelakis E., Barbosa C. L., Haftenberger M., Brettschneider A.-K., Lehmann F., Heide K., Frank M., Perlitz H., Richter A., Mensink G. B. M. (2019) Prevalence of vegetarian diet among children and adolescents in Germany. Result from EsKiMo II. *Ernahrungs Umschau*. 66(5): 85-91. DOI: 10.4455/eu.2019.018
- [29] Shridhar K., Dhillon P. K., Bowen L., Kinra S., Venkatsubbareddy Bharathi A., Prabhakaran D., Srinath Reddy K., Ebrahim S. (2014) Nutritional profile of Indian vegetarian diets – the Indian Migration Study (IMS). *Nutrition Journal*. 13: 1-9. DOI: 10.1186/1475-2891-13-55

- [30] Rogerson D. (2017) Vegan diets: practical advice for athletes and exercisers. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 14:1-15. DOI: 10.1186/s12970-017-0192-9
- [31] E-literature: <http://www.bestveganguide.com/vegan-food-pyramid.html>
- [32] Gallagher C. T., Hanley P., Lane K. E. (2021) Pattern analysis of vegan eating reveals healthy and unhealthy patterns within the vegan diet. *Public Health Nutrition*.: 1-11. DOI: 10.1017/S136898002100197X
- [33] Kerschke-Risch P. (2015) Vegan diet: motives, approach and duration. *Ernaehrungs Umschau*. 62(6): 98-103. DOI: 10.4455/eu.2015.016
- [34] Modlinska K., Adamczyk D., Maison D., Pisula W. (2020) Gender Differences in Attitudes to Vegans/Vegetarians and Their Food Preferences, and Their Implications for Promoting Sustainable Dietary Patterns – A Systematic Review. *Sustainability*. 12: 1-17. DOI: 10.3390/su12166292
- [35] Paslakis G., Richardson C., Nöhre M., Brähler E., Holzapfel C., Hilbert A., de Zwaan M. (2020) Prevalence and Psychopathology of vegetarians and vegans – Results from a representative survey in Germany. *Scientific Reports*. 10: 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63910-y>
- [36] Aavik K., Veigan M. (2021) Vegan Men's Food and Health Practices: A Recipe for a More Health-Conscious Masculinity? *American Journal of Men's Health*.: 1-14. <https://doi.org/10.1177/15579883211044323>
- [37] Protudjer J. L. P., Mikkelsen A. (2020) Veganism and paediatric food allergy: two increasingly prevalent dietary issues that are challenging when co-occurring. *BMC Pediatrics*. 20: 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02236-0>
- [38] Oliver C. (2021) Mock meat, masculinity, and redemption narratives: vegan men's negotiations and performances of gender and eating. *Social Movement Studies*.: 1-19.: <https://doi.org/10.1080/14742837.2021.1989293>
- [39] Bivi D., Di Chio T., Geri F., Morganti R., Goggi S., Baroni L., Mumolo M. G., de Bortoli N., Peroni D. G., Marchi S., Bellini M. (2021) Raising Children on a Vegan Diet: Parent's Opinion on Problems in Everyday Life. *Nutrients*. 13: 1-14. <https://doi.org/10.3390/nu13061796>

Comparative Analysis of Flexitarian, Vegetarian and Vegan Diets: A Review

Keywords: healthy diet, flexitarian, vegetarian, vegan, special nutrition, sustainable agriculture

1. Abstract

Background: Healthy eating is one of the main factors of maintaining health. Certain diets such as flexitarian, vegetarian and vegan can be associated with a healthy lifestyle. These diets have recently become more common.

Aim: This review aims to summarize the characteristics of a flexitarian, vegetarian, and vegan diet by comparing these specific nutritional trends through the processed literature.

Methods: Electronic searches were performed on the Google Scholar database, Medline, PubMed, and Science Direct. The manuscript summarizes publications on flexitarian, vegetarian, and vegan diets. Furthermore, it examines the relationships between different nutritional trends as well.

Result: The summarized vegan (100% plant-based diet), vegetarian (plant-rich diet), and flexitarian (plant-based with high-quality meat consumption diet) have become the focus of results through this literature.

Conclusion: Flexitarian, vegetarian and vegan diets contribute to a healthy lifestyle and sustainable agriculture by following nutritional recommendations. The common basis of diets is to appreciate natural values and maintain health.

¹ Széchenyi István University, Albert Casimir Faculty at Mosonmagyaróvár, Department of Water Management and Natural Ecosystems

² SISAF Nanotechnology Drug Delivery, Ulster University

* Corresponding author

Judit MOLNÁR
Dávid VASAS
Mukhtar AHMED

jmolnar1222@gmail.com

ahmed-m@email.ulster.ac.uk

<https://orcid.org/0000-0001-7439-1153>

<https://orcid.org/0000-0002-9251-8493>

<https://orcid.org/0000-0003-0976-3007>

2. Introduction

Healthy eating contributes greatly to a healthy lifestyle and disease prevention [1, 2, 3]. Several recommendations for healthy eating have now been described by nutritionists. Of these, the latest recommendation is the Healthy Eating Plate (**Figure 1**).

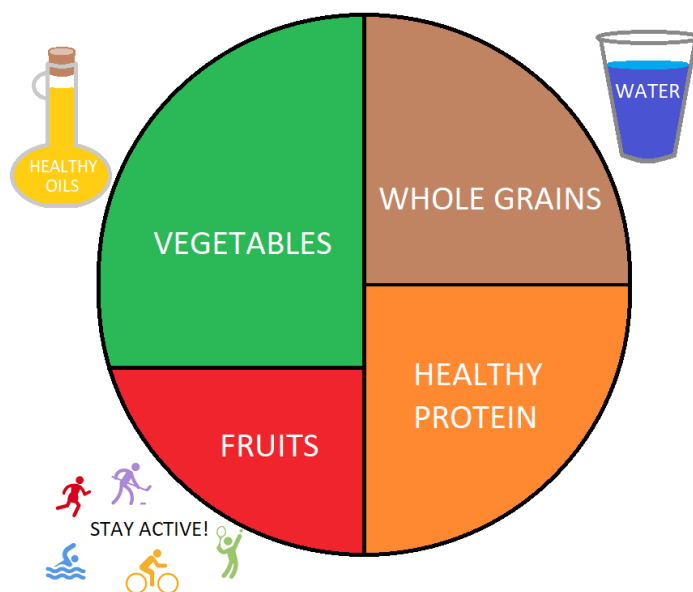


Figure 1. Healthy Eating Plate for a balanced meal (Modified scheme) [4]

Most of the Healthy Eating Plate (1/2 of the plate) is filled with vegetables and fruits in varied and colourful forms. Potatoes don't count as vegetables on the Healthy Eating Plate because of their negative effect on blood sugar in the human body [4].

Whole grains also have a big role in healthy eating (1/4 of the plate). The whole and intact grains like whole wheat, barley, wheat berries, quinoa, oats and brown rice have a significant effect on health balance (for example, blood sugar and insulin balance) [4].

The protein sources (1/4 of the plate: fish, poultry, beans, nuts) are all healthy. Most protein sources can be mixed with salads in healthy eating plans. It is also recommended to limit the consumption of red meat or processed meats (bacon, sausage). In addition, consumption of healthy vegetable oil such as olive, canola, soybean, corn, sunflower and peanut in moderation is recommended. Furthermore, drinking water is better than other alternatives such as sugary drinks or juices [4].

However, the main message of the Healthy Eating Plate (Smart Plate) is to focus highly on diet quality, for example, the types of carbohydrates or healthy oil people use [4].

In addition to the principles of healthy eating, several specific nutritional trends have been the focus, of which flexitarian [5], vegetarian [6] and vegan [7] are the most significant. These widely known and followed nutritional trends, in a well-structured form, maximize human energy and nutrient needs. Furthermore, the flexitarian, vegetarian and vegan dietary trends and their guidelines are closely related to the importance of organic farming, environmental friendliness and sustainable agriculture [8, 9].

The purpose of the manuscript is to present the characteristics of flexitarian, vegetarian, and vegan eating trends. Furthermore, the manuscript considers it important to have a comparative analysis of the presented nutritional trends and the characteristics of a healthy diet.

3. Material and method

Electronic searches were conducted on Google Scholar database, Medline, PubMed and Science Direct. A further search was conducted on internet. The search items included flexitarian, vegetarian, vegan, healthy

nutrition, sustainable agriculture, organic farming. This review was conducted to demonstrate the importance of flexitarian, vegetarian, and vegan diets for healthy living and healthy eating.

4. Results

4.1. The flexitarian diet

The term flexitarian was first used in 1992 and has recently become an increasingly popular nutritional trend. The flexitarians (“flexible vegetarian”) choose mainly plant-based food products. However, they also eat meat and other animal-based products. This diet doesn’t subscribe to a rigid set of rules but pay attention to reduce quantity and frequency of meat consumption. The flexitarians don’t limit the type of meat on their eating plan [10]. Furthermore, the vegan diet is very different from the flexitarian diet. The vegans eat only plant-based foods. The flexitarian diet, following the principle of a healthy diet, allows the necessary intake of all macro –and micronutrients (for example: complex protein or B₁₂) into the human body with the completeness of meat consumption and moderation (Figure 2).

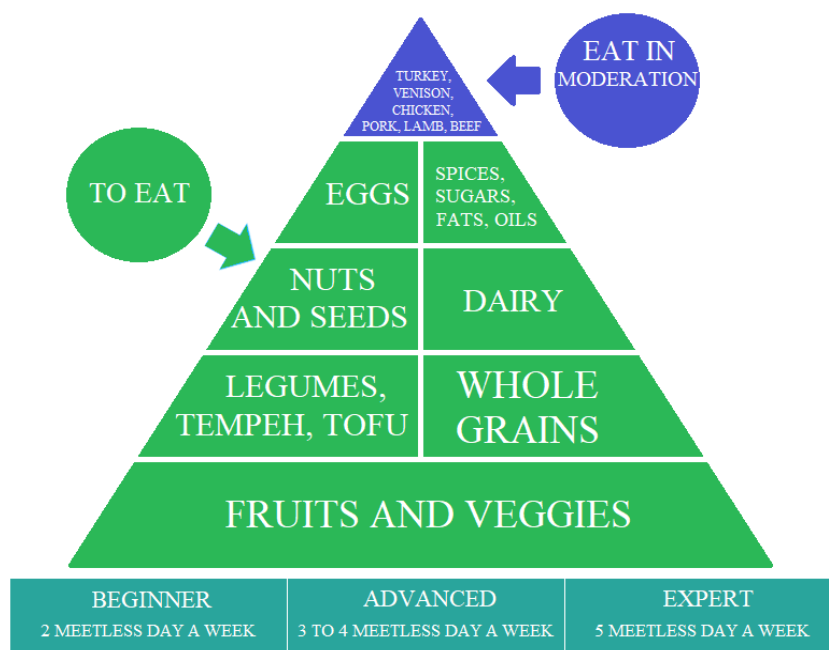


Figure 2: Flexitarian eating pyramid (Modified scheme) [11]

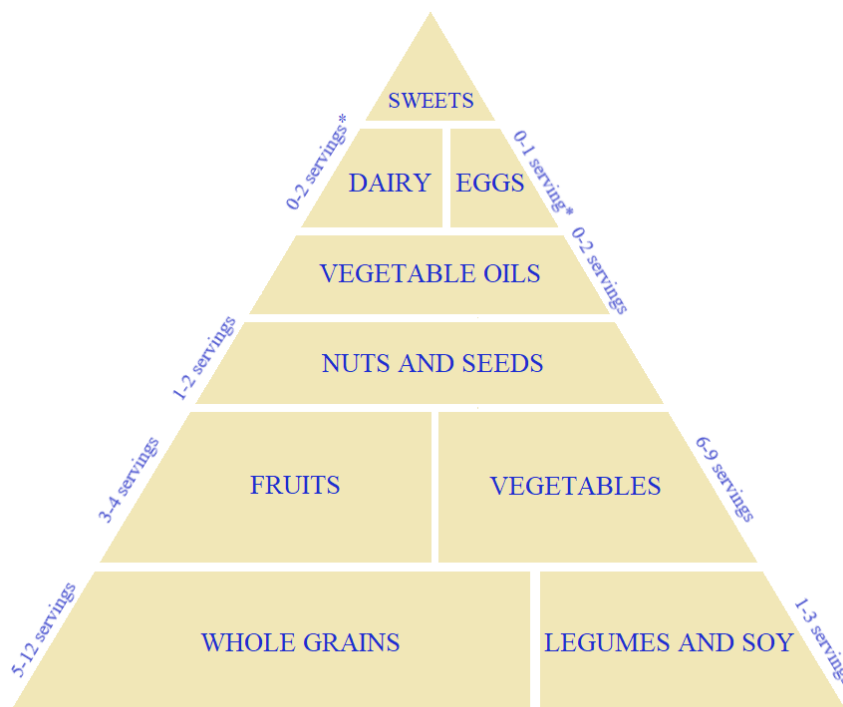
A number of studies have been conducted to explore the flexitarian diet, some of which are summarized in Table 1.

Table 1: Explore the flexitarian diet with different studies

	The topic of the publications	References
Flexitarian diet	Motivations and future intentions in flexitarian diet	[12]
	Finding flexitarians from consumers	[13]
	Health and environmental effect of flexitarian diet	[14]
	Flexitarian diet for health planet	[15]
	Cost, environmental and health effect of flexitarian and vegan diets	[16]
	Flexitarian, vegetarian and pescatarian diets	[17]
	Flexitarianism in Netherlands	[18]

4.2. The vegetarian diet

Vegetarianism is a plant-rich special diet. Generally, vegetarianism is understood as the exclusion of meat and meat-based products from an individual's diet. However, vegetarianism has different types such as ovo-vegetarian, lacto-vegetarian, and lacto-ovo-vegetarian diet, when people consume products of animal origin such as eggs, milk or dairy products (for example: cheese). In most cases, the choice of a vegetarian diet has positive effects on the human body such as better physical health. In contrast, vegetarianism also could have a negative effect on the quality of life (for example: iron or B₁₂ deficiency) because of the avoidance of meat or lack of animal product consumption. It is important to mention, different reasons can lead to the adaptation of a vegetarian diet such as ethical considerations, beneficial effects to human health of vegetarianism or environmental impact [6] (Figure 3).



* A reliable source of vitamin B12 should be included if no dairy or eggs are consumed.

Other lifestyle recommendations: daily exercise, water, sunlight

Figure 3: Vegetarian eating pyramid (Modified scheme) [19]

A number of studies have been conducted on the vegetarian diet, some of which are also summarized in **Table 2**. In some cases, these sources also include a comparison with the vegan diet.

Table 2: Explore the vegetarian diet with different studies

	The topic of the publications	References
Vegetarian diet	Vegetarian diet and diabetes	[20]
	Vegetarian diets and health	[21]
	Vegetarian diets in infants, children and adolescents	[22]
	Plant-based diet and weight	[23]
	Plant-based diet and brain health	[24]
	Vegetarianism and diabetes I type in children nutrition	[25]
	Correlation between vegetarianism and blood pressure	[26]
	Vegetarianism and cardiovascular disease	[27]
	Vegetarian children and adolescents in Germany	[28]
	Indian vegetarian diets	[29]

4.3. The vegan diet

Veganism prohibits the consumption of animal products. The vegan diet is becoming more visible in social media thanks to new information, experiences and open discussions regarding this topic. It has several useful health benefits such as reduced risk of cardiovascular diseases, type II diabetes and cancer. Furthermore, veganism is a product of strong ethical beliefs in individual lifestyles. Poorly 100 % plant-based diet can predispose individuals to macronutrient such as protein, and micronutrient including vitamin B₁₂, vitamin D, iron, zinc, calcium and iodine deficiencies. These macro -and micronutrients are necessary to implement in diets. However, vegan diets have a potential effect in human health with antioxidants (polyphenols), micronutrients (vitamins C, E) and carbohydrate-rich food [30] (Figure 4).

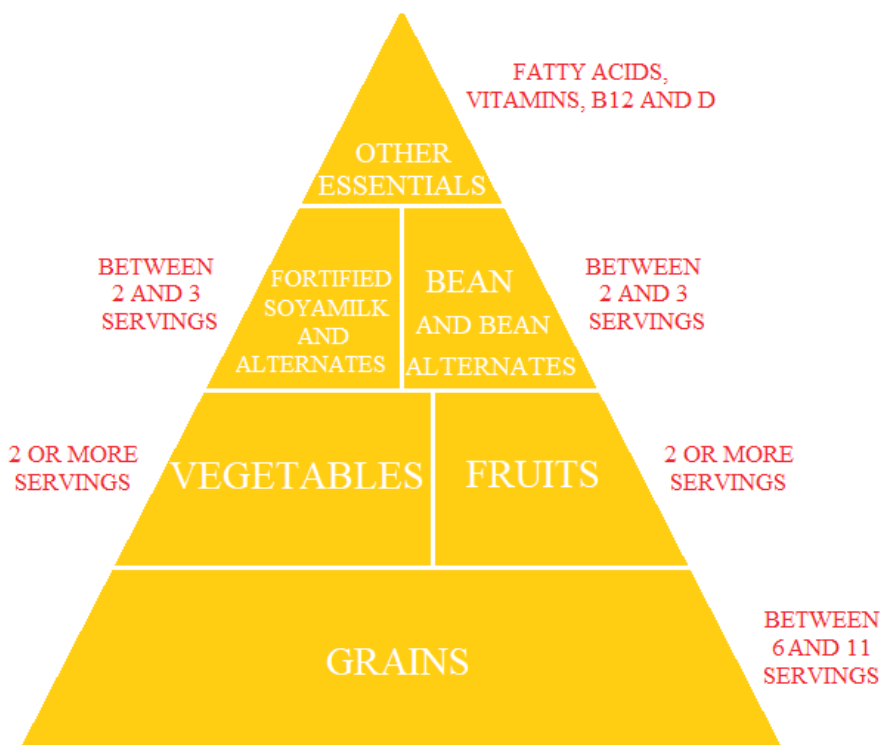


Figure 4: Vegan eating pyramid (Modified scheme) [31]

In the remainder of the manuscript, we collected some relevant manuscripts about the vegan diet **Table 3**.

Table 3: Explore the vegan diet with different studies

	The topic of the publications	References
Vegan diet	Analysis of vegan eating	[32]
	Information about vegan diet	[33]
	Gender differences between vegans/vegetarians	[34]
	Psychopathology of vegetarians and vegans	[35]
	Vegan men	[36]
	Veganism and paediatric food allergy	[37]
	Veganism and men's	[38]

The following is a comparison of plant-rich diet and 100% plant-based diet through the eating pyramid for vegan and vegetarian people (**Figure 5**).

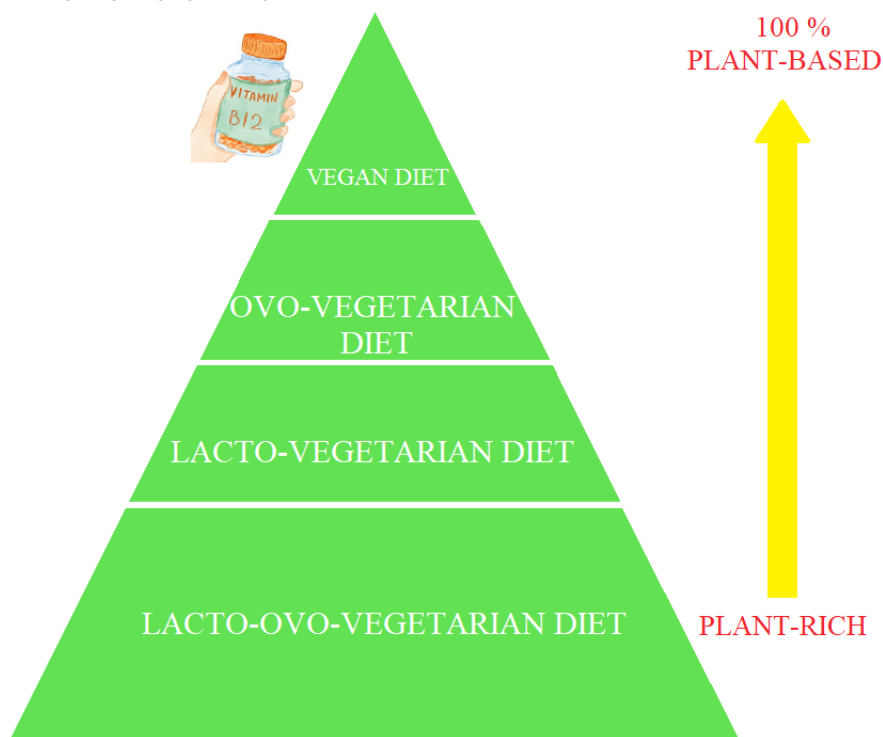


Figure 5: Plant-rich diet and 100% plant-based diet (Modified scheme) [39]

5. Conclusion

Among the diets compared, flexitarian provides the safest nutrient intake for the body through high-quality meat intake. Some types of vegetarian diet (e.g., ovo-lacto) also contribute to the full satisfaction of macro- and micronutrient requirements in the human body. Followers of a vegan (100% plant-based) diet may have protein, vitamin B₁₂ and iron deficiency in addition to many beneficial effects. In the case of a vegan diet, it is necessary to supplement these components. In addition, all three diets play a key role in modern, sustainable nutrition, sustainable agriculture and environmental protection.

6. References

- [1] Skerrett P. J., Willett W. C. (2010) Essentials of Healthy Eating: A Guide. *Journal of Midwifery & Women's Health*. 55(6): 492-501. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2010.06.019>
- [2] Wahl D. R., Villinger K., König L. M., Ziesemer K., Schupp H. T., Renner B. (2017) Healthy food choices are happy food choices: Evidence from a real life sample using smartphone based assessment. *Scientific Reports*. 7: 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17262-9>
- [3] Bergens O., Veen J., Montiel-Rojas D., Edholm P., Kadi F., Nilsson A. (2020): Impact of healthy diet and physical activity on metabolic health in men and women. *Medicine*. 99(16): 1-6. DOI: 10.1097/MD.00000000000019584.
- [4] E-literature: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-eating-plate/>
- [5] Derbyshire E. J. (2017) Flexitarian Diets and Health: A review of the Evidence-Based Literature. *Frontiers in Nutrition*. 3: 1-8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00055>
- [6] Hargreaves S. M., Raposo A., Saraiva A., Puppini Zandonadi R. (2021) Vegetarian Diet: An Overview through the Perspective of Quality of Life Domains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(8): 1-23. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084067>
- [7] Radnitz C., Ni J., Dennis D., Cerrito B. (2020) Health Benefits of a Vegan Diet: Current Insights. *Nutrition and Dietary Supplements*. 12: 57-85. <https://doi.org/10.2147/NDS.S191793>
- [8] Zhang X., Yao G., Vishwakarma S., Dalin C., Kornarek A. M., Kanter D. R., Davis K. F., Pfeifer K., Zhao J., Zou T., D'Odorico P., Folberth C., Rodriguez F. G., Fanzo J., Rosa L., Dennison W., Musumba M., Heyman A., Davidson E. A. (2021) Quantitative assessment of agricultural sustainability reveals divergent priorities among nations. *One Earth*. 4: 1262-1277. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.08.015>

- [9] Springmann M., Clark M. A., Rayner M., Scarborough P., Webb P. (2021) The global and regional costs of healthy and sustainable dietary patterns: a modelling study. *Lancet Planetary Health*.: 1-11. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00251-5](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00251-5)
- [10] E-literature: https://www.foodunfolded.com/article/the-flexitarian-diet?gclid=Cj0KCQjw8p2MBhCiARlsADDUFVFiGXIQK0lar0CpJmgs-FQKYSJ_UiPnU1FT_IgVqPP7x10XCOFeo1saAoSpEALw_wcB
- [11] E-literature: <https://www.thebodyarchitectsinc.com/blog/what-is-the-flexitarian-diet>
- [12] Malek L., Umberger W. J. (2021) How flexible are flexitarians? Examining diversity in dietary patterns, motivations and future intentions. *Cleaner and Responsible Consumption*. 3: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.clrc.2021.100038>
- [13] Dagevos H. (2021) Finding flexitarians: Current studies on meat eaters and meat reducers. *Trends in Food Science & Technology*. 114: 530-539. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.021>
- [14] Himics M., Giannakis E., Kushta J., Hristov J., Sahoo A., Perez-Dominguez I. (2022) Co-benefits of a flexitarian diet for air quality and human health in Europe. *Ecological Economics*. 191: 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2021.107232>
- [15] Sijtsma S. J., Dagevos H., Nassar G., van Haaster de Winter M., Snoek H. M. (2021) Capabilities and Opportunities of Flexitarians to Become Food Innovators for a Healthy Planet: Two Explorative Studies. *Sustainability*. 13(20): 1-17. <https://doi.org/10.3390/su132011135>
- [16] Kidd B., Mackay S., Vandevijvere S., Swinburn B. (2021) Cost and Greenhouse gas emissions of current, healthy, flexitarian and vegan diets in Aotearoa (New Zealand). *BMJ Nutrition, Prevention & Health*. 4(1): 275-284. DOI: 10.1136/bmjnp-2021-000262
- [17] Wozniak H., Larpin C., Mestral de C., Guessous I., Reny J.-L., Stringhini S. (2020) Vegetarian, pescatarian and flexitarian diets: sociodemographic determinants and association with cardiovascular risk factors in a Swiss urban population. *British Journal of Nutrition*. 124: 844-852. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114520001762>
- [18] Verain M. C. D., Dagevos H., Jaspers P. (2022) Flexitarianism in the Netherlands in the 2010 decade: Shifts, consumer segments and motives. *Food Quality and Preference*. 96: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104445>
- [19] E-literature: <http://www.differencebetween.net/object/comparisons-of-food-items/difference-between-vegetarian-and-vegan/>
- [20] Powlak R. (2017) Vegetarian Diets in the Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. *Diabetes Spectrum*. 30(2): 82-88. <https://doi.org/10.2337/ds16-0057>
- [21] McEvoy C., Temple N., Woodside J. V. (2012) Vegetarian diets, low-meat diets and health: a review. *Public Health Nutrition*. 15(12): 2287-2294. <https://doi.org/10.1017/S1368980012000936>
- [22] Baroni L., Goggi S., Battino M. (2019) Planning Well-balanced Vegetarian Diets in Infants, Children, and Adolescents: The VegPlate Junior. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 119(7): 1067-1074. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.06.008>
- [23] Tran E., Dale H. F., Jensen C., Lied G. A. (2020) Effects of Plant-Based Diets on Weight Status: A Systematic Review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 13: 3433-3448. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S272802>
- [24] Medawar E., Huhn S., Villringer A., Witte A. V. (2019) The effects of plant-based diets on the body and the brain: a systematic review. *Translational Psychiatry*. 9: 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0552-0>
- [25] Tromba V., Silvestri F. (2021) Vegetarianism and type I diabetes in children. *Metabolism Open*. 11: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2021.100099>
- [26] Yokoyama Y., Nishimura K., Barnard N. D., Takegami M., Watanabe M., Sekikawa A., Okamura T., Miyamoto Y. (2014) Vegetarian Diets and Blood Pressure A Meta-analysis. *JAMA Internal Medicine*. 174(4): 577-587. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.14547
- [27] Oliveira B., Aranha L. N., dos Santos Gomes Olivares P., Guilherme Rocha Negrao T., Rosa G., Moraes de Oliveira G. M. (2021) Vegetarian Diets and Cardiovascular Risk in Women. *Int J Cardiovasc Sci*. 34(4): 461-470. DOI: 10.36660/ijcs.20210010
- [28] Patelakis E., Barbosa C. L., Haftenberger M., Brettschneider A.-K., Lehmann F., Heide K., Frank M., Perlit H., Richter A., Mensink G. B. M. (2019) Prevalence of vegetarian diet among children and adolescents in Germany. Result from EsKiMo II. *Ernahrungs Umschau*. 66(5): 85-91. DOI: 10.4455/eu.2019.018
- [29] Shridhar K., Dhillon P. K., Bowen L., Kinra S., Venkatsubbareddy Bharathi A., Prabhakaran D., Srinath Reddy K., Ebrahim S. (2014) Nutritional profile of Indian vegetarian diets – the Indian Migration Study (IMS). *Nutrition Journal*. 13: 1-9. DOI: 10.1186/1475-2891-13-55

- [30] Rogerson D. (2017) Vegan diets: practical advice for athletes and exercisers. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 14:1-15. DOI: 10.1186/s12970-017-0192-9
- [31] E-literature: <http://www.bestveganguide.com/vegan-food-pyramid.html>
- [32] Gallagher C. T., Hanley P., Lane K. E. (2021) Pattern analysis of vegan eating reveals healthy and unhealthy patterns within the vegan diet. *Public Health Nutrition*.: 1-11. DOI: 10.1017/S136898002100197X
- [33] Kerschke-Risch P. (2015) Vegan diet: motives, approach and duration. *Ernaehrungs Umschau*. 62(6): 98-103. DOI: 10.4455/eu.2015.016
- [34] Modlinska K., Adamczyk D., Maison D., Pisula W. (2020) Gender Differences in Attitudes to Vegans/ Vegetarians and Their Food Preferences, and Their Implications for Promoting Sustainable Dietary Patterns – A Systematic Review. *Sustainability*. 12: 1-17. DOI: 10.3390/su12166292
- [35] Paslakis G., Richardson C., Nöhre M., Brähler E., Holzapfel C., Hilbert A., de Zwaan M. (2020) Prevalence and Psychopathology of vegetarians and vegans – Results from a representative survey in Germany. *Scientific Reports*. 10: 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63910-y>
- [36] Aavik K., Velgan M. (2021) Vegan Men's Food and Health Practices: A Recipe for a More Health-Conscious Masculinity? *American Journal of Men's Health*.: 1-14. <https://doi.org/10.1177/15579883211044323>
- [37] Protudjer J. L. P., Mikkelsen A. (2020) Veganism and paediatric food allergy: two increasingly prevalent dietary issues that are challenging when co-occurring. *BMC Pediatrics*. 20: 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02236-0>
- [38] Oliver C. (2021) Mock meat, masculinity, and redemption narratives: vegan men's negotiations and performances of gender and eating. *Social Movement Studies*.: 1-19.: <https://doi.org/10.1080/14742837.2021.1989293>
- [39] Bivi D., Di Chio T., Geri F., Morganti R., Goggi S., Baroni L., Mumolo M. G., de Bortoli N., Peroni D. G., Marchi S., Bellini M. (2021) Raising Children on a Vegan Diet: Parent's Opinion on Problems in Everyday Life. *Nutrients*. 13: 1-14. <https://doi.org/10.3390/nu13061796>

Az MTA Élelmiszeranalitikai Bizottságának beszámolója

Kormosné Bugyi Zsuzsanna, Muskovics Gabriella, Tömösközi Sándor (Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszerminőség Kutatócsoport): Élelmiszerekkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakciók helye és szerepe az élelmiszerbiztonsági rendszerekben

Az élelmiszerek bizonyos komponensei különböző típusú túlérzékenységi reakciókat válthatnak ki az arra érzékeny emberek szervezetében. Ezek közül a legjelentősebbek közé tartoznak a klasszikus élelmiszerallergiák, valamint a lisztérzékenység vagy cöliákia. Közös vonásuk, hogy kezelésük jelenleg csak élethosszig tartó eliminációs diétával oldható meg. Ennek támogatására az élelmiszerallergének jogszabályban meghatározott körének jelenlétét kötelező feltüntetni a termékek csomagolásán, míg a gluténmentes termékek jelöléséhez külön határérték is rendelkezésre áll. Mivel a törvényi szabályozás a véletlen keresztszenyveződésekre nem tér ki, valamint allergénekre határértéket nem fogalmaz meg, jelentősen elharapóztak a kockázatértékelést gyakran teljesen nélkülöző „nyomokban tartalmazhat” típusú ún. elővigyázatossági jelölések, melyek egyrészt feleslegesen korlátozhatják, másrészt kockázatvállaló magatartásra sarkallhatják az érintett fogyasztókat. A probléma megoldásához egyrészt megfelelő allergénmenedzsment útmutatók szükségesek az ipar számára, melynek legújabb ígéretes alternatívája a Codex Alimentarius 2020-ban megjelent útmutatója. Emellett pedig szükség van az elővigyázatossági jelölések megreformálására és kockázatértékelési alapokra helyezésére, melynek alapját várhatóan a különböző allergénekhez küszöbdózisokat meghatározó VITAL program fogja megteremteni.

Muskovics Gabriella, Kormosné Bugyi Zsuzsanna, Tömösközi Sándor (Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszerminőség Kutatócsoport): Az allergénanalitika lehetőségei és kihívásai: fókuszban a glutén

Agabonafélékfogyasztása az előnyök mellett az arra érzékenyek számára hátrányokkal is járhat a túlérzékenységi reakciók kialakulása miatt. Biztonságos gluténmentes élelmiszerek biztosításához szükséges, hogy a glutént a jogszabályi határértéknek (20 mg/kg) megfelelően képesek legyünk az élelmiszerekből megbízhatóan meghatározni. Erre a célra különböző módszercsaládok állnak rendelkezésünkre, melyek egy része a fehérjék meghatározásán alapul, mint az immunanalitikai, elválasztástechnikai, vagy tömegspektrometriát alkalmazó proteomikai módszerek.

A rutinanalitikában leginkább az ELISA-módszer terjedt el az immunmódszerekre jellemző specifikussága, jó érzékenysége és egyszerűsége miatt. A kereskedelmi forgalomban referencia módszer hiányában több, mint 20-féle különböző glutén ELISA-teszt kapható, melyek eltérő antitestekkel, kalibrálóanyagokkal és mintaelőkészítési módszerekkel működnek, ennek következtében a mért eredmények között jelentős variabilitás tapasztalható. A jelenség kiváltó oka nem kizárólag módszertani jellegű. A glutén fehérjék komplex keveréke, emellett a fehérjék genetikai és környezeti változékonysága miatt a kitek által mért fehérjék és a mérendő építőpocok mennyisége is eltérő lehet. A fehérjék továbbá különféle módokon változhatnak a feldolgozási folyamatok során, ami az analitikai módszerek hatékonyságára is hatással lehet. A referenciamódszer hiánya mellett nehézség a megfelelő, tanúsított referenciaanyag hiánya is.

Kutatócsoportunk egy nemzetközi kutatás keretei között először búzaalapú referenciaanyag fejlesztéssel kezdett foglalkozni, melynek során sikerült egy olyan lisztkeveréket előállítani, amely megfelelően modellezte a vizsgált nemzetközi búzaminta-sereget. A reprezentatív lisztkeverék alkalmazásával a genetikai és környezeti változékonyság által okozott mérési hiba jelentősen csökkenthető volt. A búza mellett azonban a rozs és az árpa fehérjei is kiváltják a rendellenes immunválaszt, így ezen gabonák mérése, illetve a referenciaanyag fejlesztésbe való bevonása is indokolt.

A rozs és árpa minták ELISA-eredményein jól megfigyelhető a genetikai változékonyság hatása, illetve a különböző kitek közötti eltérések ezzel összevethető mértékű variabilitása is. Az ELISA- és a HPLC-s mérések közötti korrelációk a rozs esetében viszonylag magasnak mondhatók, azonban az ELISA-méréseknél a gluténtartalom felülmérését tapasztaltuk. A búzaalapú kalibrálóanyag és az árpafehérjék közötti eltérések a vártnál nagyobb hatással voltak a kapott eredményekre. A specifikusan rozusra, illetve árpára előállított referenciaanyagok előállítását követően célunk egy olyan univerzális kalibrálóanyag előállítása, mely mind a búza, mind a rozs, mind az árpaeredetű glutén méréséhez alkalmas.

Hegy Adrienn, Baár Csaba (Campden BRI Magyarország Nonprofit Kft.): Az allergének kezelésének gyakorlata az élelmiszeriparban

Az Élelmiszeranalitika és -minőség Munkabizottságon elhangzott előadás célja az volt, hogy bemutassa az allergénkezelés helyes ipari gyakorlatát és rávilágítson az ipari tapasztalatok alapján fejlesztésre szoruló területekre.

A téma fontosságát mi sem bizonyítja, mint hogy az ételallergiában és -intoleranciában szenvedő emberek száma Magyarországon és világszerte is egyaránt növekszik. Ennek köszönhetően, nemcsak élelmiszeripari szakemberként, hanem fogyasztóként is egyre többet akarunk tudni az allergén- és intoleranciát okozó anyagokról. Amennyiben lehetőségünk van rá, úgy kerüljük alkalmazásukat és olyan élelmiszereket válasszunk, amelyekről megfelelő és pontos információval rendelkezünk ezen jellemzők tekintetében.

A jogszabályi háttér és az önkéntes élelmiszerbiztonsági szabványok révén az élelmiszergyártók alapvető és kötelező fontosságúnak tekintik az allergénkezelést, az allergén anyagok ismeretét és azonosítását, a véletlenszerű keresztszennyezés lehetőségeinek és forrásainak számbavételét, és kockázatalapú allergénkezelő rendszert alkalmazását. Továbbá nagyon fontos még a címkézéssel kapcsolatos előírások betartása és az allergén-összetevők megfelelő módon történő feltüntetése.

Egy felelősségteljes allergénkockázat-kezelő rendszer alkalmazása kötelező az élelmiszeriparban. E rendszerek helyes gyakorlata a teljes élelmiszerláncot lefedi. Egy ilyen rendszer a következő elemeket tartalmazza: az összetevőkre vonatkozó dokumentumok beszerzése, a szükség szerinti beszállítóilánc-auditok elvégzése, a GMP és GHP alkalmazása, a folyamatok, alapanyagok és termékek rendszeres ellenőrzése allergének szempontjából (vizsgálatok a vállalat belső ellenőrzései révén és külső laborokban elvégzett ellenőrző mérések által), a folyamatokban résztvevő emberek képzése és oktatása (allergénekről és az allergéntartalmú anyagok, termékek kezeléséről és ellenőrzéséről), stb.

Az élelmiszeripari üzemekkel való közös fejlesztések, projektmunkák és átvizsgálások során összegyűjtött tapasztalatok alapján elmondható, hogy annak ellenére, hogy sok esetben alkalmaznak allergénkockázatkezelést, ez a keresztszennyeződések lehetőségeinek és forrásaink felkutatására és számbavételére nem mindig terjed ki. Továbbá a veszélyeket minimalizáló és kizáró szabályozások tekintetében, s a szabályozások megfelelőségét biztosító validálásoknál (például a takarítási folyamatok validálása) vannak még teendők. Ám nem könnyíti meg az ellenőrzést a rendelkezésre álló gyors módszerek és az analitikai módszerek limitáltsága sem.

A szakmai fórumok munkája, a közös gondolkodás, az élelmiszeripar munkáját segítő újabb útmutatók adaptálása az élelmiszeriparban lehetőséget teremtenek az allergénkezelés elemeinek fejlesztésére, tökéletesítésére.

További információért keresse:

Campden BRI Magyarország Nonprofit Kft., 1096 Budapest Haller u.2

Tel: +36 14 331470

Email: campden@campdenkht.com

Weboldal: <https://campdenbri.hu/>

LinkedIn: <https://www.linkedin.com/company/27062305>

Summary of the Food Analytical Committee Workshop of the Hungarian Academy of Sciences

Zsuzsanna Kormosné Bugyi, Gabriella Muskovics, Sándor Tömösközi (Budapest University of Technology and Economics, Department of Applied Biotechnology and Food Science, Research Group of Cereal Science and Food Quality): The role of food hypersensitivity reactions in food safety systems

Certain food components are able to trigger different hypersensitivity reactions in susceptible individuals. Of these, the most prominent ones are classic food allergies and celiac disease. What they have in common is a need for a lifelong elimination diet as the only possible way of treatment. To support this need, it is mandatory to indicate the presence of a legally bound list of allergens on the package of food products, while for labelling gluten-free foods there is even a threshold dose available. Regulations do not include instructions for inadvertent allergen cross-contaminations and they do not provide thresholds for allergens, which resulted in the proliferation of the „may contain traces of” type of so-called precautionary labelling without actual risk assessment. This either unnecessarily limits food choices for allergic consumers or encourages them to take on risk-taking behaviors. The solution of this problem requires, on the one hand, suitable allergen management guidelines for the industry, of which the latest promising candidate is the guideline published by the Codex Alimentarius in 2020. Additionally, precautionary labelling must also be reformed and supported by risk assessment tools, which are expected to be created by the VITAL project that aims to determine threshold levels for different allergens.

Gabriella Muskovics, Zsuzsanna Kormosné Bugyi, Sándor Tömösközi (Budapest University of Technology and Economics, Department of Applied Biotechnology and Food Science, Research Group of Cereal Science and Food Quality): Potentials and challenges in allergen analytics: focusing on gluten

Among the various benefits, cereal consumption may cause hypersensitivity reactions in some patients. For providing safe gluten free food, quantitation of gluten is essential at the 20 mg/kg concentration limit declared by EU legislation. Different methods are available for the determination of gluten in food, part of those are protein-based methods such as immunoanalytical methods, separational techniques or proteomic methods using mass spectrometry.

In routine analyses the most commonly used methods are ELISA tests due to their high specificity, sensitivity and simplicity. In the lack of a reference method more than 20 different gluten ELISA kits are commercially available applying different antibodies, calibration and sample preparation methods, therefore, the measured gluten values have great variability. However, among the methodological differences this variability is also caused by the complexity of the gluten proteins or the genetic and environmental variability that results in different protein and epitope composition. Moreover, proteins in food may change during the processing methods that may have a significant effect on the analytical results as well. Among the lack of a reference method another critical point of gluten determination is that there is no certified reference material available.

As part of an international project our research group focused on wheat-based reference material development first. A representative flour mixture was prepared that was appropriate for decreasing the genetic and environmental variability among the examined cultivars. However, rye and barley proteins also trigger the hypersensitivity immune reactions, thus they should also be measured and included in the reference material development.

The gluten concentration of the rye and barley cultivars determined by the ELISAs show a great genetic variability and results between the two applied methods have the same extent as the differences between the cultivars. In case of the rye samples the correlations between the ELISA and the chromatographic results were high, however an overestimation of the gluten content was observed. In case of barleys the differences between the wheat calibrator and the barley proteins may have a greater effect than it was presumed. After preparation of a specific rye and barley reference material, development of a universally applicable wheat-rye-barley mixture may also be considered.

Adrienn Hegyi, Csaba Baár (Campden BRI Magyarország Nonprofit Kft.): Allergen management in the food industry

The presentation given in the framework of Food Analysis and Quality Work Commission summarized good industry practices in allergen management. It highlighted the areas that need improvement based on industry practice.

The growing number of people with food allergies and intolerances in Hungary and worldwide demonstrates the importance of this topic. As a result, not only as food professionals but also as consumers, we want to know more and more about substances causing allergies and intolerances. We avoid their use and/or choose foods with adequate and accurate information on these characteristics where possible.

Through the legislative background and voluntary food safety standards, food manufacturers consider allergen management, knowledge and identification of allergenic substances, the identification of possibilities and sources of cross-contamination, and the use of risk-based allergen management systems as essential and mandatory. Compliance with labelling requirements and the appropriate declaration of allergens are also crucial.

Implementing a responsible allergen risk management system is mandatory in the food sector. With the following elements, it should cover the whole value chain: obtaining ingredient documentation, carrying out supply chain audits if required, applying GMP and GHP, regular inspection of processes, raw materials and products for allergens (internal inspections by the company and measurements carried out in external laboratories), training of staff involved in the processes (on the handling and control of allergenic materials and products), etc.

The experience from collaborative work, projects, and audits of food businesses suggest that, although food companies often use allergen risk management, not each case includes proper identification and evaluation of the cross-contamination risks and sources. It has to be mentioned that there is still room for improvement in control and monitoring activities to minimize and exclude hazards and validations to ensure the adequacy of such activities (e.g. validation of cleaning processes). The limitation of the available rapid methods and analytical techniques can also pose obstacles and create more challenges for the food sector.

The work on the professional forums, collective thinking and discussion, and the adaptation of new guidelines will create opportunities to develop and improve the elements of the allergen management system to help the sector.

For more information, please contact:

Campden BRI Magyarország Nonprofit Kft., 1096 Budapest Haller u.2

Phone: +36 14 331470

Email: campden@campdenkht.com

Website: <https://campdenbri.hu/>

LinkedIn: <https://www.linkedin.com/company/27062305>

Szerzőink / Authors

AHMED Mukhtar Dr.

SISAF Nanotechnology Drug Delivery, Ulster University, BT370QB Belfast, UK.

EREMINA Yulia

LLC Antey Chelyabinsk, Russian Federation

HATVAN Zoltán

Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Élelmiszertudományi Tanszék / Széchenyi István University, Albert Casimir Faculty at Mosonmagyaróvár, Department of Food Science

KERÉNYI Zoltán Dr.

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

KORMOSNÉ BUGYI Zsuzsanna Dr.

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszermínőség Kutatócsoport

LUGASI Andrea Prof. Dr.

Budapesti Gazdasági Egyetem Kereskedelmi, Vendéglátóipari és Idegenforgalmi Kar, Vendéglátás Tanszék / Budapest Business School, Faculty of Commerce, Hospitality and Tourism, Department of Hospitality

LUKIN Aleksandr Prof. Dr.

South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation Chelyabinsk, Russian Federation

MOLNÁR Judit Dr.

Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Vízgazdálkodási és Természeti Ökoszisztémák Tanszék Mosonmagyaróvár / Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and Environmental Sciences, Mosonmagyaróvár, Hungary

NAUMOVA Natalya Prof. Dr.

South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation

PIROZHINSKY Sergey

LLC Antey Chelyabinsk, Russian Federation

RODIONOVA Irina

South Ural State Agrarian University, Troitsk, Russian Federation

SÜLE Judit Dr.

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

TÖMÖSKÖZI Sándor Dr.

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszermínőség Kutatócsoport

VARGA László Prof. Dr.

Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék / Széchenyi István University, Albert Casimir Faculty at Mosonmagyaróvár, Department of Food Science és / and Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola / Széchenyi István University, Wittmann Antal Multidisciplinary Doctoral School in Plant, Animal, and Food Sciences

VASAS Dávid

Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Vízgazdálkodási és Természeti Ökoszisztémák Tanszék Mosonmagyaróvár / Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Water and Environmental Sciences, Mosonmagyaróvár, Hungary

VELISEVICH Evgeni

South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation