



SZENT ISTVÁN EGYETEM

ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR

A nagy csalán (*Urtica dioica* L.) extraktumainak és bioaktív komponenseinek vizsgálata

Kőszegi Lászlóné

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készült:

Szent István Egyetem

Élelmiszertudományi Kar

Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

Budapest, 2020

A doktori iskola

Megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Tudományága: Élelmiszertudományok

Vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Livia**

Egyetemi tanár, rektorhelyettes, DSc
Szent István Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék

Témavezető **Békássyné Dr. Molnár Erika**

Professor emerita, DSc
Szent István Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

.....
Iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
1.1 Megoldandó feladatok, célkitűzések.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A nagy csalán (<i>Urtica dioica</i> L.) jellemzői.....	6
2.2. A nagy csalán felhasználása.....	6
2.2.1. A nagy csalán gyógyászati hatásának vizsgálata.....	7
2.2.2. Állatgyógyászati, mezőgazdasági és ipari alkalmazások.....	9
2.3 A nagy csalán hatása élelmiszerbiztonsági, élelmiszerminőségi és gyógyászati szempontból jelentős mikroorganizmusokra.....	12
2.3.1. Élesztőgombák.....	12
2.3.2. Baktériumok.....	13
2.4. Az antimikrobás tulajdonság vizsgálatának mikrobiológiai és analitikai módszerei.....	15
2.4.1. Tenyésztésen alapuló mikrobiológiai módszerek.....	15
2.4.2. Tenyésztésen alapuló fizikai módszerek.....	16
2.5. Endogén komponensek és antimikrobás hatás.....	17
2.6. A nagy csalán (<i>Urtica dioica</i> L.) kémiai összetétele.....	21
2.7. Szabad gyökök, azok hatásai és az ellenük való védelem lehetőségei.....	25
3. Anyagok és módszerek.....	28
3.1. Kísérletek és a mérések helyszínei.....	28
3.2. Anyagok.....	28
3.2.1. Növényi alapanyagok.....	28
3.2.2. Vegyszerek, sztenderdek.....	30
3.2.3. Szén-dioxid a szuperkritikus extrakcióhoz.....	30
3.3. Mintaelőkészítések és növényi kivonatok készítése.....	30
3.3.1. Szárítás.....	30
3.3.2. Aprítás.....	31
3.3.3. Extrakciók.....	32
3.3.4. Soxhlet extrakció.....	33
3.3.5. Szuperkritikus fluid extrakció.....	34
3.3.6. Szárazanyag-tartalom meghatározása.....	37
3.3.7. Szemcseméret meghatározása.....	37
3.4. Extrakciós-, analitikai-, és mikrobiológiai mérési módszerek.....	38

3.4.1. Az extrakciók kihozatalainak meghatározása.....	38
3.4.2. Analitikai mérések módszerei	39
3.4.3. A flavonoidok meghatározása HPLC-vel	40
3.4.4. Mikrobiológiai vizsgálati módszerek.....	41
4. Eredmények.....	45
4.1. Az előkészítő műveletek és extrakciók eredményei	45
4.1.1. Szárazanyag-tartalom meghatározása.....	45
4.1.2. Szemcseméret meghatározása	46
4.1.3. Extrakciós kihozatalok eredményei	49
4.2. Mikrobiológiai kísérletek eredményei.....	58
4.3. Analitikai vizsgálatok	64
4.3.1. A Soxhlet és a szuperkritikus extrakció analitikai eredményei	64
4.3.2. Teljes polifenoltartalom és antioxidáns kapacitás meghatározása	66
4.3.3. HPLC-s mérések.....	69
4.4. A fenológiai fázis hatásának vizsgálata a növény teljes polifenoltartalmára és antioxidáns kapacitására.....	71
4.5. Összegzés.....	79
4.6. Új tudományos eredmények-Tézisek.....	80
5. Következtetések, javaslatok	83
6. Összefoglalás	85
7. Summary	87
Mellékletek.....	89
M1. Irodalomjegyzék.....	89
M2. Szitaanalízis eredményei	97
M3. Mikrobiológiai vizsgálatok agarlyuk-, és korongdiffúziós módszerrel	99
M4. Statisztikai elemzés ANOVA teszttel a friss levél vizes extraktumainak teljes polifenoltartalom mérésének példáján bemutatva	100
Publikációs Lista.....	102

1. Bevezetés

Dolgozatom szellemiségéhez talán a legjobban kapcsolódik Jean Jaques Rousseau (1712 - 1778) ismert jelszava: "Vissza a természethez!". Ez a megfogalmazás ma reneszánszát éli. Ugyanezen gondolatokat lehet felfedezni a gyerekkori irodalom talán legismertebb művében, Daniel Defoe „Robinson Crusoe” című regényében, „A kék lagúna”, a „Számkivetett” és más túlélő filmekben és regényekben, amelyek mind azt sugallják, hogy az emberi tudás gyökere a természetben van, az értékeket a természetből kell kiaknáznunk.

Az elmúlt évtizedekben a tudomány hirtelen és nagyléptékű fejlődése miatt sokszor feledésbe merültek ezek a gondolatok, ami oda vezetett, ahol ma tartunk: klímaváltozás, levegő- és vízszennyezés, a környezetünkben felhalmozódó szeméthegek stb.

A mezőgazdaság és az ipar, ezen belül az élelmiszer-, kozmetikai- valamint a gyógyszeripar, nagy mennyiségben használ fel olyan kemikáliákat, amelyek nem természetes eredetűek, ezáltal hosszú távon káros hatásuk lehet az emberi egészségre, nem beszélve a melléktermékként képződő anyagok természetet szennyező hatásairól.

Ebben a pillanatban ott tartunk, hogy az emberi civilizáció, felismerve ezeket a veszélyes hatásokat, kezd visszafordulni a természethez.

Ezt érzékeljük nap, mint nap, a fogyasztási szokások megváltozása is ebben az irányba halad. Egy-egy vásárlás során igyekszünk azokat a termékeket előnyben részesíteni, amelyek nem tartalmaznak szintetikus adalékanyagokat és az egészségre káros összetevőket. Egyre nagyobb igény jelentkezik arra, hogy az egyes termékek feldolgozása a lehető legkíméletesebb legyen, illetve az újrahasznosítás minél jobban elterjedjen.

Ezzel összefüggésben egyre jobban és szélesebb körben értékelődik fel a gyógynövények szerepe mindennapjainkban a betegségek megelőzésében, illetve a gyógyítás kiegészítő kezeléseként.

A nagy csalán (*Urtica Dioica* L.) egyike a legelterjedtebb gyógynövényeknek a világon, Magyarországon szinte mindenhol megtalálható. Leveléből és gyökeréből készült kivonatokat gyakran használják a népi gyógyászatban, főleg forrázva teaként és salátaként fogyasztják, de újabban az ipar is felfigyelt erre az értékes növényre.

1.1 Megoldandó feladatok, célkitűzések

A fejlett országokban az élelmiszerek szerepe az elmúlt évtizedekben nagyon megváltozott. A fogyasztók ízletes tápanyagként történő felhasználásuk mellett egészségvédő és betegség-megelőző szerepükre is egyre jobban kezdenek odafigyelni. Az olyan élelmiszereket, melyeket gyakran egészségvédő hatóanyagokkal is dúsítanak, funkcionális élelmiszereknek nevezzük.

Munkám célja a nagy csalán (*Urtica dioica* L.) levelének és gyökerének értékes, biológiailag aktív komponenseinek felkutatása, és egy olyan extraktum készítése, amely kedvező antimikrobás és redukáló hatásának köszönhetően tinktúra (esetleg por) alakban alkalmas lehet élelmiszerbiztonsági szempontból is funkcionális élelmiszerként, élelmiszer-összetevőként, illetve a különböző technológiai/feldolgozási eljárásokon keresztül esett termékek természetes adalékanyagaként való felhasználására, és az élelmiszerfeldolgozás során a mikrobiológiai védelemben is fontos szerepet játszhat.

Céлом volt megvizsgálni, hogy négy ismert oldószer közül melyik a legalkalmasabb a nagy csalán antioxidáns- és antimikrobás hatást okozó összetevőinek kioldásához. Mennyi ideig és milyen hőmérsékleten kell ehhez végezni az extrakciót? Az év mely időszakában kell gyűjteni a növény levelét, illetve érdemes-e csalángyökér extraktumot készíteni?

Kísérleteim során ezzel összefüggésben számos kérdésre szándékoztam választ kapni:

- A szuperkritikus-, Soxhlet-, és egyszerű extrakciós módszerek, a beállítható műveleti paraméterek (nyomás, hőmérséklet, extrahálási idő) és a különféle módszerekhez tartozó oldószer (szuperkritikus állapotú CO₂, etanol, hexán és víz) segítségével hogyan tudok elérni maximális extraktum-mennyiséget?
- Ha egy adott oldószerrel sikerül nagyobb extraktum-mennyiséget kinyernem, akkor ez az oldószer ugyanilyen mértékben kedvez-e a polifenolok kinyerésének is, illetve segítségével ki tudok-e mutatni nagyobb antioxidáns/ redukáló kapacitást levél illetve gyökér esetében?
- Vizsgálni szándékoztam, hogy a növény vegetációs időszakának melyik fenológiai fázisa a legalkalmasabb a levelek és gyökerek gyűjtésére ahhoz, hogy a teljes polifenoltartalom (TPC) és antioxidáns/redukáló kapacitás (FRAP, DPPH) a legnagyobb legyen.
- Mikrobiológiai kísérletek végzésével vizsgáltam, hogy milyen módszerrel, oldószerrel, milyen műveleti paraméterek beállítása mellett és milyen koncentrációjú extraktumok esetében tudok kimutatni antimikrobás hatást élelmiszerbiztonsági és gyógyászati

szempontból fontos mikroorganizmusok ellen. Pozitív eredmény esetén összefüggést szándékoztam keresni az extraktumok antimikrobás hatása, és a hatásért nagy valószínűséggel felelős komponensek között.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A nagy csalán (*Urtica dioica* L.) jellemzői

Rendszertani besorolása: az *Urtica dioica* L. (nagy csalán) faj a rózsavirágúak (*Rosales*) rendjébe, a csalánfélék (*Urticaceae*) családjába, és az *Urtica* nemzetségébe tartozik. Egynyári, évente virágzó, igénytelen, szinte mindenhol megtermő növény. Európában, Ázsiában, Amerikában szerény körülmények között is megterm, Magyarországon is általánosan elterjedt. Egyike azoknak a gyógynövényfajoknak, amelyek különösebb korlátozás nélkül az ország egész területén eredményesen gyűjthetők. Az évi gyűjtött mennyiség körülbelül 300-400 tonna.

A növény részei: a gyökér 2-5 mm vastag, világosbarna színű, belül fehér, hengeres, elágazó. A szár 3-4-mm vastag, négy élű, rajta csalánszőrök találhatók. A levelek keresztben átellenesen állnak, nyelesek, lemezük tojásdad, vagy lándzsás, válluk lekerekített, szélük durván fűrészkes, csúcsuk hosszan hegyes. A virágok jelentéktelen kicsik, zöld színűek (TÓTH 2010). A csalán levelének és virágának fényképe az 1. ábrán látható.



1. ábra: nagy csalán (<https://pixabay.com/photos/search/nettle/>)

2.2. A nagy csalán felhasználása

Részben a tudományos kísérletek egyre szélesebb körben való elterjedése, részben pedig a fogyasztási szokások megváltozása ahhoz vezetett, hogy egyre nagyobb igény jelentkezik a természetes alapanyagok fogyasztása és felhasználása iránt. Ez vonatkozik számos zöldségre (citromfű – mézfű, fodros kel, tengeri zöldségek- a jövő ételei a vizek mélyéről), gyümölcsre (avokádó, grapefruit) és gyógynövényre (teafa, diófalevél, citromfű, zsálya), így a csalánra is.

A nagy csalán széles körű jótékony biológiai hatást fejt ki az emberi egészségre, pozitív hatásait már az ókorban felismerték és többféle módon alkalmazták gyógyításra. Ennek bizonyítására szolgáljon itt Litynska-Zajac 2012-ben Lengyelországban publikált tudományos munkája, melyben archeológiai kutatások maradvány-anyagának vizsgálatával foglalkozva megállapította,

hogy az *Urtica dioica*-t sok évszázada fogyasztják ételként és gyógyászati célokra (LITYNSKA-ZAJAC 2012).

Ha a nagy csalánnak csak a mindenki által ismert felhasználását nézzük, akkor is vitathatatlan, hogy egy olyan csodálatos gyógynövényről van szó, ami nem csak a múltban és a jelenben, hanem a jövőben is -sőt egyre szélesebb körben- tart számot a fogyasztók érdeklődésére. Jótékony és élelmiszerbiztonsági szempontból is kiváló életteni hatása a növény egyes részeiben előforduló értékes belső eredetű összetevőkkel hozható összefüggésbe, amire a későbbiekben bemutatott irodalmi hivatkozások megadják a tudományos magyarázatokat.

Előljáróban csak egy kis bevezetés, annak bemutatására, hogy milyen értékes növény is a csalán. A csalán föld feletti részéből jelentős mennyiségű zöld színű klorofill nyerhető ki, amit előszeretettel használnak fel a cukorkák színesítésére. A nyers friss csalánnal a végtagokat ütögetve elérhető a vér cirkulációjának gyorsítása és ezzel a hideg végtagok felmelegítése. Régóta fogyasztják különböző betegségek kezelésére nyersen, szárítva és főzve. Így például reuma, ízületi gyulladás, vérszegénység, ekcéma, vesegyulladás és csalánkiütés esetén, de használják sérülések, égési sebek gyógyítására is. A keleti népi gyógyászatban ma is hatékonyan alkalmazzák vérszegénység, menstruációs vérzés, orrvérzés, véres vizelet, asztma, reuma, köhögés, cukorbetegség, hasmenés, láz, köszvény, aranyér, szülés utáni méhvérvzés, alacsony tejtermelés, vizelési panaszok kezelésére és ne feledkezzünk meg a bioteremesztésben ajánlott felhasználhatóságáról sem a szintetikus növényvédő szerek helyett.

2.2.1. A nagy csalán gyógyászati hatásának vizsgálata

A nagy csalán jótékony és gyógyító hatását több kutató, illetve kutatócsoport vizsgálta. UPTON összefoglaló cikkében 220 referenciára hivatkozva ismerteti az *Urtica dioica* levéllel kapcsolatos orvosi vizsgálatok eredményeit. A csalánt különösen hatékony növényi gyógyszernek találták a kutatók. Gyógyhatásai között a gyulladásgátló, fájdalomcsillapító, helyi érzéstelenítő hatást említik. A hisztamin-érzékenységet csökkenti, trombocita aggregációt meggátolja. Antioxidáns hatása révén a központi idegrendszert nyugtató és vérnyomáscsökkentő hatása van. A szív- és érrendszeri simaizmot aktivizálja, vízajtó aktivitást fejt ki, valamint a cukorbetegséget is gyógyítja. A gyomor- és bélműködést serkenti. Májvédő hatása van, csökkenti a vér zsírsav tartalmát, jó hatással van a vérképző szervekre. Baktérium-, élesztőgomba-, és vírusölő hatását is kimutatták (UPTON 2013).

Miután a daganatos és az érrendszeri megbetegedések központi helyen szerepelnek a vezető halálokok között, ezért ezekre a vonatkozásokra térek ki először.

A csalán vizes extraktumát adagolták DARSANAKI és munkatársai 2012-ben rákos patkányoknak és igen hatékonynak találták antimutagén gyógyszerként való használatra, és ajánlást is tettek a humán felhasználásra is (DARSANAKI et al. 2012).

MANSOORI és munkatársai az *Urtica dioica* extraktumát sikeresen alkalmazták egyrészt női mellrákos sejtek *in vitro*, másrészt mellrákos patkányok *in vivo* kezelésére. Az eredmények nagyon biztatóak voltak, mely gyógymód és annak továbbfejlesztése jelentősen új utakat nyithat meg a rák gyógyításában (MANSOORI et al. 2017).

Hasonló eredményekre jutottak OZKOL és munkatársai is a patkányokon végzett kísérleteikben, a rák egyik gyógyszerének (Cisplatin) mellékhatásait is sikeresen enyhítették az *Urtica dioica* metanolos extraktumának adagolásával, vesebeteg egereknél (OZKOL et al. 2012).

Számos gyógynövénnyel foglalkozó cikk részletes áttekintése után a gyógynövények kedvező élettani hatásáról számol be AZIMI kutatócsoportja, akik az *Urtica dioica* levélének és gyökérének hatékonyságát publikálták a férfi jóindulatú prosztatata daganat kezelésére is (AZIMI et al. 2012).

A különböző rákos betegek kiegészítő kezelése a betegek immunrendszerének erősítése. Erre vonatkozóan is kedvező hatást tudtak kimutatnia a csalánnal kapcsolatban (SIYUKHOV et al. 2018). Kutatásuk eredményei azt mutatták, hogy a nagy csalán a levelében található fenolos komponenseknek köszönhetően fejti ki immunerősítő és a vérszegénységet megelőző hatását.

RAJPUT és kutató társai egy összefoglalást közölnek az *Urtica* nemzetség, köztük az *Urtica dioica* farmakológiai hatásainak vizsgálatáról, ahol kimutatták a nagy csalán anti-diabetikus, gyulladásgátló, rákellenes, ízületi gyulladást csökkentő, antioxidáns, májvédő, a vér lipid tartalmát csökkentő, vízajtó, gombaölő, vírusölő, növényvédő, féregölő hatását (RAJPUT et al. 2018).

A szív és érrendszeri, valamint a cukorbetegségben szenvedőkkel foglalkozó összefoglaló cikkben NAMAZI és munkatársai 3 humán, 18 állati és 7 *in vitro* és *in vivo* közlemény adatait dolgozzák fel, igen kritikusan. Annak ellenére, hogy az *Urtica dioica* levelének és szárának adagolására kapott eredményeik kedvezőek voltak az érlelmeszesedés kezdeti kialakulása ellen

patkánymodellekben, mégsem tekintik elegendően bizonyítottnak a gyógyhatás kijelentésére (NAMAZI et al. 2012).

NAMAZI és munkatársai 40 felnőtt patkányon végezett *in vivo* kísérletei kapcsán kedvező hatást tudtak kimutatni az *Urtica dioica* vizes-etanolos extraktjának adagolásával az aorta ereinek érlelmeszesedés gyógyítására (NAMAZI et al. 2018).

A jordániai népi gyógyászat eredményeiről számolnak be AFIFI és munkatársai munkájukban. Az *Urtica dioica* extraktumát patkányokon kísérletezve megállapították, hogy az anti-diabetikus hatás mellett sok más betegségre is hatékonyak bizonyul, mely hatást a természetes antioxidánsoknak tulajdonították (AFIFI et al. 2013).

Ezen kísérletekhez hasonlóan más kutatók is a csalán kedvező szénhidrát anyagcserét befolyásoló hatásáról számolnak be, patkányokon végzett eredményeik alapján (RAFID et al. 2012; DAR et al. 2013).

A fentiekén kívül eredményeket lehetett elérni a nem alkohol fogyasztásából eredő zsírmáj gyógyítására (MALEKIRAD et al. 2012), a nikotin által okozott spermium-károsodásra (JALILI et al. 2014), krónikus bőrbetegségek gyógyítására (OLISOVA et al. 2018), az Alzheimer kór sikeres enyhítésére, (ANAND et al. 2017) a súlycsökkentésre (ASHTIANI et al. 2018), az allergia enyhítésére (CUICINA & MACEDO 2018) és a magas vérnyomás kezelésére (VAJIC et al. 2018).

Azon kutatók nagy része, akik a növények gyógyhatásán kívül analitikai módszerekkel is foglalkoztak, a kedvező élettani hatást a növényekben –így a csalánban is- jelenlévő antioxidáns/redukáló hatást kifejtő endogén komponenseknek, különösen a polifenolos vegyületek jelenlétének tulajdonítja (PATIL & MASAND 2019); (LUNA-GUEVARA et al. 2019).

2.2.2. Állatgyógyászati, mezőgazdasági és ipari alkalmazások

A csalán sokrétű felhasználhatósága a humán vonal mellett az állatok gyógyításában is előtérbe kerül, mivel a természetes gyógymódok egyike lehet. Természetesen itt sincs egyetértés a gazdák között, hiszen sok tenyésztő -a tudományos eredmények ellenére- még ma is csak gaznak tekinti a csalánt, de azért szép számmal vannak kivételek is.

Általában a svájci farmerek tradicionálisan alkalmazzák a gyógynövényeket az állatok gyógyítására. Az *Urtica dioica*-t sikeresen alkalmazzák marha, kecske, disznó és pulyka

kezelésére meddőség, gyomorbántalmak, anyagcserezavarok, fájdalomcsillapítás, reuma ellen és általános erősítés céljából. A csalánt vagy közvetlenül etetik az állatokkal, vagy infúzió formájában adják be (DISLER et al. 2014).

MONA és munkatársai arról számolnak be, hogy a különböző gyógynövények keverékét, köztük az *Urtica dioica*-t is sikeresen alkalmazzák lovak táplálék-kiegészítőjének. A csalán fogyasztása segített a fiatal kancáknak az emésztésben, fertőző betegségek elkerülésében, környezeti és egyéb stresszek leküzdésében (MONA et al. 2018).

MIKAEILI és munkatársai csalán kivonattal végezték el malacokon egy bőrbetegséget okozó gomba, a *Microsporum canis* kezelését (MIKAEILI et al. 2013). Az *in vitro* kísérletekhez a szárított porított drogot 95 °C-os vízben áztatták, leszűrték, majd a szűrletet bepárolták. Petri-csészében követték a gomba pusztulását. A sikeres eredmények után *in vivo* kísérleteket is végeztek. Ehhez a csalánt 70 %-os metanollal extrahálták, majd szűrték, szárították és a malacok bőrfertőzését kezelték vele. Eredményeik alapján *in vitro* gyenge hatás érhető el, viszont *in vivo* a csalán megszüntette a bőrfertőzést.

Meglepő módon a halgazdaságokban is ismert a csalán felhasználása. DE VICO és kutató csapata kiemelkedő fontosságúnak tartják az *Urtica dioica*-t, mint állati tápanyagot, és a szerzők halgazdasági tapasztalatok alapján nyomatékosan ajánlják is a csalán etetését a halakkal, mert értékes tápanyag, immunerősítő hatású és segíti a halak növekedését is (DE VICO et al. 2018).

Szintén a halgazdaságok számára feldolgozott 215 közlemény adatai alapján AWAD & AWAAD a fertőzőes halbetegségek gyógyításával kapcsolatban az antibiotikumok helyett ajánlják a halak gyógynövényekkel történő etetését, ahol a gyógynövények közül jelentős szerepet tulajdonítanak a csalánnak (AWAD & AWAAD 2017).

Az egészséges táplálkozásra törekvés egyre növeli a bio-farmok számát és méretét. Az emberi egészségre jó hatással vannak az olyan termények, amelyeket szerves trágyázással és a kártevők ellen bio-alapú növényvédőszerrel kezelnek. A klímaváltozás is egyre jobban megköveteli az agrárium ilyen irányú fejlesztését.

A mezőgazdasági növények körében, különös tekintettel a kisebb biogazdaságokban igény jelentkezik a természetes szerrel történő növényvédelemre. A mezőgazdasági növényeket károsító gombák laboratóriumi tesztelését végezték el HADIZADEH és munkatársai Pakisztánban, melynek eredményeként az agarlyuk diffúziós módszerrel kedvező eredményeket

tapasztaltak néhány gombafaj ellen (HADIZADEH et al. 2009). Szabadföldi körülmények között GARMENDIA és munkatársai kísérleteztek a burgonya kezelésével *Urtica dioica* -ból készült sűrű szuszpenzióval. Nagy termőterületeket bevonva vizsgálták a kezelt területeken a termés mennyiségét, a klorofil-tartalmát, az állati kártevők szaporodását és a növényi betegségeket. Kezdeti sikereik nagyon biztatónak mutatkoztak, és igen fontosnak tartják a további vizsgálatok folytatását (GARMENDIA et al. 2018). Ugyancsak sikeres kísérletről számoltak be GULZAR és munkatársai, amikor az eperfa penészesedését (*Fusarium pallidoroseum*) kezelték sikeresen *Urtica dioica* etanolos extraktumával valamint más gyógynövényekkel (GULZAR et al. 2013).

Az *Urtica dioica* felhasználására vonatkozó kísérletek (élelmiszer, állati takarmány, gyógyszer) között is újszerűnek mondható az a munka, amit PINELLI és munkatársai végeztek (PINELLI et al. 2008). A csalán növény szárának részletes kémiai analízise alapján a szár természetes elemi szárait alkalmasnak találták textil alapanyagként. GHARIBZAHEDI (2017) Jojoba gumiból és csalán olajból nanoemulziót készített Beluga sturgeon halfilé csomagolására, ilyen módon előállítva egy új bioaktív ehető csomagolóanyagot. A csalán-olajat az *Urtica dioica* szárított leveléből és szárából vízgőzdesztillációval készítették, a jojobát extrahálták, a két anyagból készült emulzióval vonták be a halfilét, majd 4 °C-on 15 napig tárolták. Eredményül azt kapták, hogy a halfilé fizikai, kémiai és mikrobiológiai jellemzői lényegesen jobbak voltak, mint a csomagolás nélküli kontrol jellemzői (GHARIBZAHEDI 2017). Ugyanez a szerző a következő cikkében (GHARIBZADEHI & MOHAMMADNABI 2017) a csalán-olaj ultrahangos emulzifikálásának alkalmazásával jelentősen növelte a nanoemulzió tartóssági idejét és a tárolási hőmérsékletet, ezzel a csomagolóanyag fizikai-kémiai stabilitását. Így biztonságossá vált mind az élelmiszeripari, mind a gyógyszeripari alkalmazásra. ERBAY és kutatótársai (2017) szintén új bioaktív csomagolást fejlesztettek ki friss halak tárolására. A csalán nanoszálakat is tartalmazó borítás több napig frissen tartotta a csomagolt halfilét (ERBAY et al. 2017).

Az említett irodalmi források egyértelműen mutatják, hogy a nagy csalán nem csak az ember-, és állatgyógyászatban tölt be vitathatatlan szerepet, hanem a növények természetes alapanyagú trágyázása és permetezése révén nagy hasznára válik, illetve válhat a biogazdaságoknak is. Ezeken kívül növényi olajának a jövő csomagolás-technikájában is fontos szerepe lehet az élelmiszerek tartóssági idejének növelésével, illetve egy élelmiszerbiztonsági szempontból kiváló bioaktív csomagolóanyag előállításában.

2.3 A nagy csalán hatása élelmiszerbiztonsági, élelmiszerminőségi és gyógyászati szempontból jelentős mikroorganizmusokra

A szakirodalomban sok szerző foglalkozik a nagy csalán (*Urtica dioica* L.) antimikrobás hatásával, melyet számos élesztővel és baktériummal szemben vizsgáltak.

2.3.1. Élesztőgombák

Az élesztőgombák az ismert gombafajok mindössze 1%-át teszik ki, jelentőségük mégis hatalmas. Az élesztőknek köszönhető a kenyér kelesztése, a sör és a bor erjesztése, sok más anyagcseretermék ipari méretű termelése. A nagy gazdasági haszon mellett azonban az élesztők jelentős kárt okoznak az élelmiszerek romlásával, de kórokozó is van közöttük (DEÁK et al. 2006).

A *Candida* nemzetség a legnagyobb fajsámú élesztőnemzetség, amelynek mintegy 170 tagja van (DEÁK 1998). Széles körben megtalálhatók az élelmiszerekben, ahol a termék kialakításáért, ízanyagaiért felelősek. A *Candidák* között vannak humán kórokozók is, melyeknek a gombás fertőzések 10%-át tulajdonítják (DEÁK 1998). Ezek valamennyien opportunisták, azaz elsősorban gyenge vagy károsodott immunrendszerű emberek (rákos, transzplantációs vagy HIV-betegek) szervezetében fordulnak elő. Kiemelkedik közülük a *Candida albicans* faj (FRANK 2007).

A *Candida glabrata* élesztőgomba a normál humán mikrobióta része. Minden környezeti körülmény között előfordul. Jelenleg a második vagy harmadik helyet foglalja el a felületi (orális, nyelőcső, hüvelyi vagy húgyúti) vagy szisztémás kandidás fertőzések kórokozói sorában (FIDEL et al. 1999).

A *Candida parapsilosis* számos földrajzi régióban az egyik leggyakrabban izolálható *Candida* faj. A szövetekre és a véredényekre is áttérjedt gombafertőzés egyik okozója. Legtöbbször a gyerekek és az alacsony születési súlyú csecsemők szervezetében fordul elő. Veszélyeztetett továbbá valamennyi immunhiányos állapotú beteg is, különösen azok, akiket intenzív osztályokon kezelnek. A *Candida parapsilosis* a leggyakrabban a bőrfelületről izolálható (TÓTH 2016).

A *Saccharomyces cerevisiae* az élesztőgombák csoportjába tartozik. Kenyérkészítésnél, borkészítésnél és sörfőzésnél is hasznosítják, mivel fermentációs kapacitása nagy, jól tűri a kis pH-t, illetve a nagy etanol koncentrációt és még oxigén jelenlétében is alkohollá fermentálja a cukrokat, azokból széndioxidot fejlesztve.

Erjedési folyamatokban vesz részt, ezáltal élelmiszereknél is ilyenfajta romlást okoz, de nem patogén (PESTI 2001). Megtalálható kefirben, és izolálható száraz szalámikból és számos gyümölcs felületéről. (OYARZABAL & BACKERT 2012) Az egyik leggyakoribb romlást okozó élesztőgomba gyümölcslevek esetében (Maráz és Kovács, 2014).

2.3.2. Baktériumok

Az enterococcusok indikátor mikrobák, ugyanakkor ételmérgezést előidéző baktériumok. A szervezeteken kívül hosszabb időn át is életképesek maradhatnak, ezért nem feltétlenül jelzik a friss fekális szennyezettséget. Hőkezelt élelmiszerekben is előfordulhatnak, jelezve a hőkezelés elégtelenségét vagy az utófertőzést. Az *Enterococcus faecalis* Gram-pozitív, fakultatív anaerob (oxigén jelenlétében és nélküle is képes növekedni) baktérium. Megtalálható a talajban, a vízben, a legtöbb állat és az ember bélrendszerében is a normál flóra tagjaként. Jelentős antibiotikum rezisztenciája miatt a fertőzés legyőzése igen nehéz. Ez a patogén tehető felelőssé a bakteriális agyhártyagyulladásért, különféle húgyúti fertőzésekért, a szívbillentyű- és a szívbélhártya gyulladásért, a szájüreget érintő- és gyakran a kórházi fertőzésekért is. Nem tartozik a virulens patogének közé, akkor válik kórokozóvá, ha a beteg előzetes antibiotikum-kezelésben részesült, súlyos, többnyire rosszindulatú alapbetegségben szenved (BIRÓ 1993).

Az *Escherichia coli* Gram-negatív mikroba. Megtalálható a melegvérű állatok testében, így az emberben is. Az *E. coli* csak nagyon rövid ideig képes életben maradni a szervezeten kívül. Bizonyos törzsei a normál bélflóra tagjai, K2-vitamin képzésével hozzájárulnak a szervezet vitaminellátásához és jelenlétükkel visszaszorítják a rothasztó baktériumok elszaporodását (NÁSZ 1982). Bizonyos törzsei humán patogének, így például hasmenéses megbetegedésekért, húgyúti fertőzésekért vagy az újszülöttkori agyhártyagyulladásért felelősek. Fontos élelmiszeripari szerepe van, mivel jelenléte utalhat friss fekáliás fertőzésre, rossz higiénias körülményekre, vagy utószennyeződésre (MARÓDI 2016).

A *Listeria monocytogenes* Gram-pozitív, fakultatív anaerob szervezet, a liszteriózis nevezetű, élelmiszer eredetű megbetegedés kórokozója (SCHLECH et al. 1983), súlyosabb esetben agyvelőgyulladást, valamint terhes nőknél vetélést okozhat, de a megbetegedettek mintegy 75% -át a 65 évnél idősebbek, a terhes nők, és a legyengült immunrendszerű emberek teszik ki (PERERA et al. 2015). A fertőzés kialakulása nagyban függ a baktériumok számától és az általános egészségi állapottól. Széles körben előfordul a növényekben, talaj- és felszíni vizekben, szennyvízben, vágóhídi hulladékokban, valamint az emberi és állati ürülékben (FARBER & PETERKIN 1991). Alkalmazkodik a szélsőséges környezeti feltételekhez (hőmérséklet, pH).

Komoly problémát jelenthet az élelmiszeripar számára, illetve veszélyt a fogyasztókra nézve. Környezetünkben szinte mindenhol megtalálható. Fokozott figyelmet kell fordítani a zöldségek és nyers húsok mosására, evés előtti tisztítására, valamint a pasztörözetlen tejtermékek fogyasztásának mellőzésére (FARBER & PETERKIN 1991). Növekedését a kvercetin nevű flavonoid bizonyos koncentrációban már gátolni tudja.

A *Listeria innocua* Gram-pozitív, fakultatív anaerob baktérium, emberre nem patogén szervezet. Az élelmiszeripar számára kutatási szempontból fontos, mivel tulajdonságaiban, így az alacsony pH-val, szárítással és melegítéssel szembeni rezisztenciájában, valamint a sótűrésében hasonlít a megbetegedést okozó *L. monocytogenes* törzseihez, így általa a mikroorganizmusok viselkedése olyan laboratóriumokban, ahol kórokozók nem tudnak dolgozni, biztonságosabban tanulmányozható (MARÓDI, 2016).

A *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatív, aerob baktérium. A talajban, vízben, gyulladós folyamatokban és a legtöbb ember által épített környezetben is megtalálható. Növényekre, emberekre és állatokra egyaránt veszélyes lehet. Immungyenge emberek számára komoly problémákat okozhat. Erős antibiotikum rezisztenciával rendelkezik (BIRÓ 1993).

A *Staphylococcus aureus* Gram-pozitív, fakultatív anaerob baktérium. Tünetmentesen is jelen lehet az ember bőrfelületén, nem okoz feltétlenül megbetegedést, de ha a koaguláz pozitív *S. aureus* törzsek többsége valamely élelmiszerben nagy számban van jelen, akkor az élelmiszer elfogyasztása néhány órán belül heveny tüneteket, hányást, hasmenést okoz. A betegség azonban 1-2 nap alatt megszűnik (LACZAY 2008; DEÁK et al. 2006; MARÓDI 2016). A *S. aureus* okozta ételmérgezés gyakori forrása a nyers tej, és a nyers húskészítmények, de főként a humán eredetű törzsek és az azokat közvetítő emberi kéz (LACZAY 2008). A *Staphylococcus* nemzetség fajai szinte mindenhol megtalálhatóak, környezetünkben több faja az emberi és állati szervezetekben is jelen van. Környezeti tényezőkre való érzékenysége igen alacsony. A MRSA, azaz a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*, sebektől izolálható, és nem reagál az antibiotikumok kezelésére.

2.4. Az antimikrobás tulajdonság vizsgálatának mikrobiológiai és analitikai módszerei

Antimikrobiális anyagoknak nevezzük mindazon természetes, felszintetikus vagy szintetikus vegyületeket, melyek kis koncentrációban és általában szelektíven – a mikroorganizmusok kisebb-nagyobb csoportjára hatva – gátolják azok élettevékenységét (PESTI 2001).

2.4.1. Tenyésztésen alapuló mikrobiológiai módszerek

Tápleves hígítási módszer: a hígítási lépcsőben a vizsgált hatóanyag koncentrációja lépcsőnként felére csökken. A vizsgált kórokozó sejtszuszpenziójával beoltva a tápoldatban határozzák meg a minimális gátló koncentráció (MIC = minimal inhibitory concentration) értékét sorozathígítási módszerrel. A módszer lényege, hogy különböző koncentrációjú táptalajra azonos mennyiségű baktérium szuszpenziót mérnek. A MIC értéke annál a koncentrációnál jelentkezik, amelynél 24 óras 37 °C-on történő inkubálás után sem tapasztalunk változást, vagyis nem nő a turbiditása a szuszpenzióknak, nem növekednek a mikroorganizmusok. Meghatározása fotometriásan történik. Ezt a módszert előszűrőként is használják. Az ismeretlen hatóanyag-érzékenységű kórokozóval egyidőben korábban leellenőrzött érzékeny és ellenálló izolátumokkal, ún. tesztorganizmusokkal is elvégzik a kísérletet, hogy legyen viszonyítási alapjuk (MODARRESI-CHAHARDEHI et al. 2012).

Agarlyuk diffúziós módszer: a gyógyszerkönyv által is elismert, gátlóhatás vizsgálatára kifejlesztett hagyományos módszer (FINN 1959). Lényege, hogy tápagart készítünk egy Petri csészében, aminek felületére mikrobaszuszpenzió felhasználásával pászitot készítünk. Az agarba lyukakat fúrunk, majd ezeket feltöltjük azzal az előzetesen előkészített oldattal, melynek kíváncsiak vagyunk az antibakteriális hatására. 4-5°C-ra helyezve a diffúzió elősegíthető, ezt követően a lemezeket a hagyományos módon inkubáljuk a baktérium törzs hőmérsékleti optimumán 24-48 órán keresztül. A gátló hatást a lyukak körül jelentkező feltisztulási zóna jelzi, azok mérete pedig a gátló hatás kvantitatív jellemzésére ad lehetőséget. A vizsgálati minta gátlóhatása többféleképpen adható meg, de általában a feltisztulási zóna átmérőjét veszik alapul a kiértékelés során (DEÁK et al. 2006).

Korongdiffúziós módszer: hasonlóan az agarlyuk diffúziós módszerhez diffúziós technikán alapuló, szabvány szerint elvégzett kísérlet. A táptalaj felszínére masszív oltással felviszik a vizsgálandó kórokozót, majd erre helyezik az ismert hatóanyag-tartalmú tesztkorongokat. Meghatározott idejű inkubálás után megméri a gátlási zónákat. (A szabványmódszerhez

mellékelt táblázat adataival összevetve megállapítható, hogy a vizsgált kórokozó melyik hatóanyaggal szemben érzékeny, illetve rezisztens.).

E-teszt: a tesztkorong módszerrel lényegében azonos eljárással készül, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a tesztkorongot olyan papírcsík helyettesíti, amelyen a hatóanyag több, lépcsős koncentrációban van jelen. A vízcsepp alakú gátlási zóna szabvány szerinti kiértékeléssel történik (PESTI 2001).

2.4.2. Tenyésztésen alapuló fizikai módszerek

A **turbidimetriás mérés** a kolloid oldaton áthaladó és a részecskéken szóródó fény relatív intenzitás csökkenésén alapuló módszer. A mikrobaszaporodás előrehaladtával az oldatok zavarossá válnak, az oldat fényáteresztő képessége változik. A fény intenzitás csökkenése a szuszpendált mikroba sejttömegével arányos és sejtszámra is kalibrálható. A fotométer vagy spektrofotométer az optikai denzitást, azaz a beeső és átmenő fény hányadosának logaritmusát detektálja. A mérés a Lambert-Beer törvény alapján értelmezhető:

$A = \log \frac{I_0}{I_{tr}}$, ahol: I_0 : a zavaros oldatot megvilágító fény intenzitása, I_{tr} : az oldaton átjutó fény intenzitása (BELÁK et al. 2011).

A **konduktometriás mérések** lényege, hogy az elektromos vezetőképesség és a folyadék ellenállás változását detektáljuk impedancia, vezetőképesség és kapacitás mérésével. A mikroorganizmusok szaporodásukhoz tápanyagokat használnak fel, ezáltal a nagy molekulákat folyamatosan kisebbekké alakítják át, így módosítva a folyadékrendszer összetételét, ami az elektromos vezetőképesség és folyadékelenállás változását eredményezi. Amikor egy populáció eléri a 10^5 tke/ml-es sejtkoncentrációt, változás jelentkezik a mért paraméterekben (FUNG 2002). Az idő függvényében a görbe hirtelen emelkedni kezd, ez az idő a mikroorganizmus úgynevezett detekciós ideje, mely fordítottan arányos a jelenlévő mikroorganizmus kezdeti koncentrációjával.

A **redoxpotenciál mérésén alapuló technikák** lényege, hogy a mikrobák szaporodásának energiaforrása a biológiai oxidáció, mely a környezet redukálásával jár, csökkentve a redoxpotenciálját. Ezt általában a redukáló anyagcseretermékek felszaporodása, illetve az oxigénfogyasztás indulkálja. A módszer a tápközeg redox potenciáljának mérésén alapul (BROWN & EMBERGER, 1980).

2.5. Endogén komponensek és antimikrobás hatás

Dolgozatom kísérletes részei miatt jelen fejezet további részében nemcsak a csalánkivonatokra és a kivonatok antimikrobás hatására térek ki, hanem azon irodalmakra is, amelyek az antimikrobás hatást valamilyen endogén (a szervezetben keletkezett, azon belül megjelenő) komponenshez kötik, illetve a hatást a beltartalmi értékek antioxidáns kapacitásával hozzák összefüggésbe.

Az antimikrobás hatást az egyes növényi kivonatok igen széles skálájával vizsgálták. Különböző oldószereket - a víztől a szerves oldószerek széles választékáig - és paramétereket alkalmazva.

SAKLANI és CHANDRA (2012) az *Urtica dioica* szárából és leveléből készített extraktumok (petróleum, kloroform, etil-acetát, aceton, etanol, víz) 10 baktériumra (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobakter gergoviae*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella entericatyphim*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, és 3 gombára (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) gyakorolt hatását vizsgálták, mindamellet kíváncsiak voltak számos endogén komponens jelenlétére is, többek között a polifenolokra. A különböző kivonatok közül a vizes és az alkoholos kivonatok mutatták a legjobb hatást a legtöbb vizsgált gombára és baktériumra, míg a petróleumos, etilacetátos és kloroformos kivonatok bizonyultak a leggyengébbnek és csak néhány élő szervezetre fejtettek ki gátló hatást. Megállapították, hogy az *Urtica dioica* jelentős hatásfokkal pusztította az *Escherichia coli*, a *Streptococcus pyogenes* és *Salmonella entericatyphim* baktériumokat (SAKLANI & CHANDRA 2012).

MODARRESI-CHAHARDEHI (2012) és munkatársai az *Urtica dioica* antimikrobás hatását vizsgálták egyrészt kétféle oldószerezrel (etil-acetát és hexán) és Soxhlet extrakcióval, másrészt egyszerű egyszeri extrakcióval ötféle összetételű butanolos oldószerezrel, 28 Gram-pozitív és Gram-negatív mikroba esetén. Az *Urtica dioica* extraktumai nagyon eredményesen voltak alkalmazhatók *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spizizenii*, *Micrococcus sp.*, és *Vibrio parahaemolyticus* esetén. A butanolos extrakt hatékony volt *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* és *Staphylococcus aureus* mikroorganizmusokra, de a Soxhlet extrakció jobb antimikrobás hatást mutat Gram-pozitív, mint Gram-negatív baktériumok esetén (MODARRESI-CHAHARDEHI et al. 2012). Több gyógynövényből, így a csalán magjából készített vizes, alkoholos, etilacetátos és hexános kivonat mikrobiológiai hatását vizsgálták CEYHAN és munkatársai két Gram-pozitív és két Gram-negatív (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, valamint *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) baktériumra és egy élesztőgombára (*Candida*

albicans). Méréseik szerint csak az etanolos és az etil-acetátos extraktumok pusztították a mikroorganizmusokat, a hexános extraktum nem (CEYHAN et al. 2012).

Három romániai gyógynövény, az *Urtica dioica*, az *Arnica montana* és az *Artemisia absinthium* etanolos kivonatának antimikrobás hatását vizsgálták STANCUIC és munkatársai (STANCUIC et al. 2011) a következő baktériumokra: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, és a *Candida albicans* élesztő gombára. A mikrobák növekedését optikai sűrűségmérővel mérték. A mikrobákra planktonikus állapotban (vizes szuszpenzióban) az *Urtica dioica* a másik két növényhez hasonlóan átlagosan volt hatékony, míg a felületen tapadó mikrobáknál nagymértékű inhibíciós hatást fejtett ki.

A nagy csalán és a gyermekláncfű etil-acetátos extraktumának antibakteriális hatását vizsgálták GHAIMA és munkatársai *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* és *Escherichia coli* mikroszervezetekre. A kapott antimikrobás hatást összehasonlítva a gyermekláncfű eredményeivel az *Urtica dioica* minden esetben hatékonyabbnak bizonyult, mely eredményt a szerzők a csalán jelentős polifenoltartalmának, ami négyszerese volt a gyermekláncfűben mérteknek és a 44 % -kal jobb antioxidáns kapacitásának tulajdonították (GHAIMA et al. 2013).

WAGAS és munkatársai az *Urtica dioica* és *Rumex nepalensis* antimikrobás hatását mérték. A csalán leveléből és gyökeréből forró vizes, metanol-vizes, illetve etil-acetátos extraktumokat készítettek és vizsgálták az antibakteriális hatást *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) baktériumok és *Candida albicans* gomba felhasználásával. Az agarlyuk diffúziós módszerrel kapott eredményeik szerint az *Urtica dioica* forró vizes extraktuma nem volt hatással a választott mikrobákra, a 95%-os etil-acetát oldat viszont jó antimikrobás hatást mutatott, elsősorban a levélnek köszönhetően (WAGAS et al. 2016).

Törökországban, az ott őshonos és fűszernövényként is használt gyógynövények metanolos kivonatát, így a csalán antimikrobás hatását is vizsgálták nyolc baktériumra és két gombára. Ezen vizsgálatok mellett több módszerrel mérték az egyes kivonatok antioxidáns kapacitását is. Az eredmények azt mutatták, hogy a csalán metanolos kivonata három mikrobánál nagyon hatásosnak tűnt (*Bacillus cereus*, *Morganella morganii* és *Pseudomonas aeruginosa*) és jó

korrelációt tudtak kimutatni az antimikrobás hatás és az antioxidáns kapacitás között az ALBAYRAK és munkatársai által végzett kísérletben (ALBAYRAK et al. 2012).

BOBIS és munkatársai (BOBIS et al. 2015) különböző gyógynövények (*Ocimum basilicum*, *Urtica dioica*, *Thymus serpyllum*, *Chysanthemum balsamita* és *Achillea millefolium*) antibakteriális hatását vizsgálták Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra. A növényekből 70% etanol tartalmú vizes oldószerben egyszerű egyszeri extrakcióval készített kivonatok hatását vizsgálták, és HPLC-vel meghatározták a minták polifenol profilját és azok mennyiségét. Az antimikrobás hatást 2 Gram-pozitív (*Staphylococcus aureus* és *Bacillus cereus*) és 3 Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Salmonella typhimurium*) patogén baktériumon végezték el. Vizsgálataik alapján az *Urtica dioica* teljes polifenol és teljes flavonoid tartalma volt a legnagyobb a vizsgált növények között, melyben érdekes módon a rutin nem volt kimutatható, és a tesztelésben a második legjobb antimikrobás hatást mutattak ki.

A szárított csalán leveléből és szárából, 70-80 °C-os vizes illetve 70%-os etanolos oldat antimikrobás hatását korong diffúzióval vizsgálták *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* és *Candida albicans* mikrobákra (AMINI et al. 2014). A vizes extraktum jobb antibakteriális hatást mutatott, mint az etanolos kivonat. A legjobb hatást a gyökér vizes extrakciójával érték el.

Banja Luka területéről származó száraz csalánlevél mintákat vizsgált KUKRIC, a munkatársaival együtt (KUKRIC et al. 2012). A karotinodok és a klorofilltartalom mellett az antioxidáns védelemben szerepet játszó enzimeket és a teljes polifenoltartalmat, valamint a flavonoidok és flavonolok mennyiségét is meghatározták és több módszerrel megmérték a minták antioxidáns kapacitását is. A csalán kivonatot Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) tesztelték. Az eredmények alapján az extraktumban a minimális gátló koncentráció (MIC) és a minimális baktericid koncentráció (MBC = minimum baktericid concentration az antibakteriális szer azon koncentrációja, amely a mikroorganizmusok közel 100%-át teljesen elpusztítja) 9,05 és 149,93 mg/ml között változott. A legjobb eredményeket a fiatal levelekkel érték el.

KÖRPE és munkatársai (2012) két csalán, az *Urtica dioica* és az *Urtica pilulifera* leveleinek, gyökereinek, virágainak és magvainak metanolos és vizes kivonatait vizsgálták, valamint az élelmiszerek romlását és növények fertőzését előidéző baktériumokra tesztelték. Akkor kaptak lényegesen hatásosabb antimikrobiális hatást, amikor a legnagyobb polifenoltartalmat mérték, jelen esetben az *Urtica dioica*-nál (KÖRPE et al. 2012).

SINGH és munkatársai (SINGH et al. 2012) a csalánból vizes, hexános, etilacetátos, metanolos és kloroformos kivonatot készítettek, majd korong diffúziós módszerrel tesztelték az antimikrobás hatást mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumok (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*) esetében. Szoros összefüggést tudtak kimutatni a GC-MS módszerrel a hexános extraktumban kimutatott értékes endogén komponensek és az antimikrobás hatás között.

PROESTOS és munkatársai a görög aromás gyógynövények sokaságával egy olyan nagyszabású munkát tettek közzé, amelyben HPLC-vel meghatározták a gyógynövények polifenolos komponenseit, meghatározták az antioxidáns kapacitásukat és vizsgálataik kiterjedtek az antimikrobás hatás vizsgálatára is (PROESTOS et al. 2006). Érdeemes megemlíteni, hogy rutint nem találtak a vizsgált csalán mintában.

Ezen rövid, a csalán antimikrobás hatásával foglalkozó néhány irodalmi említés rávilágít arra, hogy a kutatók a növény különböző részeiből, különböző extraháló szerekkel, különböző extrahálási módszerekkel készített kivonatainak a különböző mikroorganizmusokra gyakorolt hatásáról elég ellentmondásos eredményeket mutattak ki. Ennek ellenére az az egy biztos, hogy a csalánnak számos mikroorganizmusra kimutatható antimikrobás hatása van. Ami talán a legfontosabb, hogy a kutatás elment az analitika felé, ahol arra keresik a választ, hogy mi, mely endogén komponens/komponensek okozhatják ezt a kedvező hatást. Abban a szerzők egyetértenek, hogy a nagy polifenoltartalom jobb antimikrobás hatást okoz. Egyre több eredmény születik arra vonatkozóan, hogy a kivonatokban a kimutatható értékes komponensek antioxidáns/redukáló tulajdonsága és az antimikrobás hatás között szoros összefüggés állapítható meg.

2.6. A nagy csalán (*Urtica dioica* L.) kémiai összetétele

A nagy csalánban előforduló endogén komponensekkel behatóan, hazai viszonylatban (TÓTH 2010) foglalkozik, aki szerint a nagy csalán levele és gyökere a következő összetevőket tartalmazza.

A **nagy csalán levele** tartalmaz:

Flavonoidokat (0,7-1,8 %): kempferol-3-O-glükozidot, kempferol-3-O-ramnoglükozidot, kvercetin-3-O-glükozidot, kvercetin-3-O-ramnoglükozidot, izoramnetin-3-O-glükozidot, izoramnetin-3-O-neohesperidozidot,

Fahéjsavakat: kávéssav, p-kumársav, ferulasav, klorogénsav,

Szerves savakat: hangyasav, ecetsav, vajsav, oxálsav, borostyánkősav, almasav, citromsav, izocitromsav, fűmársav, malonsav, kinasav,

Illóolajat, melynek főkomponensei: acetofenon, metilheptanon, citrál, linalool,

Szénhidrát-fehérje-polimereket,

A szőrökben: 2 mg% acetilkolint, 3 mg% hisztamint, 0,02% szerotonint,

Vitaminokat: 0,6% C-vitamint, B6-vitamint, B2-vitamint, K-vitamint, pantoténsavat, folsavat

Ásványi anyagokat (pl. 2-200 mg vas/100 g).

A **nagy csalán gyökere** tartalmaz:

Szterolokat: β -szitoszterolt, β -szitoszterol-3-O-glükozidot, 7β -hidroxi- β -szitoszterolt, 7β -hidroxi- β -szitoszterol-3-O-glükozidot, 7α -hidroxi- β -szitoszterol-3-O-glükozidot, 7α -hidroxi- β -szitoszterol-3-O-glükozidot, β -szitoszterol-(6"-O-palmitil)-3-O-glükozidot),

Lignánokat: neoolivilt, 9-acetilneoolivilt, 9,9'-bisacetilneoolivilt és glikozidjaikat,

Szekoizolaricirezinolt és glükozidját,

α -pirén-származékokat és azok glikozidjait,

Poliszacharid-fehérje polimert, amelynek a szénhidrát része glükózból, galaktózból, arabinózból, ramnózból, mannózból, xilózból és uronsavakból áll (TÓTH 2010).

Fontos bioaktív komponenseik még az α -tokoferol (E vitamin) és β -karotin (A vitamin). Ezen vitaminok is nagymértékben felelősek a kedvező hatás kialakításáért, és ne feledkezzünk meg ezen vitaminok jelentős antioxidáns/redukáló tulajdonságáról sem (MAYNE, 2003).

A csalán talán legfontosabb bioaktív anyagai a fentiekben említetteken kívül a polifenolok és ezen belül a flavonoidok, melyek felelőssé tehetőek ez eddigiekben felsorolt kedvező élettani hatásokért. A kutatók nagy száma nem csak a csalán növényben jelen levő értékes komponensek kimutatásával, hanem az azokból történő különböző extrakciókkal történő kinyerésével is behatóan foglalkozott (PEREIRA & MEIRELES 2010; GARCIA-SALAS et al. 2010; JUN & RONG 2014; HSIEH et al. 2014).

A növényvilágban előforduló flavonoidok a másodlagos növényi anyagcseretermékek közé tartoznak, a növények saját védelmi rendszerük miatt szintetizálják ezeket. Jelentős mennyiségben fordulnak elő a zöldségekben és a gyümölcsökben is, melyek természetes antioxidánsok, fogyasztásuk egészségvédő tényező. Erről a vegyületsoporról és a vegyületsoport élettani hatásáról egy későbbi, a szabadgyökökkel foglalkozó fejezetben kicsit részletesebben foglalkozom, most csak a csalánnal kapcsolatos irodalmakat tekintem át.

A csalánban található flavonoidok kimutatásával több kutató csoport is foglalkozott, akik munkáiban egyéb értékes endogén komponensek kimutatására is sor került, ezért ezek szétválasztását nem tartom célszerűnek, annál is inkább, mert a növényben előforduló összes értékes komponens együttes hatásának/meglétének köszönhető a kedvező élettani hatás.

Az *Urtica dioica* termesztésére, gyűjtésére illetve állatgyógyászatban és humán felhasználásban betöltött szerepére vonatkozó -az előbbieken bemutatott- irodalmi összeállításban UPTON (2013) a növény más-más szempontból tárgyalt szerepének tárgyalása mellett egy igen részletes analízis eredményeit is ismerteti.

Az analízis során az elsődleges metabolitok, a fehérjék, szénhidrátok, lipidek, stb. mellett részletes említést tesz a flavonoidokról (kempferol, izoramnetin, kvercetin és származékai), más fenolos komponensekről (sikimisav származékok fenil-propán, kávésav, ezek különböző észtereiről, mint klorogénsav és szlopoletin), az esszenciális olajokról, zsírsavakról és a különböző értékes karotinoidokról (β -karotin, hidroxil- α -karotin, luteoxantin, lutein epoxid, violaxantin). Ezen eredmények jól összecengenek DOGAN és munkatársai által kapott eredményekkel, akik a fenolos komponensek mellett fehérjéket és számos karotinoidot is azonosítottak több gyógynövény vizsgálatakor és az eredmények/a kapott értékek alapján a csalánt ezen vizsgált növények között a középmezőnyben helyezték el (DOGAN et al. 2010).

Ugyancsak összecengenek ezek az eredmények DUROVIC és munkatársai által közölt eredményekkel, akik az *Urtica dioica* levél extraktumaiban kimutatták a rutin és a kempferol 3-O-glükózid jelenlétét. Megállapították, hogy a kivonatok különböző zsírsavakat, karoteinoidokat,

fenolos komponenseket és ásványi anyagokat (Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, és Zn) tartalmaznak (DUROVIC et al. 2017).

Számunkra is fontos információt közölnek NENCU és munkatársai, akik azt tapasztalták az analitikai vizsgálataik során, hogy a növény begyűjtésének optimális ideje a tavaszi időszak, a gyógyhatású anyagok főleg a fiatal növényben találhatók meg jelentősebb mennyiségben. Orvosi szempontból gyógyhatásúaknak bizonyultak a következő komponensek: a kávésav, a klorogénsav, a ferulasav, rutin (kvercetin-3-rutinozid (szoforin)-flavonoid glikozid), izo-kvercetin (NENCU et al. 2012).

Ha az egyes kivonatokban az általunk is használt oldószerekkel kapott eredményeket tekintjük át, akkor a csalán levelek etanolos, majd metanolos kivonatából KUKRIC és munkatársai munkáját érdemes megemlíteni, megmérték a kivonat teljes fenol-, flavonoid- és flavonol tartalmát (KUKRIC et al. 2012).

SOFIC és munkatársai 50 növény vizes extraktumában, köztük a csalánban, annak levelében, szárában és virágjában is vizsgálták rutin koncentrációját, a csalán levél ebben a sorban az előkelő 11. helyet foglalta el (SOFIC et al. 2010).

OTLES és YALCIN az *Urtica dioica* teljes fenol-profilját analizálták HPLC módszerrel, 80 %-os metanolos kivonatban. A növényeket különböző kitettségű helyekről gyűjtötték, amely nagymértékben meghatározta az összetétel alakulását. A friss és száraz növény fogyasztásra történő javaslata miatt mindkettőből a profil meghatározása mellett a minták antioxidáns kapacitását is megmérték Folin és DPPH módszerekkel. A legnagyobb polifenol mennyiséget és antioxidáns aktivitást a napfényes, meleg, kellemes éghajlatú helyekről származó mintákban találták, mind a növény föld feletti részében, mind a gyökérben és ennek alapján javasolták a friss növény fogyasztását (OTLES & YALCIN 2012).

Az *Urtica dioica* eddigi legrészletesebb polifenol-profilját ORCIC és munkatársai (2014) publikálták. A mintákat, a csalán levelét, szárát, virágját és gyökerét külön-külön 80%-os metanolos oldattal szobahőmérsékleten 48 órán át rázatták, majd az extraktumot LC-MS módszerrel elemezték. A választott 45 növényi fenolos sztenderd segítségével 21 fenolos komponenst mutattak ki. A legfontosabb komponensek közül a rutin kiemelkedő mennyiségben van jelen a virágban, szárban, gyökérben és levelben (a levelben 0,02-4,6 mg/g száraz levél). Kisebb mennyiségben mutatták ki a száraz levelben a kvercetin 3-O-glükozidot (0,0024-1,08

mg/g sz.l.) és a kempferolt 3-O-glükozidot (0,070-0,0 mg/g sz.l.). A gyökérben csak a rutin volt kimutatható (0,0186-0.0023 mg/g száraz gyökér) (ORCIC et al. 2014).

Érdemes megemlíteni ULLAH és munkatársai (2017) munkáját, melyben az *Urtica dioica* etilacetátos extraktumából új benzolszármazékot -a diocanolt- izoláltak a benne található az ismert alkotóelemekkel: β -amyrin, β -szitoszterol, stigmaszterol, és oleanolsav (ULLAH et al. 2017).

Szuperkritikus fluid extrakcióval SAJFRTOVA és munkatársai csalán gyökeréből két gyógyászatilag értékes fenolos komponens, a nem poláros β -szitoszterolt és a poláros szkopoletint tudtak kivonni (SAJFRTOVA et al. 2005).

Gyógyászati és kémiai szempontból igen értékes beltartalmi komponensnek számít a növényben levő klorofill. HOJNIK és munkatársai klorofill A-t és klorofill B-t izoláltak az *Urtica dioica* leveléből és szárából készült extraktumaiból, melynek során egyszerű egyszeri, és többszöri extrakciót, valamint Soxhlet és ultrahanggal segített extrakciót alkalmaztak (HOJNIK et al. 2007).

Végezetül talán a dolgozat szempontjából egyik legfontosabb gondolat, a polifenoltartalom és az antioxidáns kapacitás közötti szoros kapcsolatot bemutató irodalmak említését tartom szükségesnek.

GÜDER és KORKMAZ (2012) a nagy csalán virágából, gyökeréből, magjából és leveléből készített etanolos keverékek antioxidáns kapacitását határozták meg különböző antioxidáns tesztekkel, ugyanakkor az extraktumok teljes polifenoltartalmát is meghatározták. Cikkükben leírják, hogy a fenolos vegyületek antioxidáns tulajdonságokkal rendelkeznek, de mérési eredményeik alapján a magas antioxidáns tulajdonság -más antioxidáns tulajdonságú vegyületek jelenléte miatt- nem volt teljesen összefüggésben a fenoltartalommal. CARVALHO és munkatársai (2017) publikációjukban leírják, hogy az *Urtica dioica*-t és más kevésbé tanulmányozott *urtica*-fajokat gyakran használnak élelmiszer-összetevőként. Vizsgálták az extraktumok polifenoltartalmát és antioxidáns kapacitását. Azt is megállapították, hogy a kivonatok egyike sem volt citotoxikus a makrofágokra és a májsejtekre, ami arra utal, hogy az extraktumok biztonságosan felhasználhatók élelmiszer-adalékként.

2.7. Szabad gyökök, azok hatásai és az ellenük való védelem lehetőségei

Ahhoz, hogy megértsük azt, hogy miért olyan fontos a gyümölcsökben, zöldségekben, gyógynövényekben, jelen esetben a csalánban levő megfelelő mennyiségű és minőségű redukáló tulajdonságokkal rendelkező (antioxidáns) endogén komponens bevitele és hogy ezeknek a komponenseknek milyen kedvező élettani hatásuk van, egy kicsit messzebből kell elindulni. Az 1960-as évek végén az orvostudománynak egy hatalmas felfedezése történt, amikor McCord és Fridovich 1969-ben felfedezték a szabadgyökös reakciók jelentőségét és ezeknek betegségek kialakulásával való szoros kapcsolatát (McCORD & FRIDOVICH 1969).

Mik is azok a szabad gyökök, hogyan keletkeznek, milyen szerepük van az élő szervezetek életében, milyen védekezési mechanizmusok azok, amelyek a káros hatások kivédésében részt vesznek? A növényekben, állatokban és a humán szervezetben zajló biokémiai folyamatokban, a légzési láncban, az elektrontranszport folyamán az oxigén vízzé történő redukciója valósul meg. Ez a redukciós folyamat azonban nem mindig teljes és ekkor toxikus aktív oxigén formák keletkeznek, oxidatív stressz alakul ki. Nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy a szabad gyököknek más eredetű, celluláris forrásai is lehetnek (KEHRER & SMITH 1994).

Mindezek mellett az élő szervezetet érő biotikus (vírusok, gombák, baktériumok stb.) és abiotikus (fény, hő, UV, különböző környezeti behatások, stb.) stresszhatások is szabad gyökök képződését indukálják. Mik is azok a szabad gyökök? „A szabadgyökök olyan reaktív oxigén-, vagy nitrogénközpontú molekulák vagy molekularészletek, amelyek párosítatlan elektront tartalmaznak a legkülső elektrónhéjukon. Mivel az elektronok párképzésre hajlamosak, a magányos elektront tartalmazó molekulák nagy intenzitással keresnek más molekulákat, amelyektől elektronokat vonhatnak el” (HEGEDŰS & STEFANOVITSNÉ 2012).

Ilyen szabadgyökök lehetnek a szuperoxid gyök (O_2^{\cdot}), a perhidroxil gyök (H_2O^{\cdot}), a hidrogén peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök (OH^{\cdot}), szinglet oxigén (1O_2), a nitrogén-monoxid (NO^{\cdot}), a peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$), a nitrogén-dioxid (NO_2^{\cdot}) és dinitrogén-trioxid (N_2O_3). Ismert, hogy a szabad gyökök igen nagy reakciókészséggel rendelkeznek, aminek következményeként súlyos károkat okozhatnak a biomolekulákban, a lipidekben, a fehérjékben, a szénhidrátokban és a DNS-ben, ami végül a sejt halálához vezethet.

A szabad gyökök okozta károsodások közül a legnagyobb károkat a lipidekben okozzák. A lipidperoxidáció során a lipidekből álló membránok kilyukadhatnak, a membránok szerkezete tönkremegy és nem tudja betölteni a funkcióját.

Természetesen ezen káros hatások ellen az élő szervezet kialakította a védelmi rendszerét, mely több részből áll. Az *intracelluláris, enzimatikus védelmi* rendszer, melybe pl. olyan enzimek tartoznak, mint a szuperoxid-dizmutáz, a kataláz vagy peroxidázok, számos más enzim mellett. Ezeket az enzimeket az élő szervezet maga elő tudja állítani. A második csoportba tartoznak az *extracelluláris védelmet* biztosító fehérjék, pl. a cöroloplazmin, a transferrin, afe ferritin, a piruvát. A harmadik az ún. *kismolekulás védelemi rendszer*, melybe beletartoznak a különböző vitaminok, pl. A-, C-, E-, K-vitamin, a kéntartalmú vegyületek (cisztein, ciszteamin, glutation stb.), a nyomelemek (szelén), a karotinoidok, a polifenolos vegyületek. Az ebbe a csoportba tartozó, védelmet biztosító molekulákat a humán szervezet nem képes előállítani, ezeket be kell vigye a szervezetbe.

A csalámban a kismolekulás védelmi rendszert képező molekulák közül szinte mindegyik előfordul, így például a C-vitamin, a karotinoidok, a polifenolos vegyületek stb. Ennek irodalmi ismertetése az előző fejezetben megtörtént.

Miután a dolgozat részét nem képezte az elsőként felsorolt molekuláknak a vizsgálata, ezért csak az általam is vizsgált polifenolos vegyületekre, azok antioxidáns védelemben betöltött szerepére térek ki. Polifenoloknak kémiaiilag azokat a vegyületeket nevezzük, amelyek egy vagy több hidroxil csoportot tartalmazó aromás gyűrűvel rendelkeznek. A polifenolok szó alatt sokszor a flavonoid kifejezés is használatban van, ami ezen vegyületcsoport sokféleségének köszönhető. A polifenolos vegyületek a növények másodlagos anyagcseretermékei, és azért szintetizálják a növények, hogy védelmet biztosítsanak számukra a különböző stresszhatásokkal szemben. Ismertem mi nem tudjuk ezeket a molekulákat szintetizálni, de a szabad gyökök ellen védekeznünk kell, ezért az ilyen értékes beltartalmú növényeket valamilyen formában el kell fogyasztanunk.

A polifenolos vegyületeket két nagy csoportra lehet osztani, a flavonoidokra és a fenolos savakra. A flavonoidokra a C₆-C₃-C₆ (difetilpropán) alapváz jellemző, ahol a két benzolgyűrű egy oxigén atomot tartalmazó pirán, vagy piron gyűrűn keresztül kapcsolódik. Jelenleg igen nagyszámú flavonoidot ismerünk, ugyanis az alapszerkezethez/alapvázhoz, melyet aglikonnak nevezünk, különböző igen nagy változatosságra lehetőséget adó cukormolekulák kapcsolódnak a hidroxil funkciós csoporton keresztül, amelyeket glükozidoknak nevezünk. A természetben gyakrabban ezen formák fordulnak elő. A másik csoport a fenolos savak, melyek a benzoésavnak illetve a fahéjsavnak származékai.

A flavonoidokat több nagy csoportra lehet felosztani, amelyeken belül az egyes alapszerkezethez kapcsolódó funkciós csoportok miatt számos képviselőjük fordul elő. Ezek a csoportok: a flavonok, a flavanolok, a flavonolok, a flavanonok, az antocianidinek és az izoflavonoidok. Összességében ezeknek a vegyületeknek a szerkezetükből adódóan antioxidáns/redukáló hatásuk van, melynek számos példájával találkoztunk eddig is.

Amikor az antioxidánsokról beszélünk, akkor mindig megfogalmazódik az a kérdés, hogy ezt a hatást hogyan lehet mérni, meghatározni, számszerűsíteni. Számos mérési módszer született, amivel a zöldségekben, gyümölcsökben, teákban, kész termékekben stb. jelen levő antioxidánsok, redukáló tulajdonságú komponensek hatását kívánták meghatározni. Talán a legjobb csoportosítást FRANKEL és MEYER munkája adja (FRANKEL & MEYER 2000), melyben két nagy csoportra osztják fel a mérési módszereket.

A *hidrogénatom átmenettel* kapcsolatos mérések azt mérik, hogy az adott minta egy adott szabad gyökkel szemben mennyire bizonyul hatásosnak, ilyen módszerek például az ORAC-Oxygen Radical Absorbance Capacity, a TRAP-Total peroxil Radical Trapping Parameter, a Kemilumineszcencián alapuló módszerek és a Béta-karotin elszíntelenedésén alapuló módszer.

Az *elektronátmenettel* kapcsolatos módszerekhez -amely reakciók során színváltozást lehet mérni és ennek mértékéből lehet a minta antioxidáns kapacitására következtetni- olyan módszerek tartoznak, mint az általunk is használt mérések. A vasredukálóképességen alapuló (FRAP-Ferric Reducing Ability of Plasma) módszer, az összes polifenoltartalom meghatározása Folin-Ciocalteu reagenssel (TPC –Total Polyphenol Content), a DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyök megkötésén alapuló módszer, de ezeken kívül még számos eljárás tartozik ebbe a csoportba. Például a Troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás, a TEAC –Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, valamint a rézion redukálóképességen alapuló antioxidáns kapacitás mérés CUPRAC –CUPRIC ion Reducing Antioxidant Capacity módszer. Ez utóbbi csoportba tartozó mérések spektrofotometriás mérések, általában olcsók, gyorsan kivitelezhetők, de a részletekbe való bemenetel nélkül meg kell említeni, hogy mindenyik módszernek számos hátránya is van (nem a fiziológiás pH-n történnek a mérések, a szervezetben jelen nem levő gyök elleni védelmet mérnek stb.).

3. Anyagok és módszerek

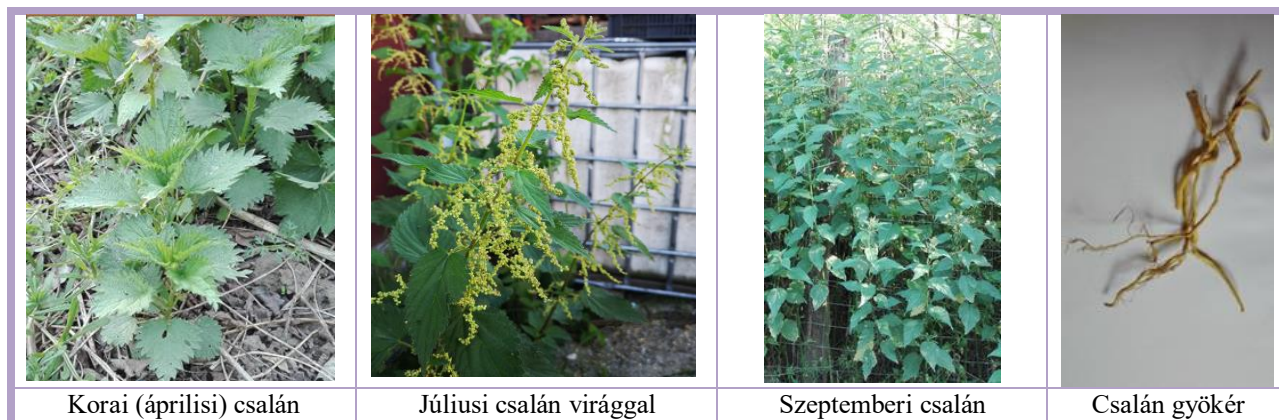
3.1. Kísérletek és a mérések helyszínei

- A minta-előkészítést (szárazanyag-tartalom meghatározást, aprítást, szitálást, szemcseméret-meghatározást), valamint az extrakciót, bepárlást, szűrést és szárazra párlást a SZIE ÉTK Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszékén és a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszékén végeztem.
- Az analitikai mérések (TPC, FRAP, DPPH) a SZIE ÉTK Alkalmazott Kémia Tanszékén, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszékén, valamint a SOTE, Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognóziai Intézetében történtek.
- A HPLC-s mérések a SZIE Kertészettudományi Kar, Talajtan és Vízgazdálkodás Tanszékén, és az MTA Természettudományi Kutatóközpontjában történtek.
- A mikrobiológiai kísérletekre a SZIE ÉTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén került sor.

3.2. Anyagok

3.2.1. Növényi alapanyagok

Alapanyagként a nagy csalán (*Urtica Dioica* L.) gyökerét és levelét használtam fel (2. ábra), melynek növényteni azonosítása Dr. Radácsi Péter, a SZIE KERTK Gyógy- és Aromanövények Tanszékének adjunktusa segítségével történt. Végeztem előkísérleteket a csalán virágával is, de részben a gyűjtési nehézségek, részben pedig a mikrobiológiai hatás előkísérleteinél mutatott negatív eredmények miatt a további vizsgálatokat elvettem.



2. ábra: a nagy csalán levele a növény különböző fenológiai fázisaiban, és gyökere (Saját fotók)

Kísérleteim során a csalán gyökeréből és leveléből történtek vizsgálatok. Ezek igen sokrétűek és változatosak voltak, ezért táblázatos formában szemléltetem (1. táblázat).

1. táblázat: kísérletek összegző táblázata

Helyszín	Növényi részek	Műveletek	Vizsgálatok
SZIE ÉTK Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék	saját gyűjtés levél, gyökér	szárítás, aprítás szitálás, vákuum szűrés, extrakció, bepárlás	szárazanyag-tartalom szemcseméret, kihozatal
BMGE Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék	saját gyűjtés levél, gyökér	aprítás, extrakció, Soxhlet, szuperkritikus	szárazanyag-tartalom, kihozatal
SZIE ÉTK Alkalmazott Kémia Tanszék	saját gyűjtés levél, gyökér	vizes: 60- 80- 100 °C, 3 órás hőkezelés teakészítés alkoholos: 20%, 70%	TPC=teljes polifenol tart. FRAP=Ferric Reducing Ability of Plasma DPPH=1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök megkötésén alapul
SOTE, Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognóziái Intézete	saját gyűjtés gyökér		TPC, DPPH
SZIE KTK Talajtan és Vízgazdálkodás Tanszék	saját gyűjtés levél, gyökér		HPLC polifenol profil
MTA Természettudományi Kutatóközpont	saját gyűjtés levél, gyökér		HPLC, rutin , kvercetin
SZIE ÉTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén	saját gyűjtés levél gyökér	extrakció: vizes, alkoholos 96%	antimikrobás hatás vizsgálata

A saját gyűjtésű minták származása: Közép-Magyarország, Vál, akácos erdős terület (3. ábra).

A növényi mintákat 4 fenológiai fázisban és ezen a területen gyűjtöttem.



3. ábra: részlet az erdőből, csalán aljnövényzettel (Saját fotó)

A talaj összetételének a vizsgálata a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi Igazgatóság Velencei Talajvédelmi Laboratóriumában történt (2016.06.13-án), ennek adatai a 2. táblázatban szerepelnek.

2. táblázat: az erdő talajának jellemző összetevői (kapott adatok).

pH(KCl)	KA	Sórtartalom m/m%	CaCO ₃ m/m%	Humusz m/m%	NO ₂ +NO ₃ -N mg/kg	P ₂ O ₅ mg/kg	K ₂ O mg/kg	Na mg/kg	Mg mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	Mn mg/kg	SO ₄ -S mg/kg
7,18	52	<0,02	14	5,12	14	210	339	32,6	143	1,78	2,83	39,6	12,1

Kísérleteimhez **alapanyagként** a nagy csalán (*Urtica Dioica* L.) gyökerét és levelét (szára nélkül) használtam fel.

A **kísérletek időtartama**: kísérleteimet 2013-tól 2019-ig végeztem.

3.2.2. Vegyszerek, sztenderdek

Az analitikai és mikrobiológiai (táptalajok) vizsgálatok során felhasznált vegyszerek, a HPLC-hez használt analitikai tisztaságú sztenderdek (pirokatekin, kvercetin, kvercitrin, rutin, katekin, epikatekin, klorogénsav, fahéjsav, dihidro-benzoésav, sziringinsav, vanilinsav, ellágsav), valamint a mikrobiológiai kísérleteknél alkalmazott rutin és kvercetin a Sigma-Aldrich Kft-től kerültek beszerzésre.

Az extrakciós oldószereket (n-hexán, 96%-os etanol) szintén a Sigma-Aldrich Kft-től szereztük be.

3.2.3. Szén-dioxid a szuperkritikus extrakcióhoz

A szuperkritikus extrakcióhoz szükséges szén-dioxid élelmiszeripari minőségben (999,9 g/kg tisztaságban, 64-66 bar nyomáson) a Linde Gáz Magyarország Zrt-től került beszerzésre.

3.3. Mintaelőkészítések és növényi kivonatok készítése

Ebben a részben először azokat a minta-előkészítéseket -szárítás, aprítás- említem, amelyek minden további mérés elvégzéséhez elengedhetetlenek voltak. Ezután tárgyalom az egyes mérésekhez kapcsolódó mintaelőkészítő műveleteket.

3.3.1. Szárítás


Kísérleteimet frissen szedett- és szárított növényi részekkel végeztem el. A csalán levelét és gyökerét tárolás céljából azért szárítottam meg, mert céлом egyrésztől porítása, és

adalékanyagként történő alkalmazása, másrésről a növény teaként történő felhasználása volt. A szuperkritikus extrakciós mérések is szárított növényből valósulhattak meg. **A friss növényi részek szárítását** -gyökér esetében alapos mosás után- fénytől védett levegős helyen körülbelül 30 °C hőmérsékleten végeztem 2-3 hétig.

Extraktumaim szárazra párlását rotációs vákuum bepárló készülékkel végeztem, illetve szárítószekrényben valósítottam meg 80 °C-on 24 órán keresztül. (Az előkísérletek alapján ennyi idő elég a tömegállandóság eléréséhez.)

3.3.2. Aprítás

A friss növényi részeket először metsző ollóval durvára aprítottam, majd késes darálóval (BOSCH TSM6A013B) folytattam a darabolást. A szárított növényi részek aprításához Retsch GM 200 Grindomix - laboratóriumi késes aprítót (4. ábra), illetve laboratóriumi MM 400 rázó-golyós malmot használtam (5. ábra). Az aprított minta szárított csalán levél és gyökér volt.

	<p><u>Az aprító jellemzői:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Fordulatszám határok: 2000-10000 1/perc • Aprítandó anyag max. szemcsemérete: 10...40 mm Végző finomság < 0,3 mm • Maximális mintamennyiség: 900/1000 ml • Örlési idő: 1 s - 180 s <p><u>Az aprítás jellemzői:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • idő: 30 s; • fordulatszám: 8000 ford/perc • végző szemcseméret: µm-ben kifejezve
--	--

4. ábra: Retsch GM 200 Grindomix laboratóriumi késes aprító (Saját fotó)

	<p><u>Az aprító jellemzői:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Betölthető mintaméret ≤ 6 mm • Végfinomság ~ 10 µm • Szarzs/betölthető mennyiség: max. 2 x 10 ml • Rezgési frekvencia 3 - 25 Hz <p><u>Az aprítás jellemzői:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • idő: 8 perc • Rezgési frekvencia: 25 Hz • végző szemcseméret: µm-ben kifejezve
---	--

5. ábra: Retsch MM 400 rázó-golyós malom. Forrás: Mányai György, Verder Hungary Kft.

3.3.3. Extrakciók

Munkám során 3-féle extrakciós módszert használtam: egyszerű egyszeri (és egyszerű többszöri) szilárd-folyadék extrakciót, Soxhlet extrakciót és szuperkritikus fluid extrakciót. A különböző kísérleteknél három-öt párhuzamos mérést végeztem.

3.3.3.1. Egyszerű egyszeri extrakció, majd a keverékek szétválasztása mennyiség-meghatározáshoz és analitikai mérésekhez

Az extrakciókat az analitikai vizsgálatokhoz a SZIE ÉTK Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék termosztáttal ellátott keverős duplikátorában (6. ábra) végeztem. A keverékeket az extraktumok mennyiségi meghatározásához vákuum szivattyú segítségével szűrtem le (7. ábra), analitikai méréseimhez a keverék szilárd és folyékony fázisait MIKRO 22R Hettich típusú centrifugával választottam szét.



6. ábra: extraháló berendezés SZIE ÉTK Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék (Saját fotó)
(Az extraktor részei: 1. Duplikátor, 2. Termosztát, 3. Keverőmotor)



7. ábra: vákuum szűrés (Saját fotó)

Az extrakciók megvalósítása a következőképpen történt:

- vizes kivonat: gyökérből és levélből 100 mg/ml koncentrációjú keveréket (Gyógyszerkönyvi leirat) készítettem kétszer desztillált vízzel. Ezt keverős duplikátorban (6. ábra) 60 °C, 80 °C, 100 °C hőmérsékleten 3 óra hosszan keresztül extraháltam, illetve Memmert vízfürdőben (8. ábra) rázogattam. Vizes kivonatként teát is készítettem úgy, hogy forrázás után 24 órát hagytam állni a keveréket, majd vákuum szivattyú segítségével (7. ábra) leszűrtem.
- etanolos kivonat (20 %, 70 %): gyökérből és levélből szintén 100 mg/ml koncentrációjú etanolos keverékeket készítettem (Gyógyszerkönyvi leirat), majd 30 °C-on 20 órán keresztül állni hagytam.



8. ábra: Memmert vízfürdő (Saját fotó)

3.3.3.2. Egyszerű egyszeri extrakció a mikrobiológiai vizsgálatokhoz:

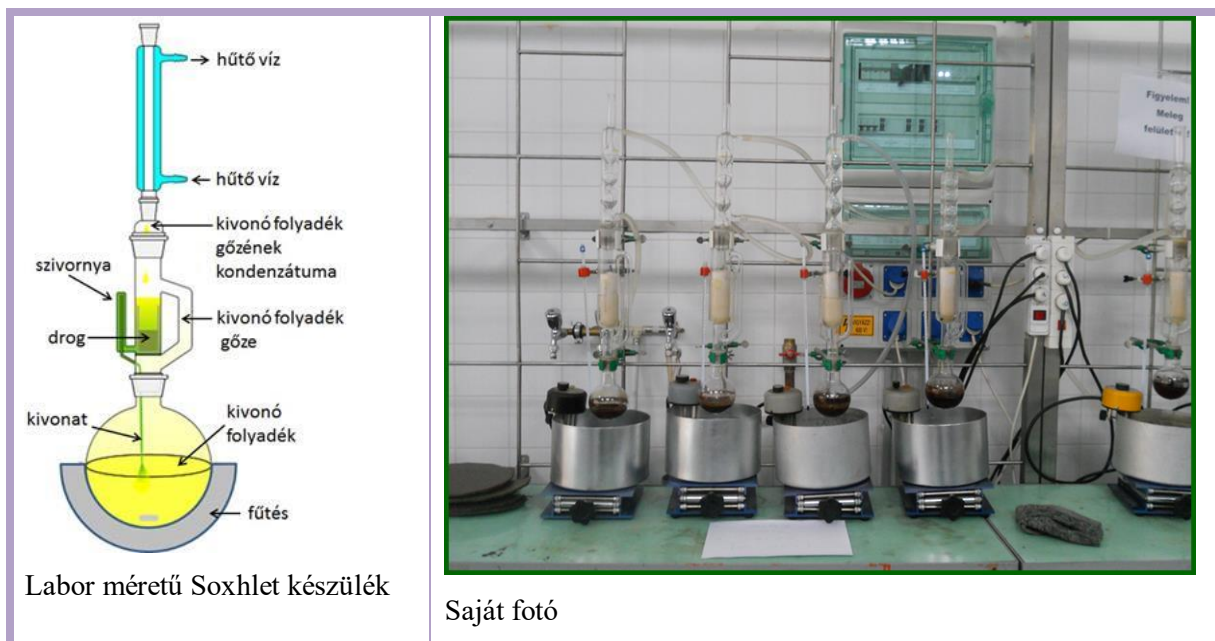
- vizes extraktum: gyökérből és levélből (100 mg/ml), 80 °C, 100 °C/ 3 óra
- etanolos extraktum (96 %): gyökérből és levélből (100 mg/ml) 30 °C, 20 óra, 180 ford/perc rázatás Gallencamp orbitális rázógép segítségével.

Extrahálás után a növényi részeket Thermo scientific SORVALL Evolution RC szupercentrifugával ülepittem (20 perc 8000 ford/perc, 4 °C), a felülúszót pipettával szívtam le, majd 0,45 µm pórusméretű MILLEX-HV PVDF membránszűrő (Millipore Syringe-Driven-Filter-Unit, WATERS Kft) segítségével szűrtem sterilre.

3.3.4. Soxhlet extrakció

A Soxhlet extrakció a szilárd-folyadék extrakciós eljárások közismert módszere. Gyakran alkalmazzák növényi drogok kevésbé vagy egyáltalán nem illékony összetevőinek kivonására.

Előnye az egyszerű extrakcióval szemben, hogy lehetővé teszi az oldószer többszöri, cirkulációs felhasználását. A teljes extrakciós folyamathoz általában 12-20 óra szükséges. A Soxhlet extrakciós módszer vázlatos felépítését a 9. ábra, és magának a folyamatnak a bemutatását a 10. ábra szemlélteti.



9. ábra: Soxhlet extrakció vázlata (DÉVAY 1998)

10. ábra: Soxhlet extrakció megvalósítása

A Soxhlet eljárással történő kioldásokat és azok paramétereit a 3. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Soxhlet extrakció

Növényi minta	Oldószer	Olajfürdő hőmérséklete
20 g	200 ml	°C
levél	96 % etanol	140-160
gyökér	96 % etanol	140-160
levél	95 % hexán	120-130
gyökér	95 % hexán	120-130

Az extrakciókat a csalán leveléből és gyökeréből is elvégeztem, 14 óra alatt mindegyik extrakció esetében 4 ciklus történt. Az extrakció után az oldószert rotációs vákuum bepárló segítségével távolítottam el az oldatból.

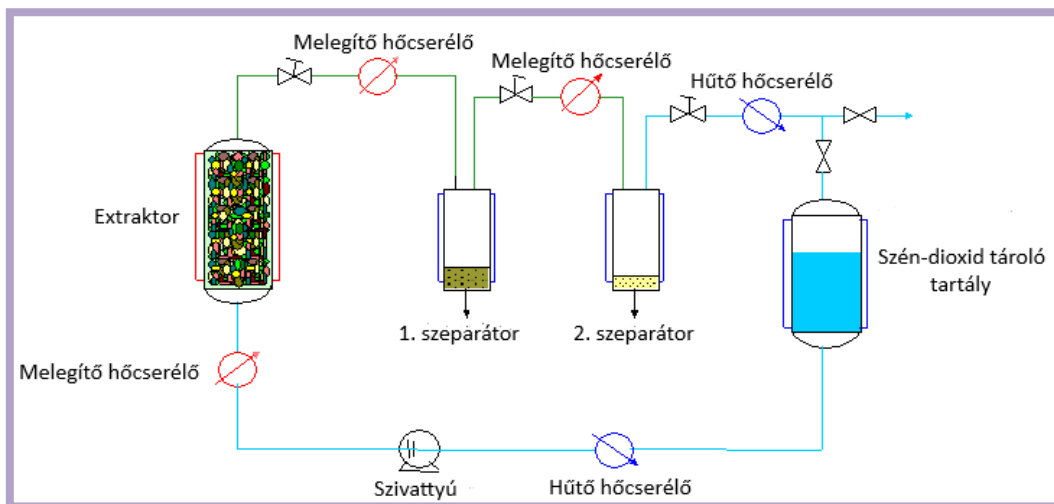
3.3.5. Szuperkritikus fluid extrakció

A szuperkritikus extrakciót a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszéke által kifejlesztett félüzemi nagynyomású berendezésben végeztem. Az extraktort Ausztriában tervezte és gyártotta a NATEX cég. Jellemzői: az extraktor

űrtartalma 5 l, de kb 1 kg-ot lehet csak beletenni, a növénytől és annak sűrűségétől függően. Szakaszos működésű, az alkalmazható maximális nyomás értéke 500 bar, a maximális hőmérséklet 200 °C. A félüzemi méretű szuperkritikus extrakciós berendezést, amellyel a kivonást végeztem, a 11. ábra mutatja be.

Első lépésként az aprított csalán levélből illetve gyökérből 450-1005 g közötti -kísérletenként eltérő-mennyiséget mértem az extraktorba. A szén-dioxid tároló tartályból kilépő szén-dioxid hűtött vezetéken keresztül -5 °C körüli hőmérsékleten és 64-66 bar nyomáson, egy adagoló szivattyú segítségével folyékony állapotban jutott az extraktorba. Mielőtt a CO₂ bekerült a tartályba, fel kellett melegítenem az extrakció hőmérsékletére, ami az én méréseimnél minden esetben 40 °C volt. Az extraktorban a drog oldható anyagai feloldódtak a szuperkritikus állapotú folyadékban.

Az extrakciót követően az oldott anyagokat tartalmazó szuperkritikus folyadék egy nyomáscsökkentő szelepen keresztül jutott az első szeparátorba (előtte egy kicsit fel kell melegíteni, hogy a nyomás csökkenése miatt be ne fagyjon a vezeték), ahol 40 bar nyomást és - termosztát segítségével- közel 20 °C hőmérsékletet állítottam be. Ezáltal az eddig szuperkritikus állapotú oldószer gáz halmazállapotúvá vált és az extraktum (nagyobb sűrűsége miatt) kiválhatott.



11. ábra: félüzemi méretű szuperkritikus extrakciós berendezés folyamatábrája

A két szeparátornak akkor van jelentősége, ha a mintából kinyert extraktumot frakcionálni szeretnénk -a hőmérséklet és a nyomás változtatásával- illó és nem illó komponensekre. Én az extraktum teljes mennyiségére voltam kíváncsi, ezért nem volt szükségem a 2. szeparátorra.

A szeparátorban összegyűlt extraktumot 20-40 perc időközönként szakaszosan vettem el, majd a mennyiségeket összemértem. Az extrakciót addig folytattam, amíg az utolsó elvett és lemért

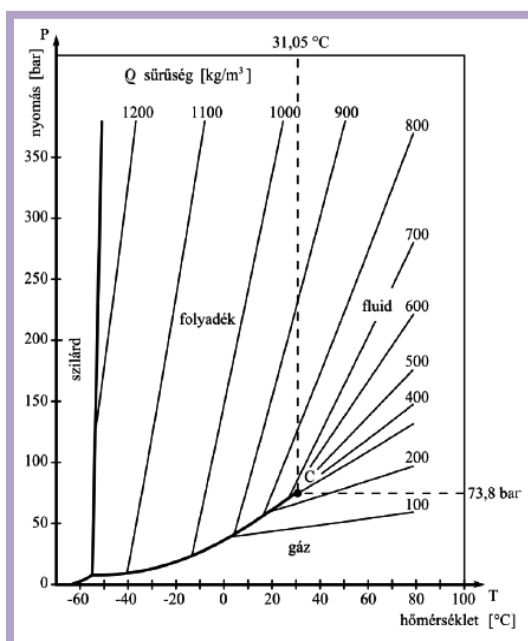
extraktum mennyisége kevesebb lett, mint a bemért mennyiség szárazanyag-tartalomra vonatkoztatott 1%-a. Az oldódási sebesség az idő függvényében csökken, az extrakció kevésbé gazdaságos, néhány óra elteltével - esetemben ez 3,5 óra - az extrakciót le kell állítani.

A hozamokat a bemért szárított növényi részek szárazanyag-tartalma és a kinyert termék mennyiségének ismeretében számítottam ki.

A berendezést nyitott üzemmódban használtam, ezért a CO₂ egy gázórán keresztül a légkörbe jutott. Eközben mértem a térfogatáramát, melynek függvényében meghatároztam a kihozatalt.

A kísérlet során állandóan figyelemmel kell kísérni -egy Micro Motion RFT 9729 digitális mérőműszer segítségével- a következő paramétereket: a szén-dioxid tömegáramát, ami megközelítően 7 kg CO₂/h volt; az oldószer áthaladása során annak hőmérsékletét (°C), a CO₂ sűrűségét (kg/m³), ami 1,92 kg/m³ volt; a CO₂ össztömegét (kg), hogy egy bizonyos idő alatt mekkora mennyiségű CO₂ ment át.

A 12. ábrán a CO₂ nyomás-hőmérséklet állapotdiagramja látható. A szaggatott vonallal határolt területen belül fluid állapot van. Az általam alkalmazott 40 °C hőmérsékleten és 100 – 450 bar nyomás értékeken a CO₂ minden esetben fluid állapotú.

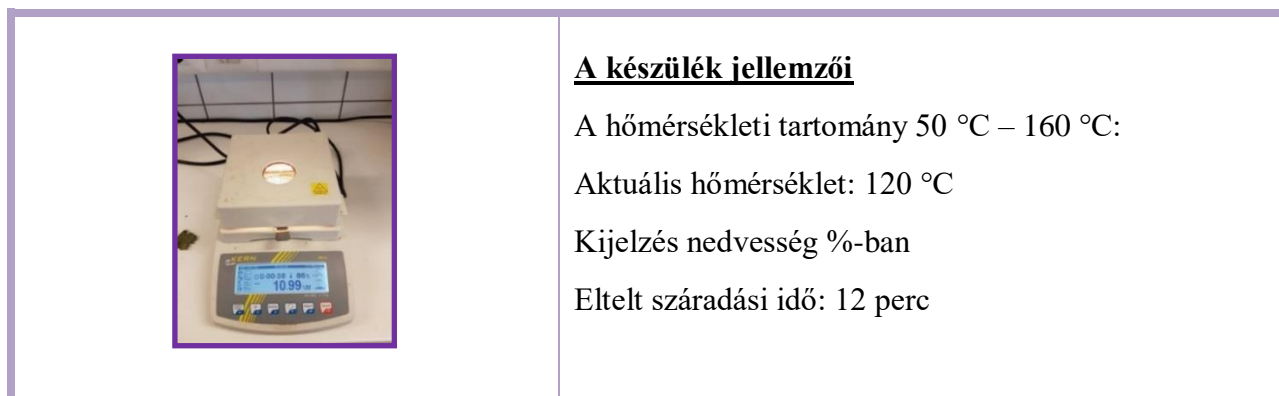


12. ábra: a CO₂ p-T állapotdiagramja (SZÉKELY 2012)

A következő részben elsőként a minden mérési eredmény kiértékeléséhez elengedhetetlenül szükséges módszereket kívánom bemutatni, majd az analitikai mérésekhez kapcsolódó vizsgálatokat tárgyalom, ezután kerül sor a mikrobiológiai módszerek rövid bemutatására.

3.3.6. Szárazanyag-tartalom meghatározása

A minták szárazanyag-tartalmának meghatározását kétféleképpen, az egyes mérésekhez éppen rendelkezésre álló készülékek segítségével végeztem el. Szárítószekrényben 105 °C-on 24 órán keresztül a szuperkritikus- és a Soxhlet extrakció előtt, KERN MLS 50-3HA160 gyorsnedvességmérővel egyszerű egyszeri extrakció előtt. (13. ábra). Az eredményeket szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva, szá %-ban adtam meg.



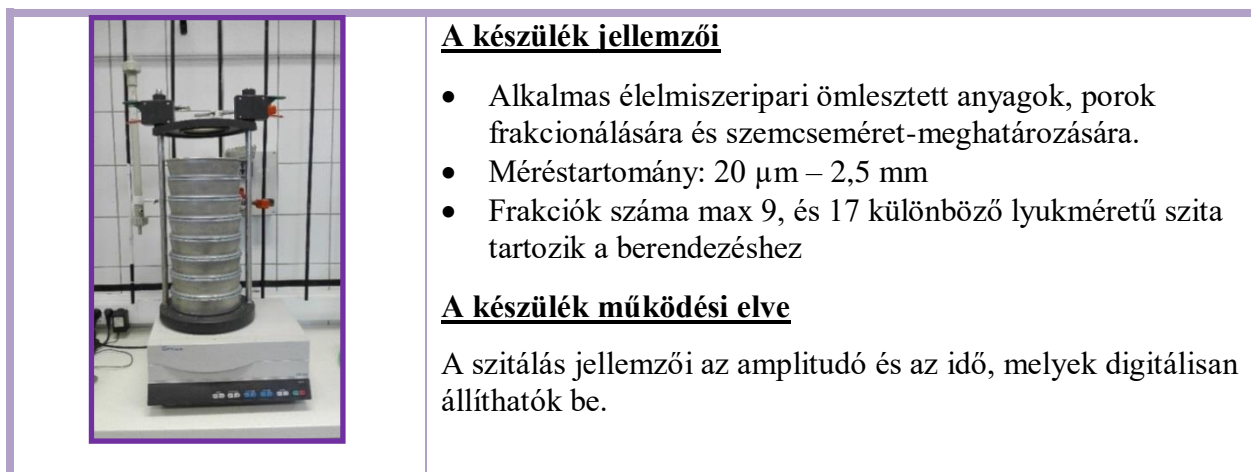
13. ábra: KERN MLS 50-3HA160 gyorsnedvességmérő (Saját fotó)

3.3.7. Szemcseméret meghatározása

Az aprított minták szemcseméretének meghatározása kétféleképpen történt, laboratóriumi szitarázó segítségével, illetve lézer-diffrakciós berendezéssel.

3.3.7.1. Laboratóriumi szitarázóval

Aprítógéppel darabolt mintáim szemcseméretét laboratóriumi szitarázóval határoztam meg (14. ábra). A legfelső szitára 100 g szárított és aprított növényi mintát öntöttem, majd a drogot 20 mm-es amplitudón 8 percig szitáltam. Mindkét minta (levél és gyökér) esetében 3-3 párhuzamos mérést végeztem.

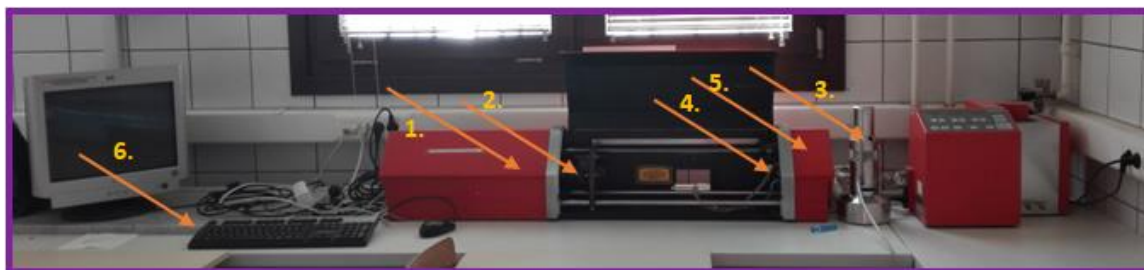


14. ábra: Retsch AS 200 sorozatú laboratóriumi szitarázó (Saját fotó)

A szitaanalízis kiértékelését RRSB (Rosin-Rammler-Sperling-Bennet) diagram segítségével végeztem, az egyes szitákon a szitamaradvány-összeg mennyiségét %-ban a szita lyukméret függvényében ábrázoltam. A görbe segítségével meghatároztam az aprított halmaz átlagos szemcseméretét (x_0 =mm), az egyenletességi tényezőjét (n) és fajlagos felületét (F =m²/kg). A szemcseméret-eloszlásra több modellt is összefoglal ALLEN (1981) cikke, így a Rosin-Rammler-Bennet összefüggést is leírja.

3.3.7.2. Szemcseméret meghatározása lézer-diffrakciós berendezéssel

A rázó-golyós malommal aprított mintáim szemcseméretét lézer-diffrakciós berendezés segítségével állapítottam meg (15. ábra). A képen látható lézer-diffrakció elvén működő részecske mérő általánosan alkalmazható eszköz a folyadékban vagy gázban lévő szuszpenziók, emulziók vagy aeroszolok részecskeméret-eloszlásának meghatározására.



15. ábra: FRITSCH “analysette 22” lézeres részecske mérő (Saját fotó)

A készülék részei: 1. lézertényforrás, 2. fényfeldolgozó optika, 3. diszperziós egység, 4. mintamérő cella, 5. detektor, 6. adatfeldolgozó egység.

A készülék működési elve: “A készülék a hélium-neon lézertényforrás elhajlásának elvén méri a szemcseösszetételt. A lézer diffrakciós elven történő mérés lényege, hogy a mérendő szemcsékre lézertényforrást irányítunk, ennek részleges elhajlása egy jellegzetes, gyűrű formájú intenzitás-eloszlást eredményez a minta mögött, amit egy speciális detektorral mérünk. A szemcseméretet ezen gyűrűk elhelyezkedése alapján határozza meg” (ALBERT 2018).

Számítógépes program segítségével az egyenletességi tényezőt és fajlagos felületet is meghatároztam.

3.4. Extrakciós-, analitikai-, és mikrobiológiai mérési módszerek

3.4.1. Az extrakciók kihazatalainak meghatározása

Az egyszerű egyszeri- és Soxhlet extrakciók során az extraktumokat szárazra pároltam (szuperkritikus extrakciónál erre nem volt szükség), majd megmértem a mennyiségüket.

Az extraktumok szárazra párlása kétféle módon történt: szárítószekrényben, illetve rotációs vákuum bepárló készülék segítségével tömegállandóságig.

A kihozatali értékeket a bemért mennyiség %-ban adtam meg a következő képlet alapján:

$(\text{Extraktum mennyisége} * 100) / (\text{Bemért mennyiség} * \text{a növényi rész szárazanyag-tartalma})$

3.4.2. Analitikai mérések módszerei

3.4.2.1. Az összes polifenoltartalom (TPC) meghatározása

Az összes polifenoltartalom meghatározása SINGLETON & ROSSI (1965) módszere alapján, Folin-Ciocalteu reagens segítségével történt. A módszer lényege, hogy a Folin-Ciocalteu reagensben levő sárga színű Mo(VI) ionok az antioxidánsok (redukáló tulajdonságú) hatására kékszínű Mo(V)-té redukálódnak, mely spektrofotometriásan 765 nm-en mérhető. A módszer előnye, hogy gyors, könnyen elvégezhető és olcsó. Hátránya, hogy a mérés nem fiziológiás pH-n, hanem lúgos pH-n (pH=10) történik, nem szelektív a polifenolos komponensekre, hiszen például az aszkorbinsav is redukálja a reagenst, így ezt a módszert is sorolhatjuk az antioxidáns kapacitást meghatározó módszerek közé (APAK et al. 2007). Az eredményeket galluszsavból készült kalibrációs görbe segítségével mM galluszsav egyenérték (GSE)/g szá-ban adtam meg.

3.4.2.2. Antioxidáns kapacitás meghatározása FRAP módszerrel

A FRAP módszer kidolgozása BENZIE & STRAIN (1996) nevéhez fűződik. Lényege, hogy a ferri-ionok (Fe^{3+}) az antioxidáns, redukáló tulajdonságú vegyületek hatására ferro-ionokká (Fe^{2+}) redukálódnak, melyek alacsony pH-n (pH 3,6) a tripiridil-triazinnal (TPTZ) komplexet képezve kék színű terméket adnak, mely 593 nm-en fotometrálnak. A módszer előnye, hogy viszonylag olcsó, könnyen kivitelezhető és gyors. A módszer hátrányai közé sorolható, hogy a mérés nem fiziológiás pH-n történik, vannak olyan komponensek, melyekre nem érzékeny és egyes komponensek reakció ideje hosszabb, mint a módszernél használt 5 perc (APAK et al. 2007). Az eredményeket aszkorbinsavból készült kalibrációs görbe segítségével μM aszkorbinsav egyenérték (ASE)/g szá-ban adtam meg.

3.4.2.3. Antioxidáns kapacitás meghatározása DPPH gyök megkötésén alapuló módszerrel

Az aktivitás mérésének alapját az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) gyök 517 nm-en történő detektálása képezi (BLOIS 1958). A DPPH gyök viszonylagos stabilitása révén megbízhatóan fotometrálnak, melynek abszorbancia maximuma 517 nm-nél jelentkezik. Az analitikai

reakcióban a molekula H-atomok jelenlétében (melyet a vizsgálandó H-donor aktivitással rendelkező vegyületek szolgáltatnak) könnyen protonálódik, mely folyamat eredményeként az abszorbancia csökken.

A mérés előnye, hogy gyors, egyszerű, reprodukálható, és a kereskedelmi forgalomban kapható gyök igen stabil (PRIOR & CAO 1999). Hátránya, hogy a módszer egy a természetben nem létező, mesterséges szabadgyököt használ, mely a szervezetünkben fellelhető szabadgyökökre nem jellemző. A kis molekulák -a jobb hozzáférhetőség miatt- nagyobb *in vitro* antioxidáns kapacitást mutatnak. Az antocianinok (520 nm) zavarják az alkalmazott hullámhosszon a mérést (APAK et al. 2007). Az eredményeket a gyök 50%-os gátlásához tartozó koncentrációval fejeztem ki, amit a troloxból készült kalibrációs görbe segítségével határoztam meg.

3.4.3. A flavonoidok meghatározása HPLC-vel

3.4.3.1. Mintaelőkészítés

A felsorolt sztenderdekből: pirokatekin, kvercetin, kvercitrin, rutin, katekin, epikatekin, klorogénsav, fahéjsav, dihidro-benzoésav, sziringinsav, vanilinsav, ellágsav, 0,5 mg/ml-es metanolos oldat készült.

Mintaként az egyszerű egyszeri, mikrobiológiai mérésekhez készült már centrifugált és szűrt tiszta kivonatokat használtuk, ezt injektáltuk a HPLC oszlopra. Az eredményeket $\mu\text{g/g}$ -ban adom meg.

3.4.3.2. HPLC-s mérési módszer

A *flavonoid profil* meghatározása (SZIE, KTK) WATERS High Performance Liquid Chromatograph (Waters Co., 34 Maple Street, Milford, MA, USA) készülékkel történt.

A készülék részei: biner pumpa beépített gázmentesítővel (1525), oszloptermosztát, autosampler (717 plus), detektor: két hullámhosszon működtethető spektrofotometriás detektor (2487 Dual λ), software: EMPOWERTM2, oszlop: KINETEX C18, 150 \times 4.6 mm, 2.6 μm szemcseméret.

Működési körülmények:

1. Mozgó fázis összetétele: A: $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{H}_3\text{PO}_4=940:50:1$, B: MeOH
2. Gradiens: 0-30 min: A 100%-10%,
30-30.1min: A 10%-100%,
30.1-31: A 100%
3. Áramlási sebesség: $1\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$
4. Oszlophőmérséklet: 40 °C
5. Nyomás: 4200 \pm 10 psi 40 °C-nál (1000psi=68,9 bar)

6. Futtatás ideje: 22 perc
7. Injektált térfogat: 20 µl,
8. Injektor hőmérséklete 5 ° C
9. Detektálás: 10 pt/sec mintavételi sebességgel

Minden esetben öt ismétlést végeztem. A statisztikai értékelés a PASW STATISTICS 18.0. segítségével történt. A homogén csoportok szétválasztását egyváltozós analízissel, Duncan teszttel végeztem. A meghatározás RSD értéke 5% (n=5) volt, EMPOWER™2 software-rel.

A rutin és a kvercetin mennyiségi meghatározása HPLC-vel (MTA TTK) történt.

A készülék típusa: Mass Spectrometer SCIEX 3200Q TRAP

Oszlop: SBC8-as oszlop, Agilent 250*4,6 mm, szemcseméret 5 mikron

Eluens 0,1% hangyasav vízben, illetve 0,1% hangyasav acetonitrilben

Standard: rutin és kvercetin

Áramlási sebesség 1 ml/perc, a minta mennyisége 10 µl.

Koncentráció sorozat: 5, 50, 500, 5000, 50000 ng/ml.

Módszer: házilag kidolgozott módszer

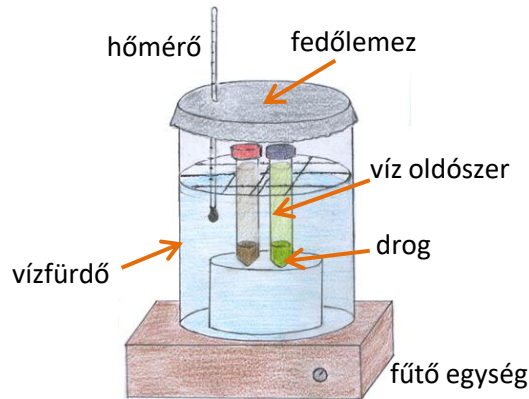
Az alkalmazott program: Analyst 1.6.2 Software Release Notes – Sciex program.

3.4.4. Mikrobiológiai vizsgálati módszerek

Kísérleteim során a nagy csalán (*Urtica dioica* L.) szárított és golyós malommal porított leveléből és gyökeréből egyszerű egyszeri extrakcióval készült vizes és etanolos kivonatainak antimikrobás hatását vizsgáltam. A csalán részeket a növény két fenológiai fázisában (áprilisban és szeptemberben) gyűjtöttem. Két kísérlet sorozatnál vizsgáltam a rutin és kvercetin antimikrobás hatását is. Végeztem mérést arra vonatkozóan, hogy van-e eltérés a frissen szedett és szárított növényből készült extraktum, valamint ugyanezen, de több hónapja fagyaszttóban tárolt extraktum antimikrobás hatása között.

3.4.4.1. Növényi extraktum- valamint a rutin- illetve kvercetin oldatának elkészítése

Az extrakciót 50 ml-es centrifugacsőben végeztem a 16. ábrán látható módon. A növényi keverékek koncentrációja 100 mg/ml volt.



16. ábra: egyszerű egyszeri extrakció megvalósítása mikrobiológiai vizsgálatokhoz

Az extrakciót illetve a kivonatok előkészítését a 3.3.3.2 fejezetben leírtak alapján végeztem el.

Ugyanazzal a mintával az extrakciót ugyanazon körülmények között még egyszer vagy többször is megismételtem, és a vizsgálatok során kapott adatokat átlagoltam.

Szakirodalmi adatok több polifenolos vegyület antimikrobás hatásáról is beszámolnak. SOVA (2012) a fahéjsavval, QIAN és munkatársai (2019) a vanília savval, MA és munkatársai (2019) a katekinnel végeztek kísérleteket, de a hatás nagy valószínűséggel vegyület-csoportoknak köszönhető. Kísérleteim során kontrollként én a rutin és a kvercetin mikroba gátló hatását vizsgáltam, mert a szakirodalom leggyakrabban ezt a két vegyületet teszi felelőssé az antimikrobás hatásért (BOBIS et al. 2015), a vélemények viszont ellentmondásosak. A kvercetinél valóban találtak hatást, (JAISINGHANI 2017), de rutin esetében megoszlanak a vélemények.

A kísérletekhez rutinból 2 mg/ml koncentrációjú etanosol törzsoldatot készítettem. A kvercetint DMSO-ban oldottam, és ugyancsak 2 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettem belőle. A törzsoldatokból mikrobiológiai vizsgálatainkhoz további steril desztillált vizes hígítással 40 µg/ml, 20 µg/ml és 10 µg/ml koncentrációjú oldatokat készítettem.

3.4.4.2. Mikrobiológiai vizsgálat

Alkalmazott mikroorganizmus törzsek:

Élesztő törzsek: *Candida albicans* MVH, *Candida glabrata* MVH, *Candida parapsilosis* MVH, *Saccharomyces cerevisiae* S288

Baktériumok: *Enterococcus faecalis* T1, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria innocua* CCM 4030, *Listeria monocytogenes* CCM 4699, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* T1

Az alkalmazott táptalajok

Az élesztők tenyésztéséhez YPG (Yeast extract-Peptone-Glucose) táptalajt, a baktériumokhoz pedig TGY (Tryptone-Glucose-Yeast extract) táptalajt alkalmaztam.

YPG táptalaj összetevői: pepton 0,5%, glükóz 1%, élesztőkivonat 0,5%, agar 1,5%

TGY táptalaj összetevői: tripton 0,5%, glükóz 0,1%, élesztőkivonat 0,25%, agar 1,5%

A táptalajok összetevőit, a rutint és a kvercetint valamint az alkalmazott vegyszereket a Sigma Aldrich Kereskedelmi Kft-től szereztük be.

Gátlóhatás vizsgálata agarlyuk diffúziós módszerrel

A gátló hatást agarlyuk diffúziós módszerrel vizsgáltam a következők szerint: 9 cm átmérőjű műanyag Petri-csészékbe 20 ml, az adott mikroorganizmusoknak megfelelő tápközeget mértem, majd szilárdulás után ezeken 1 ml 10^7 sejt/ml (24 órás) sejtsuszpenziót szélesztettem el. A felesleget pipettával szívtam le, majd a felületet steril fülke alatt szárítottam le. A tápközegekbe steril dugófűrő segítségével 8 mm átmérőjű lyukakat fűrtam és a lyukakba 150 μ l vizsgálandó mintát pipettáztam steril körülmények között. A csészéket egy éjszakára hűtőszekrénybe (4 °C) tettem azért, hogy az extraktumok komponensei a táptalajba diffundáljanak. Ezt követően az élesztőket 30 °C-on, a baktériumokat 37 °C-on inkubáltam 48 órán keresztül. A lyukak körül kialakult zónák átmérőjét lemértem és mm-ben adtam meg. A gátlóhatást aszerint is értékeltem, hogy a zóna feltisztult volt-e (teljes gátlás) vagy pedig a zónán belül kismértékű szaporodás történt-e (részleges gátlás).

A statisztikai kiértékelést a fenológiai fázis hatásának vizsgálata során IBM SPSS Statistics 25.0 programmal egytényezős varianciaanalízissel, ANOVA teszttel végeztem. A szórásokat minden egyes minta, oldószer, és extrakciós módszer esetén 6 párhuzamos mérés alapján határoztam meg. Az oszlopdiagramokon látható „a”, „b”, „c” és „d” betűk az ábrázolt értékek közötti szignifikancia különbségre utalnak. Az azonos betűk azt jelentik, hogy az átlagértékek (oszlopok magassága) nem különbözik egymástól szignifikánsan. A varianciaanalízis teljes polifenoltartalomra vonatkoztatott részeredményeit friss levél esetében példaként a mellékletben közlöm.

4. Eredmények

Először azokat az eredményeket ismertetem, amelyek adatai megjelennek/szükségesek a kísérletsorozat további eredményeinek kiértékelésénél, ilyenek a szárazanyag-tartalom, szemcseméret, kihozatali értékek.

Miután kezdeti céljaim egyike a csalán felhasználhatóságához kapcsolódóan -az előkísérleteknél és a további kísérleteknél is- a mikrobiológiai hatáshoz kapcsolódó ismeretek megszerzése volt, ezért eredményeimet ezek bemutatásával folytatom, melyeknek fontos szerepe van az eredmények alakulásában/értékelésében.

A kísérletek szerteágazósága miatt egy-egy csoportba teszem az azonos kísérlethez tartozó összes eredményt, így az összefüggések jobban láthatók.

4.1. Az előkészítő műveletek és extrakciók eredményei

4.1.1. Szárazanyag-tartalom meghatározása

Munkám első lépéseként meghatároztam a friss és szárított csalángyökér és levél szárazanyag-tartalmát (4. táblázat.)

4. táblázat: a csalán növényi részeinek szárazanyag-tartalma %-ban kifejezve

	Levél	Gyökér
Friss	18,25±0,84	22,90±0,90
Szárított	90,80±0,02	91,07±0,08

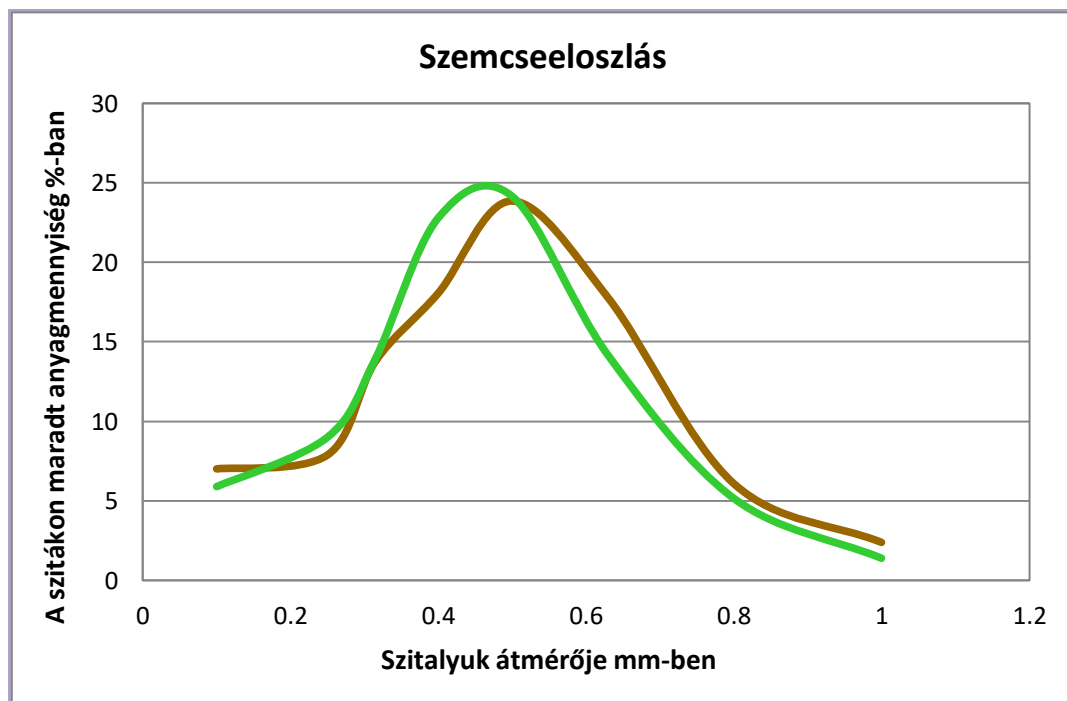
A 4. táblázatból látszik, hogy a gyökér szárazanyag-tartalma a friss, és a szárított minták esetében is nagyobb, mint a levélé, de az eltérés csak 1% körüli. Ugyanakkor megállapítható, hogy a szárított minták szárazanyag-tartalma rendre 4-, illetve 5-szöröse a friss mintákénak. A későbbiekben az összehasonlíthatóság miatt minden eredményt szárazanyag-tartalomra átszámítva adok meg.

Az előkészítő műveletek során a csalán levelét és gyökerét laboratóriumi késes aprítóval daráltam, majd az aprított mintákat szitaanalízissel elemeztem. A golyós malommal tovább őrölt minták szemcseméretét, egyenletességi tényezőjét és fajlagos felületét lézeres részecskemérővel vizsgáltam. A finom őrlésre mikrobiológiai vizsgálataim miatt volt szükség. Célom az volt, hogy -az extraktumok készítése előtt- az értékes hatóanyagok hozzáférhetősége miatt a részecskeméret csökkentésével még jobb kioldást érjek el.

4.1.2. Szemcseméret meghatározása

4.1.2.1. Szemcseméret meghatározása szitaanalízissel

Az aprított gyökér-, és levélminták szemcseeloszlását a 17. a ábra mutatja. A gyökér (barna színnel jelölt) és a levél (zöld színnel jelölt) szemcseeloszlását bemutató görbe szinte azonos lefutást mutat. A jellemző szemcseméret 0,5 mm körüli, pontos értékét RRSB (Rosin-Rammler-Sperling-Bennet) diagram segítségével határoztam meg és a következőkben ismertetem. A gyökér szemcseeloszlása kevésbé egyenletes, mint a levélé, ami feltehetően az anyag szerkezetében való különbségnek tudható be. Erre a feltételezésre utal a következő diagram, amely a szitákon maradt anyagmennyiség százalékos arányát mutatja meg a szemcseeloszlás függvényében (17. ábra).



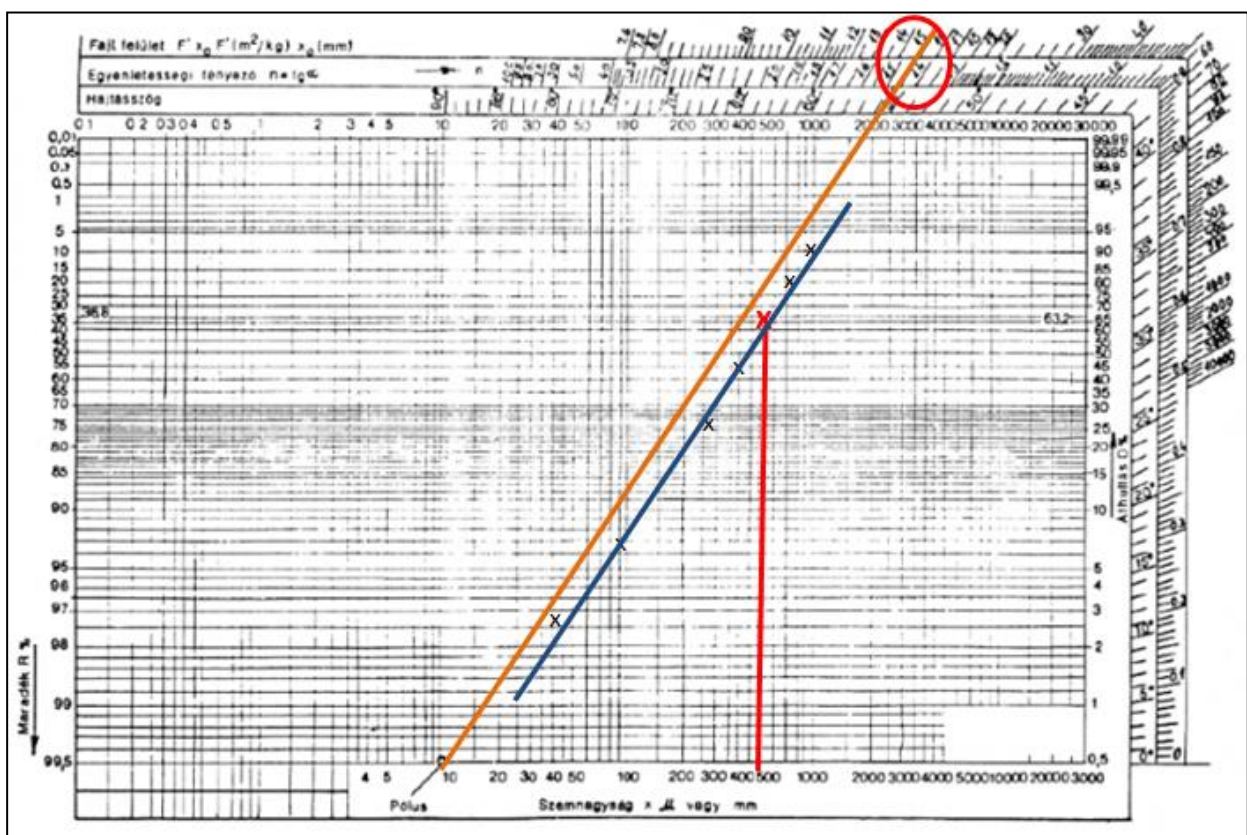
17. ábra: a laboratóriumi aprítóval aprított csalángyökér és levél szemcseeloszlása %-ban (a barna vonal a gyökérre, a zöld vonal a levélre vonatkozik)

A szitanalízis eredményei alapján az aprított drog szemcseeloszlását a Rosin-Rammler-Sperling-Bennet (RRSB) által kidolgozott szemcseeloszlási függvénnyel modelleztem:

$$R(x) = 100 \exp[-(x/x_0)^n]$$

ahol $R(x)$ - szitamaradvány-összeg (%)
 x - szemcseméret (mm)
 x_0 - jellemző szemcseméret (mm)
 n - egyenletességi tényező (-)

A fenti képlet grafikus megjelenítésére kidolgozott diagramba berajzolhatók az $R(x) \sim x$ összetartozó mérési pontok, amik egy egyenesen fekszenek (18. ábra) és leolvashatók az x_0 jellemző szemcseméret és az n egyenletességi tényező. Kiegészítésként az ábra feltünteti az F fajlagos felület és x_0 szorzatát $F \cdot x_0$ (m^2/kg) * (mm) dimenzióban.



18. ábra: a csalánygyökér szemcseméretének meghatározása RRSB diagram segítségével

Az diagramokról leolvastam az aprított halmaz átlagos szemcseméretét x_0 (mm), egyenletességi tényezőjét n (-) és fajlagos felületének x_0 -lal vett szorzatát $F \cdot x_0$ (m^2/kg)*(mm). A diagramokról leolvasható és az abból származtatható eredményeimet a 5. táblázatban ismertetem.

5. táblázat: az aprított minták szemcsemérete, valamint a halmaz egyenletességi tényezője és fajlagos felülete szitaanalízissel meghatározva

	x_0 (mm)	n	F (m ² /kg)
Levél	0,45	1,45±0,01	33,33±0,01
Gyökér	0,50	1,41±0,10	32,72±4,80

Mérési eredményeim csalán levél esetében nem mutatnak szórást, és a három párhuzamos érték egymástól való eltérése csalán gyökér esetében is minimális. Eredményeim alapján megállapítható, hogy a csalán levél (0,45 mm), és a gyökér (0,50 mm) szemcsemérete közel esik egymáshoz. A két halmaz egyenletességi tényezője és fajlagos felülete is közel egyenlő. Az egyenletességi tényező az RRSB diagram skálája alapján közepesnek mondható, amiből azt a következtetést lehet levonni, hogy az anyag zöme közepes szemcsenagyság-közön oszlik el. Részeredményeimet a mellékletben mutatom be. Az adatokra mikrobiológiai kísérleteim miatt volt szükségem, ugyanis meg akartam határozni, hogy a késes darabolás után golyósmalommal tovább aprítva a növényi részeket milyen mértékű szemcseméret-csökkenés érhető el (a növény sejtfalát a nagyobb mértékű aprítás jobban megtöri).

4.1.2.2. Szemcseméret meghatározása lézeres részecske mérővel

A lézeres részecske mérővel a laboratóriumi aprítóval vágott, majd golyós malommal tovább őrölt mintáim (szárított levél és gyökér) szemcseméretét (x_0), valamint a halmaz egyenletességi tényezőjét (n) és fajlagos felületét (F) is meghatároztam (6. táblázat) számítógépes programmal (FRITSCH, Program "analyse 22").

6. táblázat: aprított mintáim szemcsemérete, illetve a halmaz egyenletességi tényezője és fajlagos felülete lézeres részecske mérővel (FRITSCH) meghatározva

	x_0 (mm)	n	F (m ² /kg)
Levél	0,04±0,001	3,05±0,16	359,37±3,42
Gyökér	0,15±0,001	1,18±0,02	119,46±0,27

Értékeim alapján (5. és 6. táblázatok) megállapítható, hogy gyökérminták esetében a golyós malommal folytatott darabolás után a szemcseméret közel 1/3 része lett a laboratóriumi aprítóval daráltnak. A csalán levele esetében már jelentősebb eltérést tapasztaltam, a finom halmaz szemcsemérete kb. 1/10-ed része lett a szitaanalízissel meghatározottnak.

4.1.3. Extrakciós kihozatalok eredményei

Extrakciós eredményeim bemutatását a mikrobiológiai mérésekhez kapcsolódó extrakciós eljárással kezdem.

Első kísérleteim a csalán leveléből és gyökeréből készült extraktumok **kihozatalának** mennyiségi meghatározására irányultak. Lehetőségeim **háromféle extrakciós módszer** alkalmazását tették lehetővé: az egyszerű egyszeri extrakciót, a Soxhlet extrakciót, és a modern szuperkritikus extrakciót, melyek során több paramétert is megváltoztattam azért, hogy a fogyasztó számára egészségmegőrzésben is szerepet játszó hatású kivonatokat állítsak elő. Vizsgáltam a **hőmérséklet** (egyszerű egyszeri: 60-80-100 °C), a **nyomás** hatását (szuperkritikus extrakció: 100-450 bar), és az **extrahálási idő** befolyását (egyszerű egyszeri: forrázat és 3 óra) a kihozatal mennyiségére. Mindhárom módszernél vizsgáltam az **extraktumok tömegét**. Az egyes kísérletek/extrakciók során **különböző oldószerek** hatását is kiértékeltem a kihozatalra (szuperkritikus állapotú CO₂, etanol többféle koncentrációban, n-hexán és víz).

4.1.3.1. Az egyszerű extrakciók mérési eredményei

Az egyszerű egyszeri extrakciók kihozatalának eredményeit vizes és alkoholos kivonatoknál szárazanyag-tartalomra átszámítva a 7. és 8. táblázatok szemléltetik. Vizsgálataimhoz a növényi részeket kora ősszel gyűjtöttem, majd szárítottam. Először a **szárított minták** kivonatainak eredményeit mutatom be (7. táblázat).

7. táblázat: a szárított levél és gyökér vizes kivonatainak kihozatali értékei %-ban

Oldószer	Víz			
	Forrázat (tea)	3 óra	3 óra	3 óra
Hőmérséklet	100°C → 25°C	60 °C	80 °C	100 °C
	Kihozatal tömeg %			
Szárított levél	26,69±0,83	33,02±0,30	29,85±0,13	31,13±0,49
Szárított gyökér	14,18±0,87	17,04±1,74	19,41±1,35	21,23±0,29

Az adatokból látszik, hogy a különböző hőfokokon való kihozatal **szárított levél** esetében közel azonosnak vehető, még a 3 órás 100 °C-os extraktum mennyisége is csak 15%-kal nagyobb a teakivonatai mennyiségéhez képest. **Csalángyökérnél** a 100 °C-os 3 órás extrakció eredménye viszont megközelítőleg másfélszeres kihozatalt adott –a tea kivonathoz képest–, ami lehetővé

tette több olyan endogén komponens kioldódását is, ami a későbbiekben a pozitív mikrobiológiai hatást eredményezhette.

A **szárított gyökerek** esetében is a legkisebb extraktum mennyisége a tea készítésekor jelentkezett. Ebben az esetben a hőmérséklet emelése kissé javított a kihozatalon, különösen, ha a 100 °C-nál kapott eredményeket nézzük.

Az **alkoholos** kivonatoknál (8. táblázat) az egyes növényi részekből történő kioldásoknál lényeges különbségek nincsenek, de annyi megállapítható, hogy a levelekből történő kihozatal jobb volt.

8. táblázat: a szárított levél és gyökér alkoholos kivonatainak kihozatali értékei, %-ban

Oldószer	20%-os etanol	70%-os etanol
Extrahálási idő	3 óra	3 óra
Hőmérséklet	szobahőmérséklet	szobahőmérséklet
	Kihozatal %	
szárított levél	20,45±0,77	21,16±0,27
szárított gyökér	15,49±0,31	12,87±0,17

A **friss csalán** gyökeret nem lehetett kellően aprítani laboratóriumi aprítóval, ezért további méréseimet csak friss csalánlevéllel végeztem el, annak aprítását ugyanis meg tudtam oldani laboratóriumi késes berendezéssel. Levélmintáimat ezután keverős duplikátorban extraháltam a száraz mintákhoz hasonló módon.

Problémát okozott még, hogy az alacsonyabb, 60- és 80 °C-os kész extraktumokat a szűrőpapír gyors eltömődése miatt vákuumszűrővel nem tudtam leszűrni, ezért a kihozatalok mennyiségét víz oldószer mellett csak a 100 °C-os extrahálási hőmérséklet és a teakészítés esetében tudtam pontosan meghatározni. A kapott friss levélextraktumok mennyiségét a 9. táblázat mutatja be.

9. táblázat: a friss csalán levelének vizes és alkoholos kioldásainak kihozatali értékei %-ban

Oldószer	Víz	Víz	20%-os etanol	70%-os etanol
Extrahálási idő	Forrázat (tea)	3 óra	3 óra	3 óra
Hőmérséklet	100°C	100 °C	szobahőmérséklet	szobahőmérséklet
	Kihozatal tömeg %			
friss levél	42,25±1,19	48,40±3,20	33,55±2,28	32,63±0,64

Megállapítható, hogy a vizes kioldások kihozatala lényegesen jobb az alkoholnál, ahol az alkohol töménységétől függetlenül szinte azonos értékeket kaptam. Ennek oka valószínűleg az, hogy a mintákban több a vízben oldódó endogén komponens mennyisége.

4.1.3.2. Egyszerű többszöri extrakció

Két alkalommal végeztem egyszerű többszöri extrakciót, mindkét alkalommal 3-3 fokozatban, az egyszerű extrakcióhoz képest összességében háromszoros oldószer mennyiséggel. Egy-egy fokozat 1 óra hosszáig tartott.

- **Egyik** esetben a **csalán szárított levelét** vizsgáltam, és az extrakciót mágneses keverővel ellátott lombikban végeztem. A hőmérséklet 40 °C, az oldószer koncentrációja 50 % etanol volt. Eredményeimet a 10. táblázat mutatja be.
- **Másik** esetben a **csalán szárított gyökerét** vizsgáltam, és az extrakciót keverővel ellátott duplikátorban végeztem 80 °C hőmérsékleten. Az oldószer bidesztvíz volt. Az egyszerű többszöri extrakcióval kapcsolatos kihozatali eredményeimet a 10. táblázat foglalja össze.

10. táblázat: szárított csalán levél és gyökér egyszerű többszöri kioldásának kihozatala %-ban

Oldószer	50% etanol-víz elegy	víz
Extrahálási idő	1 óra 3x	1 óra 3x
Hőmérséklet	40 °C	80 °C
	Kihozatal %	
szárított levél	25,46±0,74	-
szárított gyökér	-	20,45±0,24

4.1.3.3. Soxhlet extrakciók kihozatalinak eredményei

A Soxhlet- és szuperkritikus extrakcióikat a Budapesti Műszaki Egyetemen végeztem, és az volt a célom, hogy három különböző oldószer esetén (etanol, hexán és szuperkritikus állapotú CO₂) összehasonlítsam a szárított csalán gyökér-, és levélből készült extraktumok kihozatalát (melyet szárazanyag-tartalomra átszámítva %-ban adok meg). A Soxhlet extrakció során a csalán gyökeréből és leveléből két időpontban (tavasszal és ősszel) gyűjtött mintákból, tömény etanolos és hexános extrakciókat végeztem az oldószer forráspontján. 14 óra extrakciós idő alatt 4 ciklus történt, a kihozatalok mennyiségét a 11. táblázat mutatja be. Mindegyik kísérletet háromszor ismételt meg.

A vizsgálatokat a tavaszi levelek extrakcióival kezdtem, aminek eredményeiből egyértelműen látszik, hogy a hexános kioldás nagyon gyenge hatásfokú. Ez az észrevétel az őszi mintáknál egyértelművé vált.

11. táblázat: a gyökér és levél 96%-os etanolos és 95%-os hexános Soxhlet extrakciónak kihozatalai %-ban kifejezve

Oldószer	96 % alkohol	95 % hexán
Növényi rész	Kihozatal %	
TAVASZI levél	21,73±1,47	1,94±0,07
ŐSZI levél	18,13±1,57	0,98±0,05
TAVASZI gyökér	7,785±0,47	0,67±0,12
ŐSZI gyökér	14,14±0,34	1,05±0,72

Eredményeim mindkét növényi rész esetében azt mutatják, hogy a kihozatal szempontjából az etanol bizonyult jobb extrahálószernek a hexánnal összehasonlítva, ami nagy valószínűséggel az oldószerek polaritása közötti különbséggel magyarázható. Feltehetően mindkét növényi részben nagyobb mennyiségben vannak jelen a polárosabb vegyületek, melyeknek az etanol a jobb oldószere. Ezt már az egyszerű egyszeri extrakciók kihozatalai is bizonyították a víz és alkohol viszonylatában.

Észrevehető továbbá, hogy a levélminták kihozatala mindkét oldószer esetében nagyobb, mint a gyökér mintáké, ami a levélmintákban nagyobb mennyiségben előforduló, és alkoholban jobban oldódó komponenseknek tudható be. Megállapítható ezen kívül, hogy míg a leveleknél az alkoholban oldódó komponensek mennyisége csökken a vegetáció előrehaladtával, addig a gyökerek esetében ez növekedést mutat mindkét oldószer esetében. Ezek az eredmények a növényben zajló másodlagos anyagcsere-folyamatok során termelődő -főleg polifenolos vegyületeknek- köszönhető, illetve ezen vegyületek felhalmozódásának a vegetáció különböző időszakában.

Mindezeket az elképzeléseket/feltevéseket a későbbiekben egy másik kísérlettel egyértelműen alá tudom támasztani.

4.1.3.4. Szuperkritikus fluid extrakciók kihozatalinak eredményei

A szuperkritikus extrakciót is elvégeztem mindkét növényi résszel. A **gyökér** extrakciója során a **nyomás** hatását vizsgáltam az extrakciós kivonatokra 100 bar és 450 bar között. **Levél** mintáim szuperkritikus extrakcióját 450 bar nyomáson végeztem (annak ellenére, hogy a leggazdaságosabb extrakciós nyomás 300 bar), mert az volt a célom, hogy a két növényi rész legnagyobb kihozatalának eredményeit hasonlítsam össze.

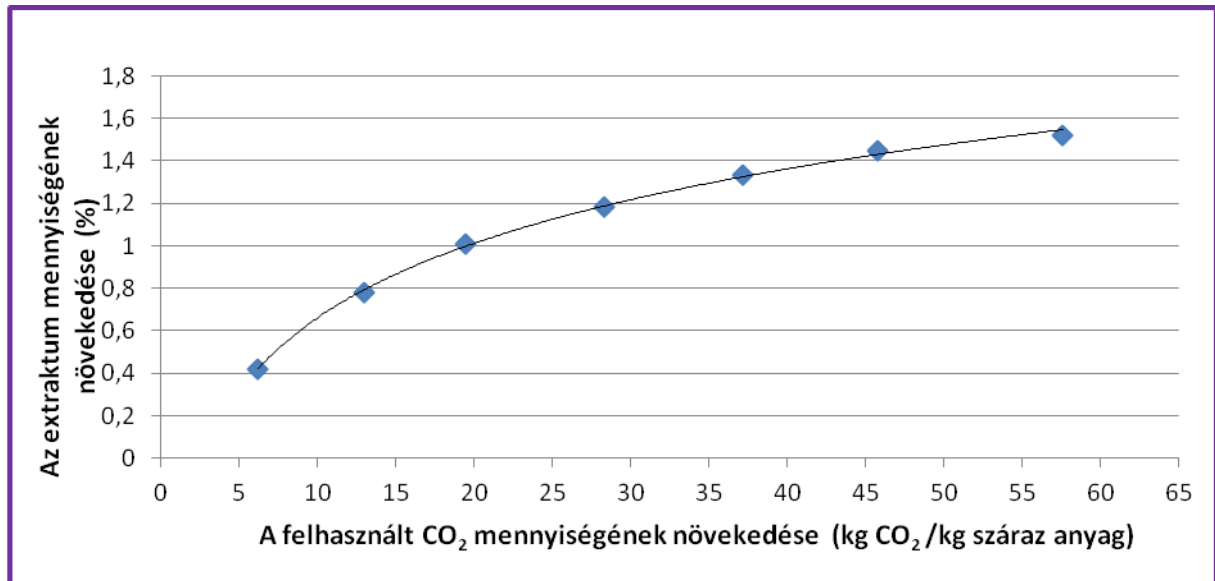
Dolgozatomban először levélmintáim kihozatalainak eredményét ismertetem, 450 bar nyomáson bemutatva a szuperkritikus extrakciós részeredményeket is. Első lépésként a berendezésről leolvasott paramétereket mutatom be a 12. táblázatban, szemléltetve hogyan jutottam el a maximális kihozatalhoz és az ehhez felhasznált CO₂ mennyiséghez.

A CO₂ fogyás a CO₂ palack térfogatához (CO₂ mennyiségéhez) igazodik. Egy palackkal kb. 6 mérést akartam elvégezni, ezért –a tapasztalat alapján– 25-35 perces időközönként kellett leállítani az extrakciót, majd feljegyezni a felhasznált CO₂- és kapott extraktum mennyiségét. A folyamat elején kevesebb CO₂ is elegendő volt ugyanannyi hatóanyag kioldásához, de később ez a mennyiség növekedett. Extrációm a 7. lépés után fejeztem be, mert ekkor már annyira lecsökkent az adott fokozatban kapott végtermék mennyisége, -17 perc alatt mindössze 0,069% volt-, ezért az extrakció folytatásának nem volt további értelme.

12. táblázat: a levél extraktum kivonat mennyiségének növekedése a szén-dioxid felhasználás függvényében 450 bar nyomáson és 40 °C hőmérsékleten

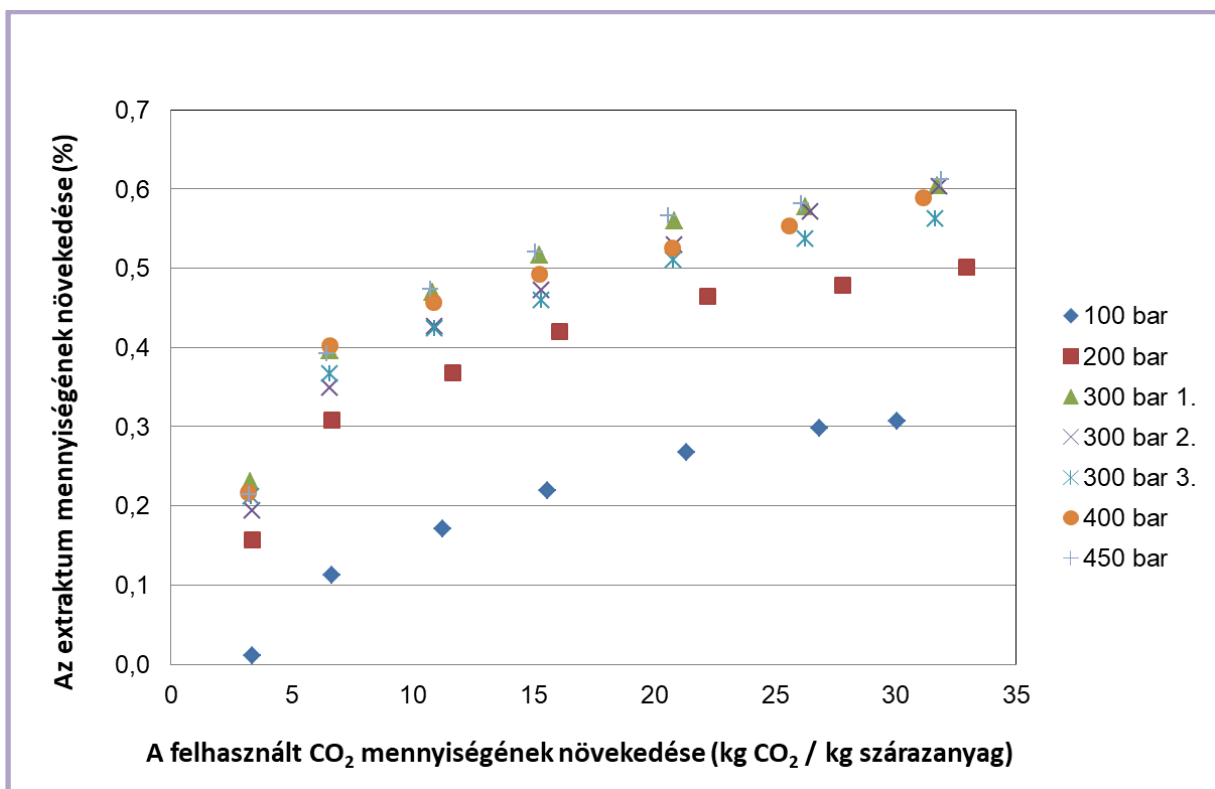
Mérések lépései	Idő perc	Extraktum mennyisége fokozatonként kg	Extraktum mennyisége fokozatonként %	Extraktum mennyisége az adott fokozatig %	CO ₂ mennyisége az adott fokozatig kg CO ₂ /kg sza
1.	26	1,92*10 ⁻³	0,418	0,418	6,207
2.	30	1,67*10 ⁻³	0,363	0,781	12,989
3.	26	1,06*10 ⁻³	0,230	1,011	19,457
4.	35	0,8*10 ⁻³	0,175	1,186	28,289
5.	35	0,69*10 ⁻³	0,150	1,336	37,133
6.	20	0,52*10 ⁻³	0,113	1,449	45,791
7.	17	0,32*10 ⁻³	0,069	1,518	57,583

Eredményeimet grafikus formában is megadom (19. ábra), annak szemléltetésére, hogy a CO₂ növekvő mennyiségére kapott tendencia a későbbiekben bemutatott gyökér-eredményekhez hasonlóan alakul és az is egyértelműen látható, hogy a kivonat mennyisége a CO₂ fogyasztásával egyre kisebb mértékben növekszik, ellaposodik a görbe.



19. ábra: szárított csalán levélből készített extraktum mennyiségének növekedése a felhasznált CO₂ mennyiségének függvényében 450 bar nyomáson és 40 °C-os hőmérsékleten

A **gyökér** droggal végzett extrakciók során a nyomás hatását vizsgáltam az extrakciók kihazatalának mennyiségére. Eredményeimet a 20. ábrán mutatom be.



20. ábra: a gyökérdrog-extraktum kihazatalának növekedése a nyomás emelésének hatására

A csalángyökérrel végzett szuperkritikus extrakciós eredmények alapján megállapítható, hogy a nyomás növelésével -100 bar-ról 450 bar-ra- a kihozatal mennyisége fokozható.

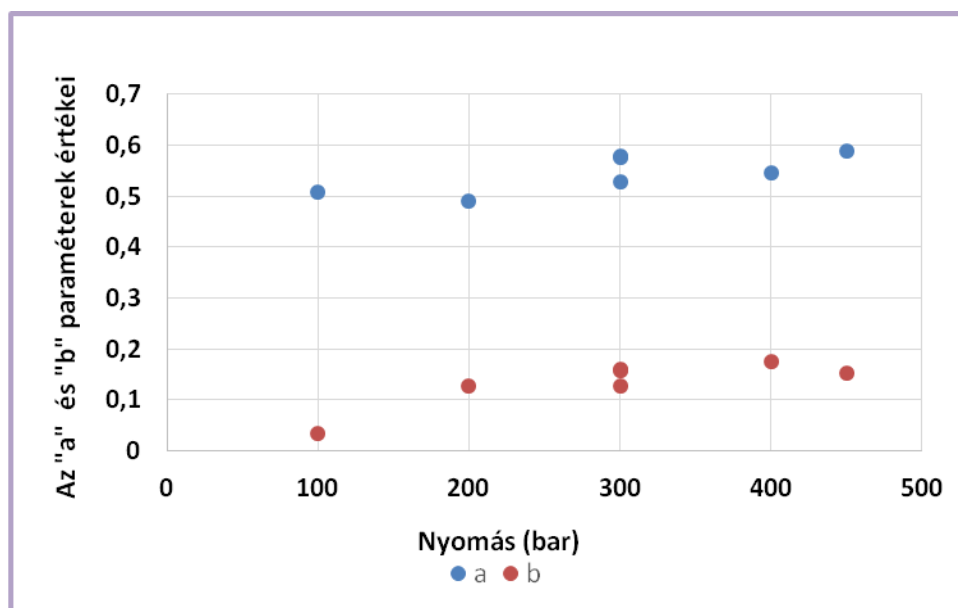
A 100 és 200 bar között a kihozatal 63 %-os növekedést mutatott, míg ez az érték 200 barról 300 barra törtrénő emelésnél már csak 18 % volt. A nyomás további növelésével jelentős növekedés már nem volt elérhető. A 20. ábra görbéi telítési értékhez tartanak. Ennek oka lehet az, hogy a folyékony CO₂ nem képes a további komponensek kioldására, a kioldandó anyagok kötött állapotban maradnak.

A 20. ábra mért pontjait az

$$m_{\text{extraktum}} = a * (1 - e^{-bx})$$

összefüggéssel lehet közelíteni, ahol „a” és „b” konstansok. A közelítő számításokra az Excel Solver funkcióját használtam. Az „a” és „b” paraméterek értékei az egyes alkalmazott nyomásoknál a 21. ábrán láthatóak.

A leírt egyenlet bal oldala, azaz az „m_{extraktum}” növekszik, ha mind az „a”, mind a „b” értéke növekszik. A 21. ábra alapján az „a” paraméter a nyomás növelésével kismértékű növekedést mutat. A „b” paraméter viszont a 300 bar nyomást elérve számottevően nem nő, sőt 450 bar nyomásnál már csökken.



21. ábra: a gyökérdrog-extraktum kihozatalának növekedését a nyomás emelésének hatására leíró görbék egyeneleteinek paraméterei

Az előbbiek alapján az extrakció elvégzéséhez a 300 bar nyomást választottam. Egyrészt azért, mert az extraktum növekedése elenyésző volt amikor a nyomást 300 bar-ról 400 bar-ra növeltem, másrészt azért, mert a kísérlet költségeit nagyon megemeli a nyomás értékének növelése.

Következtetesképpen elmondható, hogy a csalán-gyökér szuperkritikus extrakciójánál 40 °C extrakciós hőmérséklet mellett a kihozatal szempontjából a 300 bar nyomás alkalmazása a legmegfelelőbb.

Összességében megállapítható (19. és 20. ábra), hogy a csalán leveléből 450 bar nyomáson és 40 °C-os hőmérsékleten több mint kétszeres mennyiségű extraktum nyerhető, mint a csalán gyökeréből ugyanilyen paraméterek beállítása mellett.

Az egyszerű extrakciók extraktumainak mennyiségeit a szuperkritikus- és Soxhlet extrakciók eredményeivel összefoglalva a 13. táblázatban mutatom be, a Soxhlet extrakciók esetén a tavaszi gyűjtésű mintákat sárga színű háttérrel, az őszi mintákat rózsaszín háttérrel jelöltem.

13. táblázat: a vizsgált extrakciók kihozatalának mennyiségei eltérő oldószerek, növényi részek és hőmérsékleti értékek esetén %-ban kifejezve

Oldószer	Növényi minta		
	Kihozatal %		
	Szárított gyökér	Szárított levél	Friss levél
szuperkritikus CO ₂ (100 - 450 bar)	0,32 - 0,61	1,11 - 1,52	-
Soxhlet n-hexán	0,67±0,12	-	-
Soxhlet n-hexán	0,77±0,04	1,94±0,07	-
Soxhlet etanol 96%	7,78±0,47	21,73±1,47	-
Soxhlet etanol 96%	8,00±0,48	18,13±1,57	-
etanol 20% egyszerű egyszeri	15,49±0,31	20,45±0,77	33,55±2,28
etanol 70% egyszerű egyszeri	12,87±0,17	21,16±0,27	32,63±0,64
víz forrázás egyszerű egyszeri	14,18±0,87	26,69±0,83	42,25±1,19
víz 60°C 3 óra egyszerű egyszeri	17,04±1,74	33,02±0,30	-
víz 80°C 3 óra egyszerű egyszeri	19,41±1,35	29,85±0,13	-
víz 100°C 3 óra egyszerű egyszeri	21,23±0,29	31,13±0,49	48,40±3,20
etanol 50% egyszerű többszöri	-	25,46±0,74	-
víz 80°C 3 óra egyszerű többszöri	20,45±0,24	-	-

Összegzésképpen a műveletek tanszékeken végzett kísérleti eredmények alapján megállapítható:

- A **hőmérséklet** emelése 60 °C-ról 80 °C-ra majd 100 °C-ra sem a szárított csalán levél sem a szárított csalán gyökér víz oldószerrel készült extraktumainak kihozatalára nem gyakorolt hatást. Bár szárított gyökérnél egyértelműen látszik, hogy a 3 óra hosszat tartó 100 °C-os extrakció kihozatala a 60 °C-on kapott kivonattól 4,19%-kal, a 80°C-on kapott kivonattól pedig 6,32%-kal nagyobb.
- Az **idő** hatását a kivonat mennyiségére nem vizsgáltam, de készítettem teát a növényi drogokból -az extrakció folyamata a forrázás utáni 24 órás állást jelentette- amit a 3 órán keresztül 60-, 80-, és 100 °C-on történő extrakciókkal össze lehet hasonlítani. A kihozatal a 3 órán keresztül történő extrakciók esetében –hőmérséklettől függetlenül- nagyobb mennyiséget eredményezett. Levél drognál a teához viszonyítva a legkisebb eltérés is 3,16 %-os, amiből egyértelműen látszik, hogy az idő növelésével a kihozatal mennyisége is növelhető. Az eltérés viszont (3,16-6,33 %) nem jelentős. Ez a tendencia gyökér drog esetén is megfigyelhető, de a maximális eltérés -amit a tea és a 3 órán keresztül tartó forrázás közötti kihozatal esetében mértem- csak 7,05 %. Feltehető tehát a kérdés: „érdemes-e a csalán növényi részeit 3 órán keresztül tartó forralásnak kitenni?” A kérdésre az analitikai és mikrobiológiai részben adom meg a választ.
- Az **extrakciós fokozatok** számának növelésével a kihozatal mennyisége is növelhető. Ez magától értetődő, hiszen ugyanazon bemért mintatömeghez itt nagyobb oldószer mennyiség társul, de egyszerű többszöri extrakciós kísérleteimmel is igazoltam amikor például a szárított csalángyökér 80 °C-os 3*1 órán keresztül tartó vizes extrakciójának kihozatalát hasonlítottam össze az ugyanilyen körülmények között végzett egyszerű egyszeri extrakciók kihozatalaival és 4,54 %-kal nagyobb eredményt kaptam. (13. táblázat).
- Az **oldószer** fajtája jelentősen befolyásolja a kihozatal mennyiségét. Legkisebb értéket a szuperkritikus állapotú CO₂-dal tudtam kimutatni, ezt követte -de csak közel 10%-os eltéréssel- a n-hexán oldószerrel kapott kivonatok mennyisége, majd az etanolos extraktumok tömegei, de ezen extrakciók esetében sem volt mindegy, hogy mekkora az etanol koncentrációja a vizes oldatban. Legnagyobb értékeket ugyanis a vizes extraktumok vonatkozásában mértem. Kérdés, hogy mi lehet az oka annak, hogy a kihozatal mennyisége

CO₂ és n-hexán oldószerek esetében a legkisebb, és víz oldószer esetében a legnagyobb. A válasz nagy valószínűséggel a polaritás területén kereshető. Míg a CO₂ és a n-hexán apoláros vegyületek, addig az etanol és a víz polárisak. És bár kis mértékben, de a víz polaritása nagyobb, mint az etanolé. Tehát elképzelhető, hogy a csalán általam vizsgált növényi részeiben (levél és gyökér) az oldható komponensek nagyobb része poláris vegyület, amelyek kivonásához a munkám során felhasznált oldószerek közül a víz a legalkalmasabb.

- A vizsgált **növényi rész** is befolyásolta a kapott extraktumok mennyiségét. A csalán szárított levelének esetében nagyobb extraktum-mennyiségeket tudtam kimutatni, mint a szárított gyökérénel, ami valószínűleg a levélben található -általam használt oldószerekkel- oldható összetevők nagyobb hányadának tudható be.
- **Friss és szárított** levél esetében is jelentős az eltérés a kihozatalban. A friss levél-extraktum mennyisége több, mint másfélszerese volt a szárított drogból készült kivonatokénak függetlenül az oldószer fajtájától és az extrahálás idejétől. Ez a különbség feltehetően a hatóanyagok bomlásának illetve az illékony komponensek eltávozásának tudható be.
- A növény **fenológiai fázisa** is befolyásolhatja eredményeimet, de erre a kérdésre dolgozatomban más fejezetben -analitikai kísérleteimnél- fogok kitérni. Az itt bemutatott táblázatokban Soxhlet extrakciós eredményeimnek eltérése utalhat a jelzett felvetésre.
- A fagyasztva **tárolás időtartama** is befolyásolhatja a kihozatalt, mivel a drog hatóanyag-tartalma ennél a tárolási formánál szenved a legkisebb hatóanyag bomlást (STEFANOVITS 2018). Erre utalnak mikrobiológiai kísérleteim eredményei, de méréseket erre vonatkozóan nem végeztem.
- A **nyomás emelése** a szuperkritikus extrakció esetében szintén kedvez a kihozatalnak. Gazdaságosság szempontjából viszont érdemes lehet megállapítani azt az optimális nyomásértéket, ahol az extraktum mennyisége megközelíti a maximális nyomáson kapott kihozatalt, de az energia-befektetés sokkal kisebb. Esetemben a csalángyökér drog vizsgálata során ez a nyomás érték 300 bar.

4.2. Mikrobiológiai kísérletek eredményei

Az antimikrobás hatás vizsgálatokhoz számos előkísérletet végeztem a SZIE ÉTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén azért, hogy megtaláljam azt az extrakciós módszert, oldószert és extraktum koncentrációt, amelynél a csalán-kivonatok a legnagyobb antimikrobás hatást mutatják.

Az **első** előkísérlet-sorozat során a szárított gyökér drog Soxhlet-, és szuperkritikus extrakcióval készült extraktumainak antimikrobás hatását vizsgáltam az Anyagok és módszerek fejezetben felsorolt 10 mikroba faj egy-egy törzsére, agarlyuk-diffúziós módszerrel. A kivonatokat Soxhlet extrakciók esetében szárazra pároltam (a szuperkritikus extrakcióval nyert kivonatok szilárd halmazállapotúak voltak). Ezután 96%-os etanolban oldottam vissza az etanos Soxhlet-, a hexános Soxhlet-, és a szuperkritikus extrakcióval kapott extraktumokat megközelítően 2,5 mg drog/ml töménységűre. Ezután a kivonatokat 5-, illetve 2,5 % töménységűre hígítottam, a kontroll 5-, illetve 2,5 %-os etanol volt. *Az antimikrobás hatás vizsgálata negatív eredménnyel zárult, gyökér minták extraktumai nem mutattak antikikrobás hatást.*

A **második** előkísérlet-sorozatnál -a szakirodalomban találtak alapján (AMINI et al., 2014)- változtattam a csalán mintákon, és frissen szedett és szárított csalán levél+szár drogjával dolgoztam tovább. Ennek a kísérlet-sorozatnak az volt az indító oka, hogy gyökér-extraktumok esetében nem tudtam antimikrobás hatást kimutatni. A kivonatokat etanos-, és hexános Soxhlet extrakcióval készítettem el. Az extraktumok koncentrációja ekkor is 2,5 mg drog/ml körüli volt. Az antimikrobás hatást agarlyuk-diffúziós módszerrel vizsgáltam. *A kísérlet-sorozat szintén negatív eredménnyel zárult, a levél+szár drogból készített minták extraktumai nem mutattak antimikrobás hatást.*

A **harmadik** előkísérlet-sorozatnál az előző kísérlet extraktumainak 5-szörös koncentrációra történő betöményítésével próbálkoztam, azaz megközelítően 7,5 mg drog/ml töménységű extraktumokkal dolgoztam tovább és vizsgáltam a kivonatok gátló hatását szintén agarlyuk-diffúziós módszerrel. *A kísérlet-sorozat szintén negatív eredménnyel zárult, a levél+szár drogból készített és koncentrált extraktumok nem mutattak antimikrobás hatást.*

A **negyedik** előkísérlet-sorozatnál változtattam a mintákon és a módszeren is. Frissen szedett, majd szárított csalán levéllel és virággal dolgoztam tovább. A növény szárát azért nem dolgoztam fel az extraktumok készítése során, mert szakirodalmi adatok alapján (ORCIC, et al. 2014) a növény szára sokkal kevesebb hatóanyagot tartalmaz, mint a levele. Újabb módosítás volt, hogy a növényi részeket a késes aprítón kívül laboratóriumi golyós malommal is daráltam, így az előző részben bemutatott (6. táblázat) kisebb szemcseméreteket értem el. (A továbbaprításra a növény sejtfalának alaposabb megtörése miatt volt szükségem). Változtattam az extraktumok koncentrációján is, és 67 mg drog/ml-es keverékekkel dolgoztam tovább. (A 100 mg/ml-es keveréket másfélszeresére kellett hígítanom a szűrési nehézségek miatt.) Részben változott az extraháló oldószer is, mert az etanos kivonatok mellett vizes extraktumokat is készítettem. Változott az extrakciós módszer is, mert kivonataimat egyszerű egyszeri

extrakcióval állítottam elő úgy, hogy a keveréket egy órán keresztül 100 °C hőmérsékleten extraháltam (kevergetve). Az agarlyuk diffúziós módszer mellett korongdiffúzióval is vizsgáltam az antimikrobás hatást.. *Ez a kísérlet-sorozat szintén negatív eredménnyel zárult, sem a vizes, sem az etanolos extraktumok nem mutattak antimikrobás hatást egyik módszer esetében sem.*

Első sikeres kísérletsorozatomban az **ötödik** kísérletsorozat volt, ahol már 100 mg/ml-es koncentrációt, 80 °C és 100 °C-os vizes extrahálási hőmérsékletet és 1 óra helyett 3 óra extrahálási időt alkalmaztam. Az extrakciót etanollal is elvégeztem.

Az előkísérletek sikertelenségét tehát több okra tudom visszavezetni:

1. Az előkészítés során a laboratóriumi késes aprítóval aprított drogokat nem porítottam eléggé -szemcseméretük gyökérdrog esetében 500 µm, levéldrog esetében 450 µm volt az első három előkísérletnél- így a szárított növény sejtfalát nem sikerült eléggé megtörni.
2. A csalán levelét és szárát együtt vizsgáltam (az első 3 előkísérletnél), pedig a szár irodalmi adatok alapján (ORCIC 2014) kevesebb olyan polifenolos vegyületet és ásványi anyagot tartalmaz, amely felelőssé tehető a mikrobiológiai hatásért.
3. Az előkísérletek alapján meghatároztam az antimikrobás hatást okozó komponensek kinyeréséhez megfelelő körülményeket (oldószer, hőmérséklet, idő). Beigazolódott ugyanis, hogy az extrahálást nem elég egy órán keresztül végezni; a víz mikrobiológiai szempontból alkalmasabb oldószer, mint az etanol, valamint kimutatható antimikrobás hatás eléréséhez legalább 100 mg /ml töménységű keveréket kell készíteni.

Kísérleteim során megállapítottam, hogy az eltérő fenológiai fázisban gyűjtött minták antimikrobás hatása között is nagy az eltérés, amelyekre vonatkozóan a 14., 15. és 16. táblázatban található adatok.

A növény két különböző **fenológiai** fázisában gyűjtött minta antimikrobás hatása közötti eltérést a tavaszi és őszi csalán-extraktumok mikrobaölő hatásának vizsgálati eredményei mutatják be a leveleknél (14. és 15. táblázat), és a tavasszal gyűjtött gyökereknél (16. táblázat). A későbbiekben bemutatott polifenolprofil -ezen belül a rutin és kvercetin- mennyiségi vizsgálatok alapján mikrobiológiai kísérleteim során e két flavonoid antimikrobás hatását is vizsgáltam. Miután a rutin egyetlen esetben sem mutatott antimikrobás hatást, ezért csak a kvercetinrel kapcsolatos eredményeket tüntetem fel a 16. táblázatban. A számadatok 2 ismételt kísérlet 2-2 párhuzamos eredményét mutatják. A 2,5 %-os, és 5 %-os etanolos kontroll oldatok nem mutattak gátló hatást a lyukdiffúziós módszer körülményei között egyik vizsgált mikroba esetében sem.

14. táblázat: a tavaszi gyűjtésű csalánlevelek 100 mg/ml szárazanyag koncentrációjú keverékeinek antimikrobás hatása a feltisztulási zóna átmérője (mm) és minősége alapján. Az agarlyuk átmérője 8 mm volt.

Mikroorganizmus		80 °C-os vizes extraktum	100 °C-os vizes extraktum	5%-os etanolos extraktum
<i>Candida albicans</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Candida glabrata</i>	zóna mm	18,0 ± 2,0	18,0 ± 1,0	
	gátlás	teljes	teljes	nincs
<i>Candida parapsilosis</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Enterococcus faecalis</i>	zóna mm			14,0 ± 1,0
	gátlás	nincs	nincs	teljes
<i>Escherichia coli</i>	zóna mm	13,0 ± 1,5	14,5 ± 3,5	13,0 ± 4,0
	gátlás	részleges	részleges	teljes
<i>Listeria innocua</i>	zóna mm	10,0 ± 1,0		11,5 ± 0,5
	gátlás	teljes	nincs	teljes
<i>Listeria monocytogenes</i>	zóna mm	12,0 ± 0,0		
	gátlás	teljes	nincs	nincs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	zóna mm	28,0 ± 0,0	23,0 ± 8,0	10,5 ± 0,5
	gátlás	teljes	teljes	teljes
<i>Staphylococcus aureus</i>	zóna mm	20,0 ± 6,5	21,0 ± 4,0	9,5 ± 0,5
	gátlás	teljes	teljes	teljes

15. táblázat: az őszi gyűjtésű csalánlevelek 100 mg/ml szárazanyag koncentrációjú keverékek antimikrobás hatása a feltisztulási zóna átmérője (mm) és minősége alapján. Az agarlyuk átmérője 8 mm volt.

Mikroorganizmus		80 °C-os vizes extraktum	100 °C-os vizes extraktum	5%-os etanolos extraktum
<i>Candida albicans</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Candida glabrata</i>	zóna mm	17,0 ± 0,5	16,5 ± 0,5	
	gátlás	teljes	teljes	nincs
<i>Candida parapsilosis</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	zóna mm	nincs	12,5 ± 0,0	
	gátlás	nincs	részleges	nincs
<i>Enterococcus faecalis</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Escherichia coli</i>	zóna mm	13,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	
	gátlás	részleges	részleges	nincs
<i>Listeria innocua</i>	zóna mm	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	
	gátlás	részleges	részleges	nincs
<i>Listeria monocytogenes</i>	zóna mm	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	
	gátlás	részleges	részleges	nincs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Staphylococcus aureus</i>	zóna mm	16,0 ± 0,0	15,0 ± 1,0	
	gátlás	részleges	teljes	nincs

16. táblázat: a tavaszi gyökér minták és a kvercetin antimikrobás hatása a feltisztulási zóna átmérője (mm) és minősége alapján, 100 mg/ml szárazanyag koncentrációjú keverékeiben. Az agarlyuk átmérője 8 mm volt.

Gyökér				
Mikroorganizmus		80 °C-os vizes extraktum	100 °C-os vizes extraktum	5% etanol-vizes extraktum
<i>Candida albicans</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Candida glabrata</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Candida parapsilosis</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Enterococcus faecalis</i>	zóna mm	17,0	17,0	
	gátlás	teljes	részleges	nincs
<i>Escherichia coli</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Listeria innocua</i>	zóna mm		18,0	
	gátlás	nincs	teljes	nincs
<i>Listeria monocytogenes</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	zóna mm	18,0		
	gátlás	részleges	nincs	nincs
<i>Staphylococcus aureus</i>	zóna mm			
	gátlás	nincs	nincs	nincs
Kvercetin				
Mikroorganizmus		vizes oldat 80 °C (20 µg/ml)		etanolos oldat (10 µg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	zóna mm	13,0 ± 1,0		11,0 ± 0,0
	gátlás	teljes		teljes

A kvercetin a vizsgált 10 mikroba törzs közül csak a *Pseudomonas aeruginosa*-val szemben mutatott gátlást, a rutin gátlását egyetlen mikroba törzs esetén sem sikerült kimutatnom.

Megjegyzem, hogy egy-egy agarlyukba 150 µl extraktumot pipettáztam, ami a 4.4 fejezet 17. táblázata alapján a 100 °C-os vizes levél extraktumok TPC értékei alapján körülbelül 16 mMGSE/g szá. tartalomnak felel meg. A táblázat alapján minden egyes esetben meg lehet mondani az agarlyukakba pipettázott polifenolok mennyiségét és a vizsgált extraktumokban található vegyületek antioxidáns kapacitását.

Tavaszi és őszi gyűjtésű mintáim esetében tehát a következő előkészítő műveletek után sikerült kimutatnom antimikrobás hatást:

- A frissen szedett levelet és gyökeret 3 hétig papláson szárítottam, majd laboratóriumi késes aprítóval, ezt követően pedig golyós malommal porítottam.

- Az aprított drogokból 100 mg/ml koncentrációjú keverékeket készítettem MilliQ minőségű vízzel, majd 80 °C-os és 100 °C-os extrahálást végeztem 3 órán keresztül kevergetve, illetve 96%-os etanolos extraktumot készítettem 30 °C-on és 20 órán keresztül történő rázatással. Az etanolos extraktumot vizsgálat előtt 5%-osra, illetve 2,5%-osra hígítottam az etanol gátló hatásának csökkentése céljából.
- Az antimikrobás hatás vizsgálatát agarlyuk diffúziós és összehasonlításuként korong diffúziós módszerekkel végeztem. A két módszer összehasonlításának, és egy-egy eredményemnek fényképét az M3. mellékletben mutatom be.
- Összegzőképpen a nagy csalán mikrobiológiai hatását vizsgálva elmondható, hogy az antimikrobás hatás más gyógynövényekhez - például a kamillához (SHARIFI-RAD et al. 2018) - képest viszonylag gyengének mondható. A gátló zóna nagysága 100 mg/ml-esnél hígabb extraktumokban (pl. felező hígításnál) a legtöbb pozitív esetben már nagyon kicsi volt, ezért a szaporodásra kifejtett hatását (pl. MIC érték meghatározását) folyékony tenyészetben (pl. mikrotiter lemezekben abszorbancia mérésével) nem lehetett vizsgálni.

Mikrobiológiai kísérleteim alapján megállapítható:

- A csalánlevél és gyökérextraktumok közül a növény tavaszi és őszi fenológiai fázisában a levélextraktumok mutattak erőteljesebb gátló hatást. Ezeknél a vizsgálatoknál a feltisztulási zóna minősége és nagysága szempontjából egyes esetekben eltérés volt a két különböző hőmérsékleten készített vizes kivonat között, ami az antimikrobás komponensek eltérő hőmérsékleti stabilitását mutatja.
- A gombák közül csak a *C. glabrata* volt érzékeny a levelekből készült vizes kivonatok gátló hatásával szemben, a tavaszi és őszi levelekből készült kivonatok esetében nem volt lényeges különbség.
- A vizsgált baktériumok esetében az *E. fecalis* egyik vizes levélextraktummal szemben sem volt érzékeny, míg a *P. aeruginosa* esetében csak a tavaszi levél extraktumoknál volt kimutatható (jelentős) gátló hatás. A többi négy vizsgált baktérium érzékeny volt a kivonatokkal szemben, azonban a tavaszi hatásosabb volt, mivel egyrészt általában kissé nagyobb gátlási zónát eredményezett, másrészt a legtöbb esetben teljes (feltisztult) gátlási zóna jött létre. Megjegyzendő azonban, hogy a két *Listeria* faj esetében csak az őszi 100 °C-os kivonatok mutattak gátló hatást.

- A tavaszi gyökér minták három mikroorganizmussal szemben (*Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa*) mutattak gátló hatást, de az őszi extraktumoknál ezt már nem tudtam újra kimutatni.
- Megállapítható, hogy a két eltérő fenológiai fázisban gyűjtött levél- és gyökérmintáknál a nagyobb hatóanyag-kinyeréshez érdemes tavaszi mintákat alkalmazni, mert feltehetően néhány gátló összetevő tavasszal még jelen van a növényben, de a vegetációs időszak végére elbomlik.
- Vizsgáltam a rutin és kvercetin antimikrobás hatását is. A rutin esetében egyáltalán nem tapasztaltam gátlást, míg a kvercetinnél azt láttam, hogy a 80 °C-os oldatnak van antimikrobás hatása, de magasabb hőmérsékleten (100°C-on) antimikrobás hatást már nem tudtam kimutatni. Ezért mintáim antimikrobás hatásáért a rutin önmagában nem tehető felelőssé, a kvercetin hatása viszont érzékelhető a *Pseudomonas aeruginosa* baktériummal szemben.
- Az etanolos kivonatok közül csak a tavaszi levelek esetében mutattam ki gátló hatást, ami egy baktérium (*Listeria monocytogenes*) kivételével minden vizsgált baktériumnál megmutatkozott.
- Az etanolos kivonatok gátló hatásának mértéke körülbelül fele volt a vízzel készített extraktumokénak, jóllehet ezt a kivonatot 20-szorosra hígítottam a vizsgálat előtt. Az *Enterococcus faecalis* baktériummal szembeni gátló hatását vizes oldatokban nem sikerült kimutatni.

4.3. Analitikai vizsgálatok

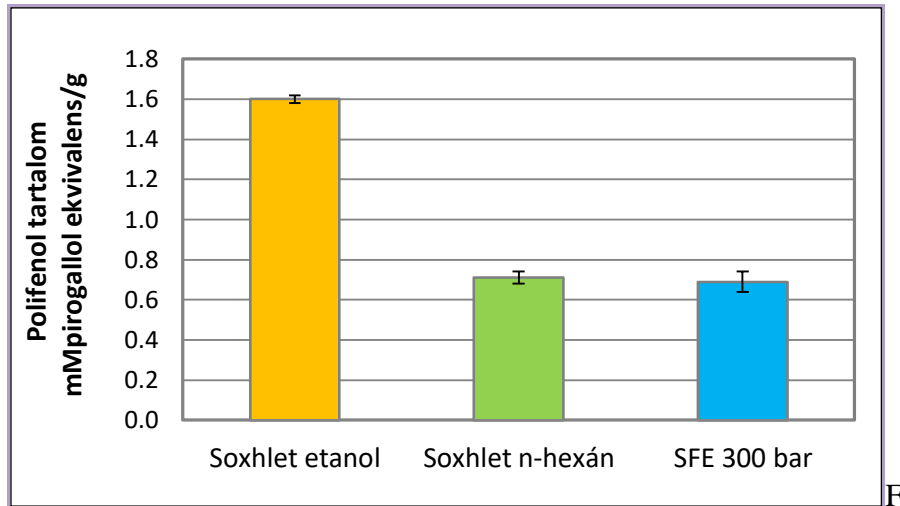
4.3.1. A Soxhlet és a szuperkritikus extrakció analitikai eredményei

A 96 %-os etanolos és a 96 %-os hexános Soxhlet extrakcióval, valamint a szuperkritikus extrakcióval készült minták analitikai vizsgálatára is sor került a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszékén. Mértem az összes polifenoltartalmat (pirogallollal készült a kalibrációs görbe) (22. ábra), valamint a DPPH gyök 50 %-s gátlásához tartozó koncentráció értékeket (23. ábra).

Az, hogy a BME laboratóriumában más sztenderdet, jelen esetben pirogallolt használtam a kalibrációs görbéhez, nem okoz gondot a minták egymáshoz történő összehasonlítása során. Az egyszerre, ugyanúgy mért eredmények egymással összehasonlíthatók, a tendenciából következtetések vonhatók le. Más mérésekből származó adatokkal viszont csak úgy hasonlíthatók össze, ha minden körülmény, így a sztenderd is azonos. Jelen esetben nem is az

abszolút értékekre voltam kíváncsi, hanem ez egyes minták közötti összefüggések megállapítására.

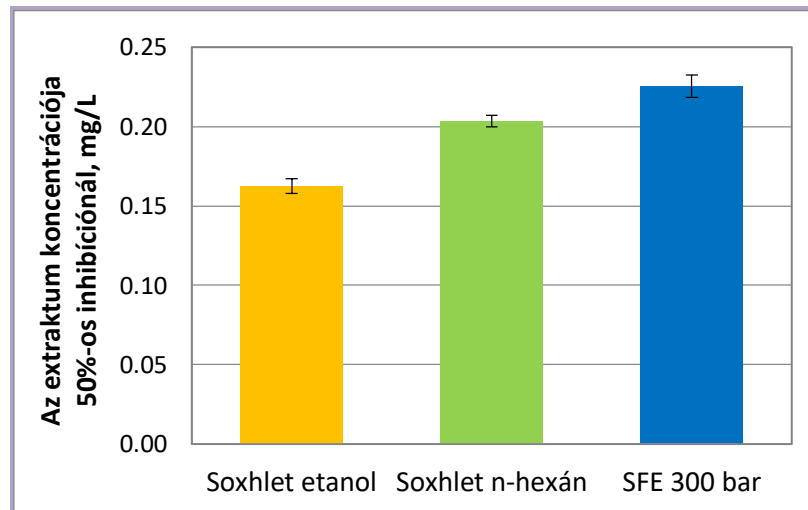
Az antioxidáns/redukáló tulajdonság jellemzésére a DPPH gyök semlegesítésén alapuló módszernél a megszokott 50 %-os gátlás értékeit tüntettem fel. A csalán **gyökeréből** készült etanolos, hexános és szuperkritikus extrakcióval készült kivonatok összes polifenoltartalmának értékeit a 22. ábra mutatja be.



22. ábra: a csalángyökér különböző extrakciós kivonatainak teljes polifenoltartalma szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva

A mérési eredmények alapján látható (22. ábra), hogy a Soxhlet extrakcióval készült 96%-os etanolos kivonatokban a legnagyobb a teljes polifenoltartalom értéke, ami több mint kétszerese a 95%-os hexánban mértnek, illetve a szuperkritikus extrakció során kapott értéknek. Meg kell említeni, hogy a szuperkritikus extrakcióval 300 bar nyomáson készített extraktumok teljes polifenoltartalma szinte teljesen megegyezik a 95%-os hexánnal készített kivonatok teljes polifenoltartalmával.

Ugyanezen kivonatok gyökfogó kapacitását DPPH módszerrel is megmértem. Annak a koncentrációnak az értékét kerestem, amivel a mesterségesen előállított gyök 50%-os gátlását lehet elérni Trolox ekvivalensre számolva (23. ábra).

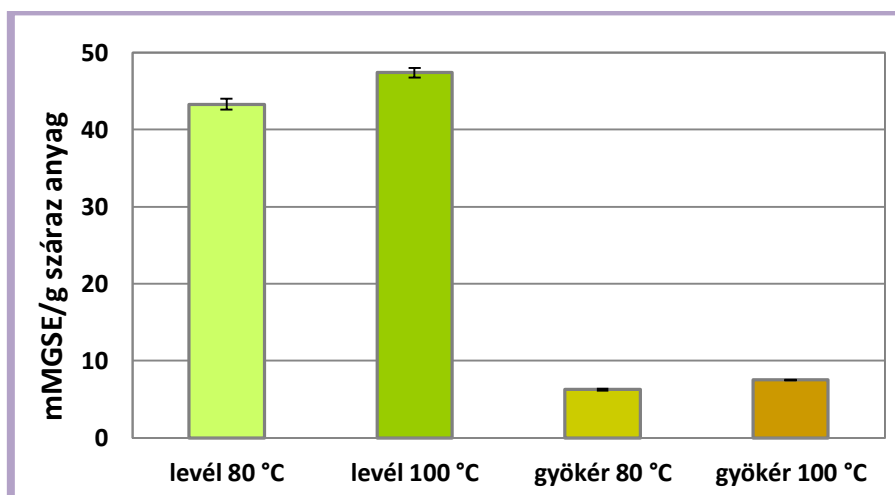


23. ábra: a csalángyökér extrakciós kivonatainak DPPH-gyökre kifejtett 50 %-os gátlása.

Az eredmények egyértelműen igazolják, hogy amíg a jelentős polifenoltartalommal rendelkező etanolos Soxhlet extrakcióval kinyert gyökér kivonatnak kisebb koncentrációja is elég a gyök 50 %-os gátlásához, addig a kisebb polifenoltartalmú hexános Soxhlet, vagy a szuperkritikus extrakcióval kinyert extraktumoknak nagyobb koncentrációja fejt ki ugyanazt a gátlást. Ezen gyökfogó képesség ábrája szinte teljesen az előző görbe fordítottja, jelezve, hogy a polifenolos vegyületek jelentős szerepet játszanak a szabadgyökök fogásában/semlegesítésében.

4.3.2. Teljes polifenoltartalom és antioxidáns kapacitás meghatározása

Minden vizes és alkoholos kivonatból (szárított levélből és gyökérből) elvégeztem az analitikai vizsgálatokat. A mintákból az analitikai vizsgálatok során teljes polifenoltartalmat és antioxidáns kapacitást mértem. Először a tavaszi minták eredményeit mutatom be (24. ábra).



24. ábra: a csalán tavasszal gyűjtött levél és gyökér mintáinak teljes polifenoltartalma 80 °C-os és 100 °C-os vizes extraktumokban

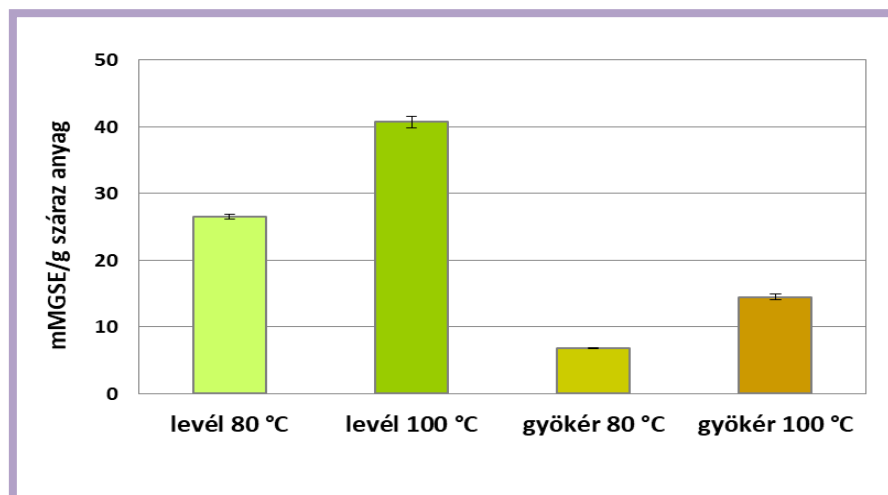
A teljes polifenoltartalomra vonatkozó eredmények alapján a vizes kioldás bizonyult jobbnak.

A **levelekben** a 80 °C-os extraháláshoz képest (43,28 mMGS/g szá.) a 100 °C-on történő extrahálás jobb eredményt (47,38 mMGS/g szá.) adott. Hasonló összefüggést kaptam a gyökerek eredményeinél is.

A **gyökerekben** -a tavasszal zajló anyagcserefolyamatok miatt- jelentősen kisebb a polifenoltartalom mennyisége (millimol galluszsav/g szárazanyag mértékegységben kifejezve) a levelekhez képest, bár a növekvő tendencia a hőmérséklet emelésével ugyanúgy jelentkezik (80 °C-on 6,26 mMGS/g szá., míg 100 °C-on 7,53 mMGS/g szá.), mint a leveleknél.

Az alkohollal kioldott polifenol mennyiségek rendre alatta maradtak a vizes kioldásnál mértékhez képest, leveleknél ez a különbség közel 10-szeres, míg a gyökereknél kb. 2,5-szeres.

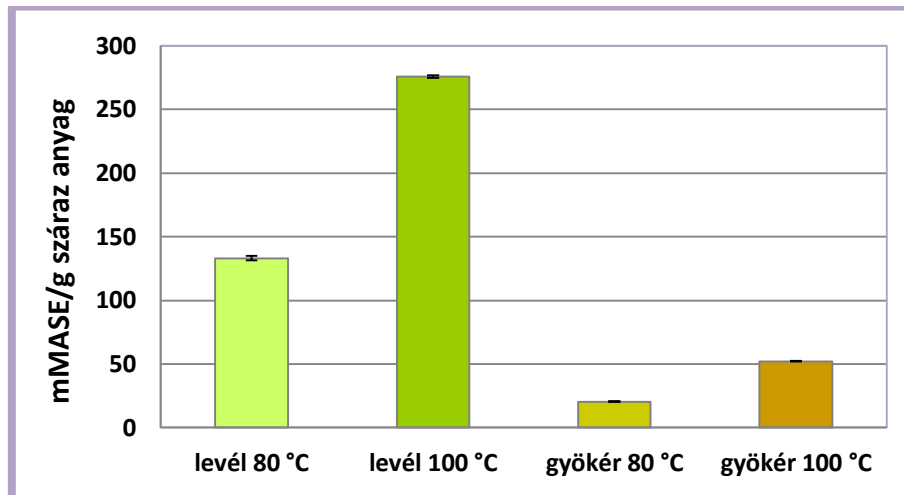
A teljes polifenoltartalom eredményeit az őszi szedésű mintákban a 25. ábrán mutatom be.



25. ábra: a csalán őszi gyűjtött növényi részeinek teljes polifenoltartalma 80 °C-os és 100 °C-os vizes extraktumokban

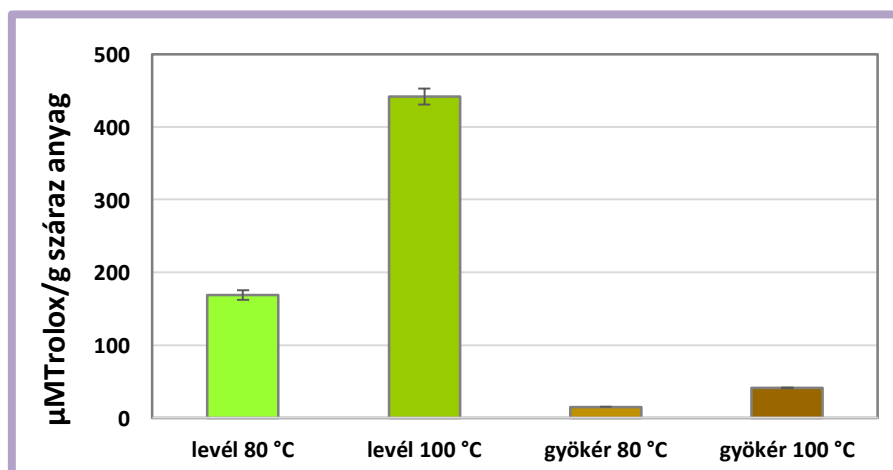
A teljes polifenoltartalom értékeit a tavaszi és őszi gyűjtésű mintákban a 24. ábra és 25. ábra mutatja. Jól kitűnik, hogy a növény fenológiai fázisának vége felé mások lesznek az anyagcseretermékek. A levelekben a polifenolos vegyületek csökkenését, míg a gyökerekben a növekedését figyelhetjük meg. A hőmérséklet emelése őszi gyűjtésű mintáknál is a polifenolos vegyületek nagyobb mennyiségű kioldását eredményezte.

A tavaszi és az őszi mintákból FRAP módszerrel meghatároztam a levelek és gyökerek extraktumainak antioxidáns kapacitását is (26. és 27. ábra).



26. ábra: a csalán tavasszal gyűjtött növényi részeinek antioxidáns kapacitása FRAP módszerrel 80 °C-os és 100 °C-os vizes extraktumokban

A tavaszi minták antioxidáns kapacitását DPPH módszerrel is megvizsgáltam (26. ábra), és hasonló tendenciát tapasztaltam, mint a FRAP módszernél.

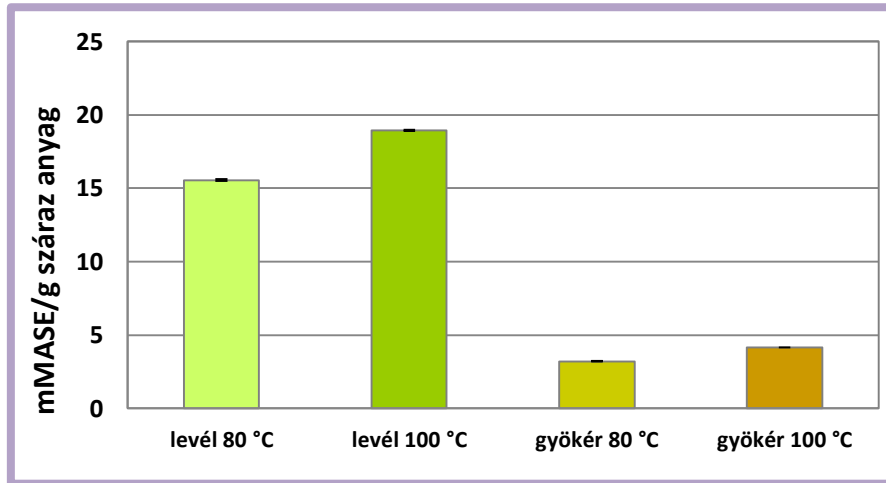


27. ábra: a csalán tavasszal gyűjtött növényi részeinek antioxidáns kapacitása DPPH módszerrel 80 °C-os és 100 °C-os vizes extraktumokban

A tavaszi minták esetében megállapítható, hogy lényeges eltérés van a levélben és gyökérben mért antioxidáns kapacitás között. A levelekben mindkét hőmérsékleten nagyobb értéket mértem, az eltérés FRAP módszer esetén kb. ötszörös volt. Az is megállapítható, hogy a hőmérséklet emelése mindkét növényi résznél kedvező hatású volt az antioxidáns kapacitás növekedése szempontjából.

Az ősszel gyűjtött levél és gyökér minták antioxidáns kapacitását FRAP módszerrel mértem meg, eredményeimet a 28. ábrán mutatom be. A mérés során megállapítottam, hogy a vegetációs időszak végére -az időszak elejéhez viszonyítva- a levelekben a csökkenő polifenoltartalom miatt kisebb lett az antioxidáns kapacitás értéke millimol aszkorbinsav/g száraz anyag

mértékegységben kifejezve. A gyökerekben észlelt kisebb értékek feltételezhetően a másodlagos anyagcsere folyamatokban nagyobb mennyiségben képződő olyan polifenoloknak köszönhetőek, amelyek antioxidáns kapacitása kisebb.

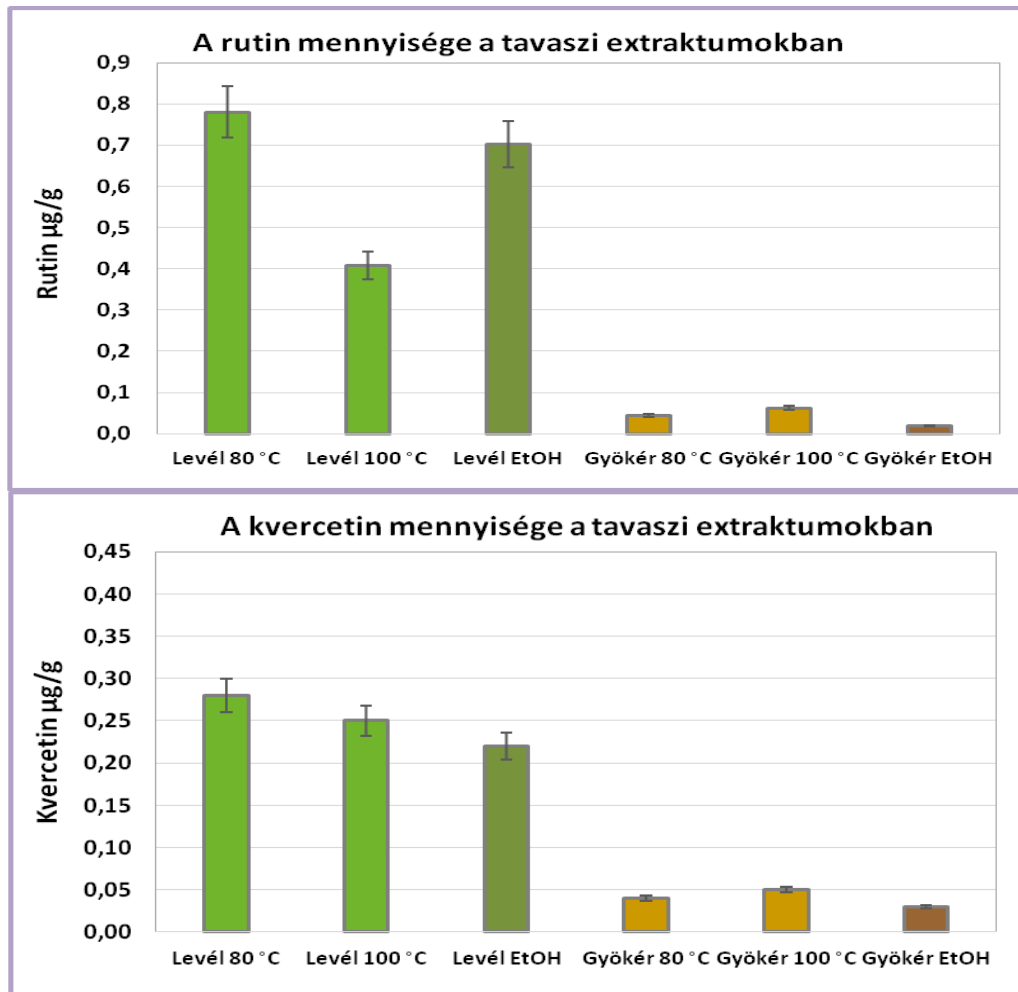


28. ábra: a csalán ősszel gyűjtött növényi részeinek antioxidáns kapacitása FRAP módszerrel 80 °C-os és 100 °C-os vizes extraktumokban

4.3.3. HPLC-s mérések

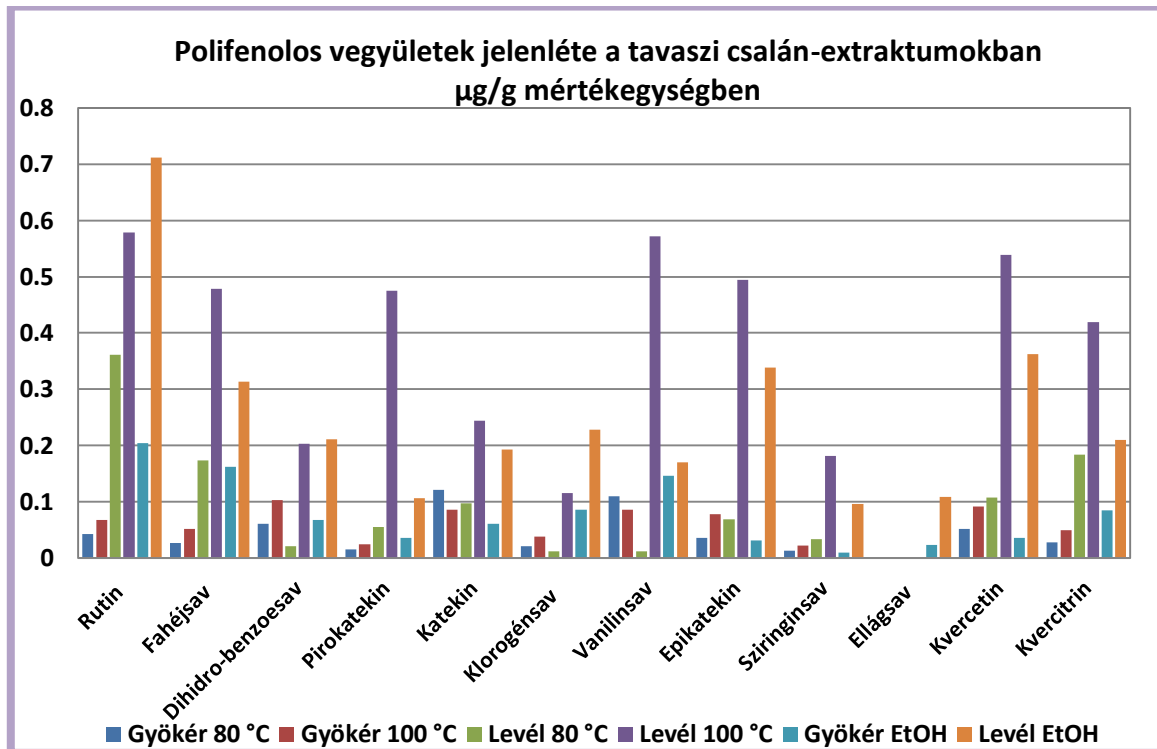
Mikrobiológiai és analitikai méréseimhez kapcsolódóan HPLC-s méréseket is végeztem. Első méréseim (MTA TTK) célja a rutin és kvercetin mennyiségének meghatározása volt a különböző extraktumokban.

Eredményeimet a 29. ábrán összegzem. Méréseim alapján a levélben lényegesen nagyobb mennyiség fordul elő mindkét vegyületből, mint a gyökérben. A rutinnál a levelek és a gyökerek között 80 °C-on a különbség több mint 10-szeres. Kvercetinnél ez az eltérés már kisebb, körülbelül 7-szeres. A rutin és kvercetin mennyiségének 100 °C-on mért értékei minden esetben kisebbek, mint a 80 °C-on mérték, ami magyarázata lehet a 14. táblázatban bemutatott mikrobiológiai hatásnak, miszerint a 80 °C-os vizes extraktumoknál jelentősebb gátlást tudtunk elérni. Ez igazolása lehet, annak a feltételezésnek is, hogy a kvercetin a polifenolos vegyületek közül valóban beleszólhat az antimikrobás hatás alakulásába. A rutin bár jelentős mennyiségben van jelen a növényben, antimikrobás hatása nem mérhető. Az alkoholos kivonatban a rutin és a kvercetin mennyisége megközelíti a vizes kivonatokban mért értéket.



29. ábra: a HPLC-vel mért rutin és kvercetin tartalom a csalán levél és gyökér extraktumokban

A **polifenolprofilra** (SZIE KTK) vonatkozó összesített eredmények alapján (30. ábra) a sztenderdként használt 12 polifenolos vegyület közül egyedül az ellágsav nem volt kimutatható mennyiségben sem a levél sem a gyökér vizes kivonataiban, de az alholos extraktumokban már jelen volt. A vizes kivonatoknál a hőmérséklet emelése a legtöbb komponensnél jobb kioldást eredményezett. Elmondható az is, hogy a levél 100 °C-os vizes extraktumaiban a polifenolos vegyületekből nagyobb mennyiséget tudtam kimutatni, mint a 80 °C-os extraktumokban. Ugyazon kivonatokból a két különböző laboratóriumban a rutinra és kvercetinre hasonló eredményeket kaptam.



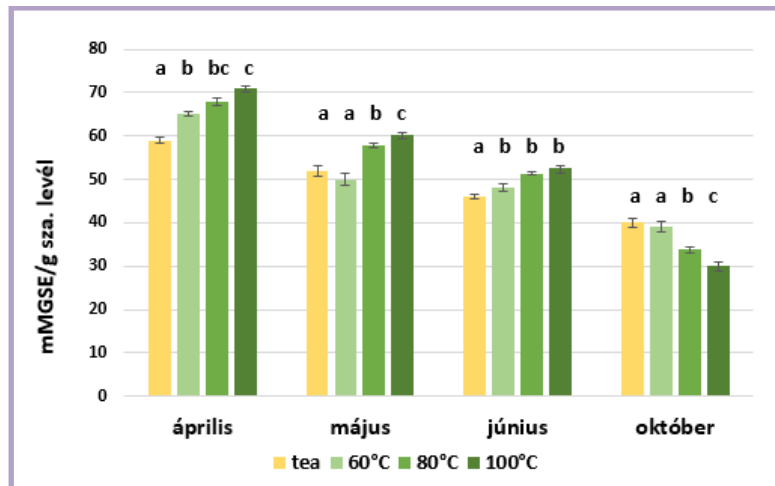
30. ábra: a levél és gyökér vizes és alkoholos kivonatainak polifenolprofilja

4.4. A fenológiai fázis hatásának vizsgálata a növény teljes polifenoltartalmára és antioxidáns kapacitására

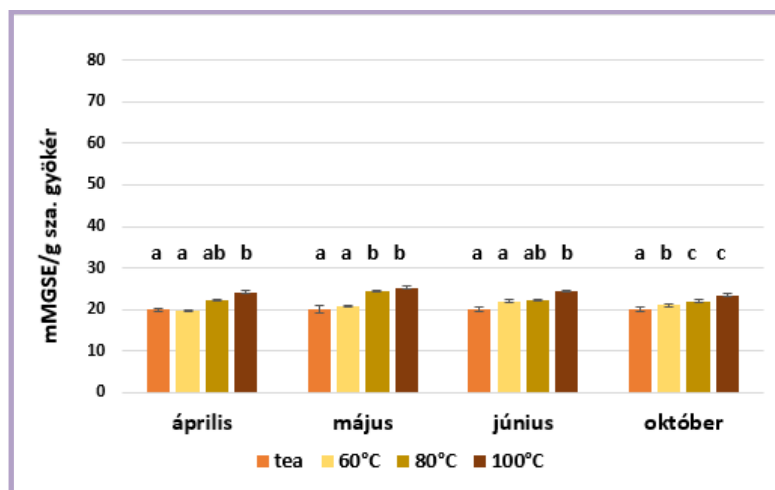
Már a mikrobiológiai kísérleteknél is láttam, hogy érdemes lenne megvizsgálni mind a gyökér-, mind a levélextraktumok esetében, hogy melyik az a fenológiai fázis, amelyben gyűjtve a legtöbb polifenolos vegyület nyerhető ki az adott extraktumból, amelyek ismertén a legnagyobb antioxidáns/redukáló tulajdonsággal és egészségvédő hatással rendelkeznek. A koncentráció diagramokon feltüntetett szórások az egy éven belüli eredményekre vonatkoznak.

Az analitikai vizsgálatok során friss és szárított növényi részek vizes és etanolos extraktumainak teljes polifenoltartalmát és antioxidáns kapacitását határoztam meg.

Az eredmények bemutatását először a friss levélminták teljes polifenoltartalmának (31. ábra), majd a friss gyökérminták teljes polifenoltartalmának (32. ábra) ismertetésével kezdem, ezt követően ugyanezen minták antioxidáns kapacitását (33. és 34. ábra) tárgyalom. A teljes polifenoltartalmat millimol galluszsav egyenérték / g szárazanyag-tartalomban, az antioxidáns kapacitást millimol aszkorbinsav egyenérték / g szárazanyag-tartalomban adom meg.



31. ábra: a friss csalán levél teljes polifenoltartalmának változása vizes extraktumokban a vegetációs időszak során (a különböző betűk a szignifikáns különbséget jelzik)



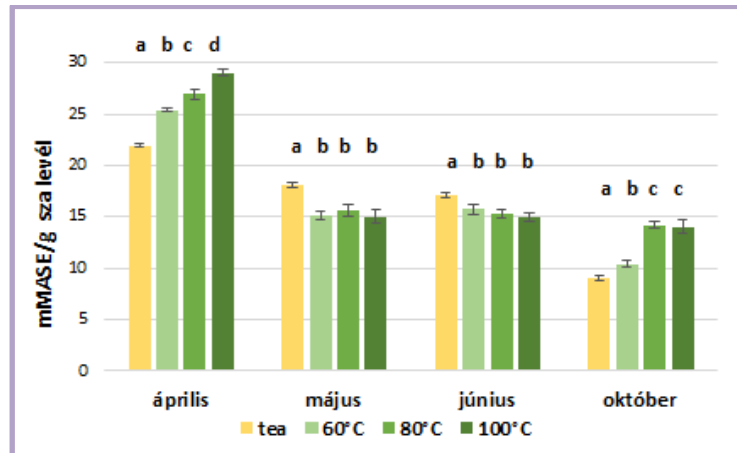
32. ábra: a friss csalán gyökér teljes polifenoltartalmának változása vizes extraktumokban a vegetációs időszak folyamán (a különböző betűk a szignifikáns különbséget jelzik)

A teljes polifenoltartalom a friss levél-mintákból készített vizes extraktumok esetében 30-50%-kal bizonyult nagyobbak a friss gyökér minták polifenoltartalmánál (32. ábra). A friss levelek vizes extraktumainak összes polifenol mennyisége (31. ábra) a vegetációs időszak alatt csökkent. A legnagyobb áprilisban volt, míg a legkisebb októberben. A vizes gyökér extraktumok teljes polifenoltartalmát nem befolyásolta a mintavétel ideje, állandó volt szinte az egész vegetációs időszakban.

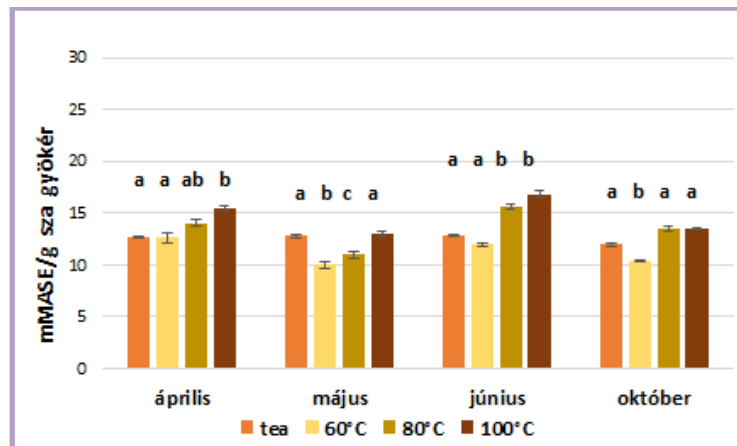
A hőmérséklet emelése általában a teljes polifenoltartalom enyhe növekedését eredményezte. A levélmintáknál viszont az látható, hogy míg a vegetációs időszak elején és a kora nyári időszakban az extrahálási idő- illetve hőmérséklet emelésével nagyobb polifenoltartalom értékeket tudtam kimutatni, addig a vegetációs időszak végére ez a tendencia megfordult. Ez az eredmény valószínűleg annak köszönhető, hogy októberben más polifenolok szintetizálódtak,

ezek pedig hőérzékenyebbek, annak ellenére, hogy ez a polifenolokra általában nem jellemző. Az ábrákon látható, hogy a szokásosan készített tea oldattal (100 °C-os forrázás után 24 óra állás) összehasonlítva a 3 órán keresztül tartó extrakciókat, a polifenolok kinyerésének az extrahálási idő növelése kedvez.

A friss csalán levelek és gyökerek vizes kivonataiban a legnagyobb teljes polifenoltartalmat áprilisban lehetett kimutatni. Az antioxidáns kapacitás mérési eredményeit a 33. és 34. ábrákon mutatom be.



33. ábra: a friss levél vizes extraktumainak antioxidáns kapacitása a vegetációs időszak során (a különböző betűk a szignifikáns különbséget jelzik)



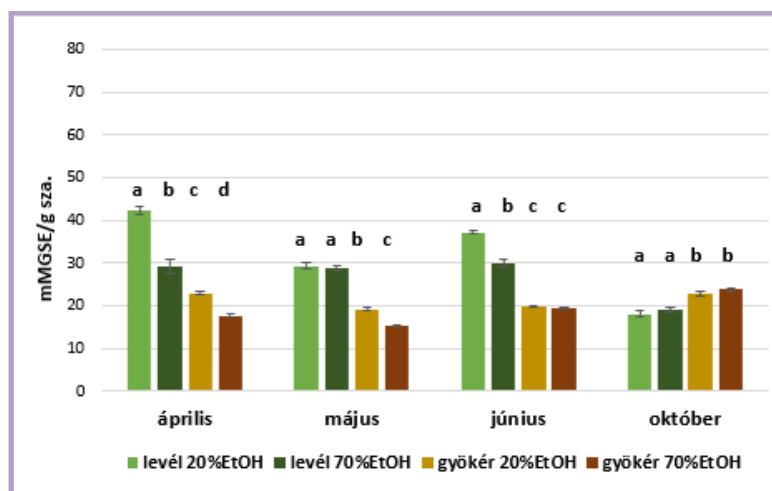
34. ábra: a friss gyökér vizes extraktumainak antioxidáns kapacitása a vegetációs időszak során (a különböző betűk a szignifikáns különbséget jelzik)

A friss levél vizes kivonatainak antioxidáns kapacitását befolyásolta a mintavételi idő. A legnagyobb az áprilisban összegyűjtött friss leveleknél volt, hasonlóan a polifenoltartalomnál kapott eredményekhez. Májusban és júniusban közel egyforma (100 °C-os extraktumokban 15 μ MASE/g szá.) értéket mértem, ami lényegesen kisebb, mint a vegetáció kezdetén. A legkisebb

antioxidáns kapacitást az ősszel betakarított leveleknél kaptam. A fenológiai szakasznak a gyökér-kivonatok antioxidáns képességére azonban nem volt hatása.

Az extrakciós hőmérséklet és az extrahálási idő a friss levelek antioxidáns kapacitását csak a kora tavaszi és az őszi szedéskor befolyásolta, azaz 3 órás extrakciónál és magasabb hőmérsékleten kaptam nagyobb értéket. Májusi és júniusi mintáim antioxidáns kapacitása azonban alacsonyabb volt a 3 órás vizes kivonatokban, mint a tea extraktumokban, a hőmérséklet emelése pedig alig befolyásolta az antioxidáns kapacitás értékeit. Ezt a megállapítást 60 °C-os és 80 °C-os extraktumok esetében a varianciaanalízis eredményei is alátámasztják. A friss gyökerek vizes extraktumainak antioxidáns kapacitása május kivételével nagyobb volt 80- és 100 °C hőmérsékleten 3 órán át történő extrakció esetében, mint 60 °C-on és a tea kivonatnál.

A vegetáció során a friss mintákból készült etanolos extraktumok polifenoltartalmát és antioxidáns kapacitását a 35. és 36. ábrán mutatom be.

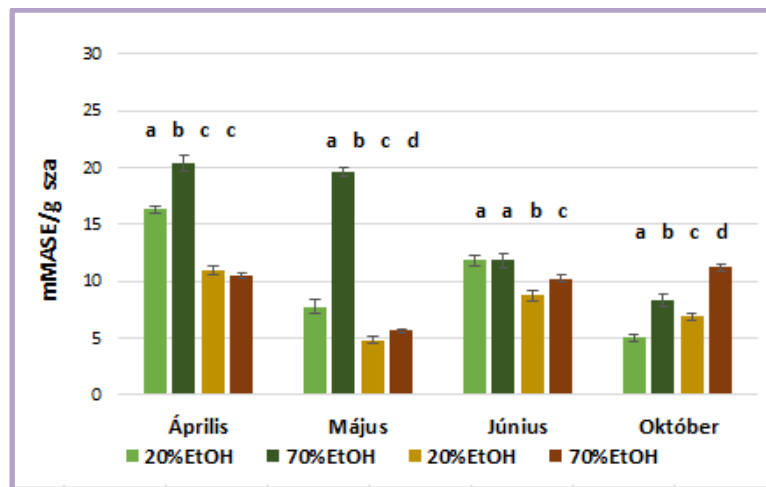


35. ábra: a friss csalán levél és gyökér teljes polifenoltartalmának változása etanolos extraktumokban a vegetációs időszakban (a különböző betűk a szignifikáns különbséget jelzik)

Tavasszal és nyáron a friss levél etanolos kivonataiban mért összes polifenoltartalom (35. ábra) nagyobb volt, mint a friss gyökérből készített etanolos oldatokban. Októberben azonban a gyökér kivonatokban mértünk a nagyobb összes polifenoltartalmat. Az antioxidáns kapacitás tekintetében ugyanezt a tendenciát lehetett kimutatni (36. ábra). Ennek oka lehet, hogy a vegetációs időszak vége felé a levél kezd elhalni, értékes komponenseinek mennyisége csökken, míg a gyökér elraktározza a fontos, a szervezetben keletkezett, azon belül megjelenő komponenseket.

Mérési eredményeim alapján a friss levelek vizes kivonatainak teljes polifenoltartalma mindegyik szedési időszakban nagyobb volt, mint az etanolos kivonatokban. A gyökerek esetében hasonló értékeket találtunk mind a két oldószerrel készített kivonat esetén.

A nagyobb koncentrációjú (70%-os) etanollal készült levél-extraktumok esetében a polifenol szint közel 20-30%-kal csökkent, a 20%-os alkoholos kivonathoz képest különösen áprilisban és júniusban, míg májusban és októberben nem volt kimutatható különbség a két különböző koncentrációjú etanolos kivonat között.



36. ábra: a friss csalán levél (zöld szín) és gyökér (barna szín) antioxidáns kapacitásának változása alkoholos extraktumokban a vegetációs időszak folyamán (a különböző betűk a szignifikáns különbséget jelzik)

Fenológiai fázissal kapcsolatos statisztikai számításaim alapján a vizes minták ugyanazon hónapban gyűjtött, de eltérő hőmérsékleten készített extraktumainak teljes polifenoltartalma között sok esetben nincsen szignifikáns különbség. Ugyanezt a tendenciát látjuk az antioxidáns kapacitás esetében is.

Az etanol nagyobb koncentrációja -a teljes polifenoltartalomnál látott tendenciával ellentétben- a vegetációs időszak minden egyes szakaszában nagyobb FRAP értéket eredményezett, ami feltételezhetően annak tudható be, hogy ugyan a 20 %-os alkohollal kioldott polifenolok mennyisége nagyobb volt, de ezen komponensek közül nem mindegyiknek arányosan nagyobb vagy kisebb az antioxidáns kapacitása.

Kísérleteim során vizsgáltam a szárított levelek és gyökerek kivonatainak teljes polifenoltartalmát és antioxidáns kapacitását is a vegetáció kezdetén és végén levő mintákból. Eredményeim az 17. táblázatban foglalom össze.

17. táblázat: a szárított levél -és gyökér mintákból készített vizes és etanos kivonatok teljes polifenoltartalma és antioxidáns kapacitása.

		április	október	április	október
		TPC		FRAP	
		mMGSE/g szá		μMASE/g szá	
tea	levél	99,42±3,34	50,42±1,34	10,28±0,78	11,02±0,07
	gyökér	28,42±0,60	25,42±0,60	9,01±0,28	8,52±0,07
60°C víz	levél	97,23±1,70	29,20±0,94	10,86±0,18	11,87±0,06
	gyökér	20,87±0,52	12,23±0,47	10,43±0,45	6,79±0,03
80°C víz	levél	99,06±1,65	36,30±0,41	21,89±0,77	19,71±0,07
	gyökér	23,80±1,20	13,48±0,34	13,71±0,71	8,55±0,06
100°C víz	levél	106,64±4,21	38,37±0,53	28,57±0,52	25,32±0,13
	gyökér	28,79±1,06	18,78±0,35	15,32±0,57	10,89±0,03
20% etanol	levél	66,21±5,43	18,46±0,50	12,29±0,57	7,27±0,07
	gyökér	25,00±0,42	10,21±0,58	12,27±0,57	4,90±0,09
70% etanol	levél	34,82±1,86	11,28±0,55	10,38±1,59	10,67±0,11
	gyökér	24,14±0,41	15,59±0,37	11,68±0,85	5,80±0,09

Kapott értékeim alapján az áprilisban gyűjtött mintákban a szárított levelek teljes polifenoltartalma nagyobb volt, mint az októberi mintákban. Ez a tendencia minden extrakciós módszernél megmutatkozott. Az áprilisban gyűjtött, majd szárított gyökerek szintén nagyobb polifenoltartalmat mutattak, függetlenül a hőkezeléstől -vizes oldatokban- és az etanol koncentrációjától. Ugyanakkor mindegyik extrakciós módszerrel történt vizsgálat esetében igaz, hogy a levélminták teljes polifenoltartalma nagyobb, mint a gyökereké.

A szárított növényi részek esetében az extrakciós módszernek jelentős hatása volt a minták polifenol szintjére: a vizes kivonatok nagyobb összes fenoltartalommal rendelkeztek, mint az etanosz extraktumok. Az extrahálási hőmérsékletnek és időnek viszont sokkal kisebb hatása volt, mint a friss mintáknál.

Az antioxidáns kapacitás vizsgálatánál azt tapasztaltam, hogy az áprilisi mintáknál mért értékek nagyobbak az októberi mintákénál mind a szárított levelek-, mind pedig a gyökerek esetében. A két gyűjtési idő közötti különbség azonban nem volt olyan nagy, mint a teljes fenoltartalom vizsgálatánál. A levél- és a gyökérvonatok antioxidáns kapacitása a nagyobb extrakciós hőmérséklet hatására egyaránt megemelkedett. A leghatékonyabb extrakciós módszer a 100 °C hőmérsékleten történő 3 órán keresztül tartó extrahálás volt. A nagyobb etanol-koncentráció csökkentette az antioxidáns kapacitást mind a levelek, mind a gyökerek esetében.

A friss-, és szárított áprilisi minták teljes polifenoltartalmának összehasonlításakor (18. táblázat) látható, hogy mind a levél, mind a gyökér szárított mintáinak teljes polifenoltartalma nagyobb, mint a friss mintáké, az egyes növényi részek eltérő szárazanyag-tartalma miatt.

18. táblázat: a friss és szárított levél áprilisi és októberi extraktumai teljes polifenoltartalmának összehasonlítása mMGSE/g szá mértékegységben

április	(tea)	60 °C	80 °C	100 °C
friss levél	59,02	65,00	68,01	70,99
szárított levél	99,42	97,23	99,06	106,64
friss gyökér	20,01	19,80	22,28	24,21
szárított gyökér	28,42	20,87	23,80	28,79
október	(tea)	60 °C	80 °C	100 °C
friss levél	42,11	41,05	35,62	31,65
szárított levél	50,42	29,20	36,30	38,37
friss gyökér	20,69	19,38	22,89	23,63
szárított gyökér	25,42	12,23	13,48	18,78

Kísérleteimhez több éven keresztül gyűjtöttem csalán levelet, és gyökeret. Az egyes évek időjárási viszonyai hatással voltak a növény összetevőinek alakulására. Mikrobiológiai kísérleteim során 2017-ben, a fenológiai fázis vizsgálatánál pedig 2018-ban mértem meg a teljes polifenoltartalom és antioxidáns kapacitás értékét. A két egymást követő év analitikai eredményeit nagyon eltérnek egymástól, amit a teljes polifenoltartalom eredményeinél és az antioxidáns kapacitás értékeinél is meg lehet figyelni. Ennek oka valószínűleg a szedést megelőző éghajlati viszonyok különbözőségében keresendő. A napsütéses időben gyűjtött növény hatóanyag-tartalma mindig magasabb, az esős idő után gyűjtött növény hatóanyag-tartalma viszont alacsonyabb az átlagosnál. Az sem mindegy, hogy a gyűjtés melyik napszakban történt. A hatóanyagok legnagyobb mennyiségét teljes virágzásban és délután szedett növényben lehet kimutatni. Az áprilisi szedésű növény fejlettségi állapota is különbözhet egymástól két eltérő évben. Analitikai eredményeim eltérésére konkrét választ csak mindezen tényezők ismeretében lehetne adni, de ilyen jellegű vizsgálatokat nem végeztem. A tendenciák viszont mindkét évben megegyeznek. Összehasonlításaim a 19. táblázatban mutatom be.

19. táblázat: a teljes polifenoltartalom és antioxidáns kapacitás értékeinek változása két egymást követő évben

		levél			gyökér		
TPC	április	2017	2018	TPC	április	2017	2018
	80 °C	26,42±0,36	90,06±1,65		80 °C	6,79±0,11	23,80±1,20
	100 °C	40,66±0,85	106,64±4,21		100 °C	14,42±0,42	28,79±1,06
	szeptember	2017	2018		szeptember	2017	2018
	80 °C	43,28±0,62	36,30±0,41		80 °C	6,27±0,03	13,48±0,34
100 °C	47,38±0,69	38,37±0,53	100 °C	7,54±0,16	18,78±0,35		
FRAP	április	2017	2018	FRAP	április	2017	2018
	80 °C	133,16±1,66	21,89±0,77		80 °C	20,53±0,18	13,71±0,71
	100 °C	275,64±0,80	28,57±0,52		100 °C	52,12±0,20	15,32±0,57
	szeptember	2017	2018		szeptember	2017	2018
	80 °C	15,56±0,04	19,71±0,07		80 °C	3,20±0,02	8,55±0,06
100 °C	18,95±0,08	25,32±0,13	100 °C	4,15±0,02	10,89±0,03		

Analitikai kísérleteim alapján megállapítható:

- Mind a teljes polifenoltartalom, mind az antioxidáns kapacitás tekintetében (ezt a kivonatok DPPH-gyökre kifejtett 50 %-os gátlásának értékei bizonyítják) igaz, a hogy csalángyökér extraktumai esetében a legmagasabb értéket a Soxhlet extrakció etanolos kivonataiban tudtam kimutatni. Ezt követték a n-hexán és szuperkritikus CO₂-dal készített kivonatok analitikai eredményei.
- Megállapítottam, hogy a csalánlevél 80-, és 100 °C-os extraktumainak teljes polifenol értékei minden esetben magasabbak a gyökérnél meghatározottaknál.
- A hőmérséklet emelése kis mértékben (2-15%) kedvez a polifenoltartalom kinyerésének.
- Méréseim alapján a legnagyobb polifenoltartalmat és antioxidáns kapacitást víz oldószerrel lehet elérni. Ezt követi az etanol, majd az apoláros n-hexán, és szuperkritikus állapotú CO₂.
- Megállapítottam, hogy a csalán levelét a kora tavaszi időszakban, míg a gyökerét az őszi időszakban érdemes gyűjteni ahhoz, hogy az értékes antioxidáns/redukáló hatású vegyületeket minél nagyobb mennyiségben tudjuk kinyerni.
- Két egymást követő évben végzett kísérleteim alapján látható, hogy mind a teljes polifenoltartalom mennyisége, mind az antioxidáns kapacitás évszázad-függő.

4.5. Összegzés

- A csalándrog késes aprítóval elérhető fajlagos felülete (F) kb. 33 m²/ kg. Golyósmalommal lényegesen kisebb szemcseméreteket (ezáltal nagyobb fajlagos felületet) lehet elérni. Ez levél esetében kb. 10-szerese, gyökér esetében kb. 4-szerese a késes aprítóval kapott eredménynek. A golyósmalommal is aprított drogok esetében sikerült jobban megtörni a növényi részek sejtfalát és olyan kicsi szemcseméretet elérni, amely nagy valószínűséggel hozzájárult a növényi extraktumok pozitív mikrobiológiai hatásának eléréséhez.
- A polifenolok kinyeréséhez a legjobb oldószer a víz, ezt követi az etanol majd a hexán és a hexánhoz közeli hatékonyságú szuperkritikus állapotú CO₂.
- Az extraktumokban mért antioxidáns kapacitás értékei szintén jelentősen függenek az oldószer megválasztásától, de a sorrend ebben az esetben is az előbb leírt.
- Az ugyanazon időszakban gyűjtött és szárított levél-, és gyökérminták extraktumainak teljes polifenoltartalma és antioxidáns kapacitása jelentősen eltérhet egymástól két különböző évben gyűjtött minta esetén. Szeptemberi mintáimnál nincs számottevő eltérés.
- Körülbelül 20%-kal kaptam nagyobb értéket a 2017-ben gyűjtött levél mintákban és 2018-as évben betakarított levél-minták vizes extraktumai teljes polifenoltartalmához képest, áprilisi mintáimnál viszont a 2018-ban mért értékeim bizonyultak sokkal nagyobbak. Az évenként változó időjárási viszonyok, a napsütött órák száma, a mintavételi időjárási körülmények lehetnek ennek okai.
- A csalán levelei a vegetáció során a polifenol-vegyületeket nagyobb mennyiségben halmozzák fel, mint a gyökerek. Ezt az extrakciós oldószertől függetlenül meg lehet megállapítani. A legmagasabb polifenoltartalmat a vegetációs időszak elején összegyűjtött friss levelek vizes kivonataiban mértem.
- Az extrahálási hőmérséklet emelése az összes polifenoltartalom és az antioxidáns kapacitás jelentős növekedését eredményezte.
- A levelek teljes polifenoltartalma tavasztól őszig csökkent. A gyökérzetben azonban a vegetáció végén enyhe növekedés mutatkozott.
- A vizes kivonás az etanos extrakcióhoz képest a vízben jobban oldódó redukáló aktivitású polifenol-vegyületek felszabadulását teszi lehetővé. A polifenolok kioldása -és az antioxidáns kapacitás növelése- érdekében a tea készítés módszerével ellentétben sokkal jobb, ha a kivonat készítésekor 100 °C-on legalább 3 órán keresztül végezzük az extrakciót.

- Az egészségmegőrzés szempontjából (polifenoltartalom, antioxidáns kapacitás) a legajánlottabb tavasszal, a vegetációs időszak elején betakarítani a friss csalán levelét.

4.6. Új tudományos eredmények-Tézisek

1. Kísérletekkel igazoltam, hogy a nagy csalán levelének és gyökerének extrakciója során a különböző extrakciós módszerekkel elérhető kihozatal szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva és tömeg%-ban megadva nagyságrendi eltéréseket mutathat elsősorban az oldószer, valamint kisebb mértékben az extrakciós idő, a hőmérséklet és a nyomás függvényében. A kihozatali értékeket táblázatos formában közlöm.

	Szuperkritikus	Soxhlet	Soxhlet	Egyszerű egyszeri	Egyszerű egyszeri
	CO ₂	n-hexán	etanol	etanol	víz
Levél	1,1 - 1,5	1,8 - 1,9	18,1 - 21,7	20,5 - 21,2	26,7 - 31,1
Gyökér	0,3 - 0,6	0,7 - 0,8	7,8 - 8,0	12,9 - 15,5	14,2 - 21,2
Megjegyzés	100 bar - 450 bar	95%	96%	70% - 20%	(tea) 60-80-100 °C

2. Megállapítottam, hogy a polifenolok kinyerése és az abból következő antioxidáns/redukáló kapacitás oldószerfüggő, legjobb oldószer a víz, ezt követi az etanol majd a hexán és a hexánhoz közeli hatékonyságú szuperkritikus állapotú CO₂. A teljes polifenoltartalom értékeit egyszerű extrakciók esetén mMGSE/g szá mértékegységben adom meg. A víz és etanol hatékonysága közötti eltérést levél és gyökérminták esetében és egyszerű egyszeri extrakcióknál a következő két táblázatban szemléltetem.

Levél	Egyszerű egyszeri	Egyszerű egyszeri
	etanol	víz
	30,1 - 19,1	71,0 - 30,0
Megjegyzés	2018. ápr-okt, 70%	2018. ápr-okt, 100 °C

Gyökér	Egyszerű egyszeri	Egyszerű egyszeri
	etanol	víz
	23,9 - 15,4	25,3 - 23,4
Megjegyzés	2018. ápr-okt, 70%	2018. ápr-okt, 100 °C

Az etanol-, n-hexán-, és szuperkritikus állapotú CO₂-dal készített extraktumok teljes polifenoltartalma közötti eltérést gyökérminták esetében mMpirogallol ekvivalens/g szárazanyag mértékegységben Soxhlet- és szuperkritikus extrakciónál a következő táblázatban szemléltetem.

Gyökér	Soxhlet	Soxhlet	Szuperkritikus
	etanol	n-hexán	CO ₂
	1,6	0,7	0,7
Megjegyzés	96%	95%	300 bar

3. A csalán teljes életciklusában -áprilistól októberig- végzett kísérletsorozattal kimutattam, hogy a teljes polifenol tartalom mMGSE/g szá dimenzióban kifejezve a koratavaszi növényben a legnagyobb. A vegetációs idő végére a polifenoltartalom a levélben fokozatosan csökken. A gyökérben ez a változás kevésbé érzékelhető, sőt egyes esetekben a vegetációs időszak során enyhe növekedés tapasztalható, amit a következő táblázatban mutatok be.

	Április				Május				Június				Október			
	tea	60 °C	80 °C	100 °C	tea	60 °C	80 °C	100 °C	tea	60 °C	80 °C	100 °C	tea	60 °C	80 °C	100 °C
Levél	59,0	65,0	68,0	71,0	52,0	50,0	57,9	60,3	46,1	48,1	51,4	52,6	40,0	39,0	33,8	30,0
Gyökér	20,0	19,8	22,3	24,2	20,0	20,7	24,5	25,3	20,0	22,0	22,2	24,3	20,0	21,0	22,0	23,4

Az extrakciós körülmények közül a hőmérséklet növelése és az extrakció időtartama a teljes polifenoltartalom és az azzal összefüggésbe hozható antioxidáns kapacitás növekedését eredményezte.

A polifenolos vegyületek mennyisége a levelekben lényegesen nagyobb, mint a gyökerekben. Az antioxidáns kapacitás szintén a levélben nagyobb, mint a gyökérben, de a vegetációs időszak végére mindkét esetben csökkenést mutat.

Az egészségvédő hatás szempontjából tehát a gyűjtésre, felhasználásra, fogyasztásra a tavaszi levelek ajánlatosak.

4. Mikrobiológiai kísérletekkel bizonyítottam, hogy a nagy csalán levelének 80 °C-os és 100 °C-os vizes extraktumai egyaránt antimikrobás hatást fejtenek ki a következő mikrobatorzsek szaporodására: *Candida glabrata*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* és a *Staphylococcus aureus*. A pozitív eredmény eléréséhez szükség van -az extraktumok készítése előtt- a növényi részek 0,15 mm szemcsenagyság alatti aprítására.

Kimutattam, hogy a növény gyűjtésének ideje (április és október) -a feltisztulási zóna nagysága és minősége alapján- jelentősen befolyásolja az antimikrobás hatás alakulását. Tavaszi levélmintáknál a feltisztulási zóna nagysága alapján átlagosan 20-30%-kal nagyobb antimikrobás hatását tudtam kimutatni, mint az őszi mintáknál.

A levél vizes extraktumainak -a gyökéréhez viszonyítva- tavasszal is és ősszel is erősebb a gátló hatása.

Etanolos extraktumok esetében csak a tavaszi levélmintáknál tudtam gátlást kimutatni.

Szakirodalmi adatok alapján az antimikrobás hatásért nagymértékben felelős a rutin és a kvercetin. A két anyag antimikrobás hatását vizsgálva megállapítottam, hogy a rutinnál nem mérhető gátló hatás, a kvercetinnél pedig csak a 80 °C-os extraktumoknál, mert a 100 °C-os hőkezelés -méréseim szerint- valószínűleg inaktiválja a vegyületet.

5. Következtetések, javaslatok

Munkám célja a nagy csalán (*Urtica dioica* L.) leveléből és gyökeréből különböző extrakciós módszerek-, oldószer-, és paraméterek beállítása mellett egy olyan termék előállítása volt, amely kedvező antimikrobás és redukáló hatásának köszönhetően tinktúra illetve por alakban alkalmas lehet élelmiszerbiztonsági szempontból is funkcionális élelmiszerként, élelmiszerösszetevőként, illetve a különböző technológiai/feldolgozási eljárásokon keresztül esett termékek természetes adalékanyagaként, ugyanakkor az élelmiszerfeldolgozás során a mikrobiológiai védelemben is fontos szerepet játszhat.

Eredményeim alapján elmondható, hogy mind csalánkivonat készítése szempontjából, mind környezetszennyezés (ebből a szempontból a CO₂ jobb oldószer) szempontjából a víz a legalkalmasabb oldószer, melyből az értékes bioaktív hatóanyagokat/polifenolos vegyületeket legalább 3 órán keresztül történő és legalább 60 °C-os extrakcióval célszerű kinyerni, ugyanis ezen vegyületek kinyerésének kedvez a magasabb hőmérséklet. Tehát ha nem egy vitamindús frissen készített ital előállítása a célunk, hanem szeretnénk a szervezet számára káros szabadgyököket megkötni egy méregtelenítő kúrával, akkor a drogból az előbb leírt módon kell kivonatot készítenünk.

Kísérleteim alapján az is elmondható, hogy a növényt a vegetációs időszak kezdetén (áprilisban) érdemes gyűjteni, majd szárítani.

Megállapítottam, hogy a 3 órán keresztül és magasabb hőmérsékleten (80 °C-on és 100 °C-on) végzett vizes extrakciók az antimikrobás hatású vegyületek szempontjából is kedvezőek, hiszen az antimikrobás hatás összefüggésbe hozható a polifenolok jelenlétével. Kísérleteim során sikerült egy olyan módszert kidolgoznom, hogy csalánlevélből egy háztartási vízforraló segítségével bárki készíthet magának otthonában méregtelenítő/szabadgyök-megkötő hatású italt filléres áron.

De a csalánkivonatokat be is lehet párolni, és szilárd por alakjában a technológiai eljárásainak részeként élelmiszerek adalékanyagaként vagy tartósító hatást kiváltó csomagolóanyagokban, felhasználni. A mediterrán országoknál már bevált módszerek szerint ajánlom még a növény friss levelének salátaként történő fogyasztását, vagy szárított formában fűszerkeverékekben történő felhasználását.

Kísérleteim során vizsgáltam a rutin és a kvercetin antimikrobás hatását is, illetve ugyanezen komponensek jelenlétét extraktumaimban. Megállapítottam, hogy a kvercetin hozzájárul az oldatok gátló hatásához, de a rutinnak nincsen hatása a vizsgált mikroorganizmusokra. Felmerül tehát a kérdés, hogy pontosan mely polifenolos vegyület vagy vegyületek, és milyen összetételben felelősek a növény adott fenológiai fázisában az antimikrobás hatásért? Érdemes lenne tehát a csalán-extraktumokban vizsgált 12 polifenolos vegyület antimikrobás tulajdonságát -a kvercetin és a rutin mintájára- külön-külön vagy 2-es, 3-as csoportokba rendezve megvizsgálni. Javaslom, hogy a rutin több csoportban is szerepeljen, mert -méréseim alapján, és az irodalmi adatok alapján is- ez a vegyület ugyan elég nagy mennyiségben van jelen a növényben, antimikrobás hatása önmagában nincs, más vegyületek hatását viszont képes növelni.

Ugyancsak érdekes lehetne megállapítani hogyan változik az egyes komponensek mennyisége a növény teljes fenológiai fázisa alatt.

6. Összefoglalás

Munkám során a nagy csalán (*Urtica dioica* L.) extraktumainak és bioaktív komponenseinek vizsgálata volt a célom, melynek kapcsán 3 különböző extrakciós módszerrel (egyszerű-, Soxhlet-, és szuperkritikus extrakció) készítettem kivonatokat. Ezeket műveleti-, analitikai- és mikrobiológiai szempontból is vizsgáltam.

- A BME és SZIE Műveletek tanszékein végzett méréseim során az előkészítő folyamatok után a csalán-kivonatok különböző extrakciós módszerekkel -illetve eltérő műveleti paraméterek beállítása mellett- kapott mennyiségeinek szárazanyag-tartalomra vonatkoztatott összehasonlítását végeztem el. Előkészítő műveleteim során szitaanalízist is végeztem.
- Analitikai méréseim során egyrészt a változó műveleti paraméterek mellett (hőmérséklet, oldószer, oldat-koncentráció), és eltérő fenológiai fázisban gyűjtött csalánextraktumok teljes polifenoltartalmát és antioxidáns kapacitását hasonlítottam össze és az eredményeket statisztikailag is kiértékeltem, másrészt összefüggést kerestem növényi kivonataim teljes polifenol tartalma/antioxidáns kapacitása és antimikrobás hatás között. Harmad részről HPLC-s méréseket végeztem 12 fenolos vegyület jelenlétére a csalán-extraktumokban. A rutin és kvercetin jelenlétét HPLC-s mérésekkel külön is vizsgáltam, és ezen két vegyület antimikrobás hatását is megpróbáltam kimutatni.
- Mikrobiológiai kísérletem során extraktumaim antimikrobás hatását vizsgáltam 10 mikroorganizmus törzsre.

Kísérleteim során szitaanalízist végeztem és megállapítottam, hogy mind a laboratóriumi késes aprítóval, mind a golyós malommal őrölt növényi részek szemcseeloszlása a Rosin-Rammler-Sperling-Bennet diagrammal ábrázolható és a Rosin-Rammler-Bennet összefüggéssel leírható. A halmaz jellemző szemcsemérete jelentősen csökkent a golyós malommal történő aprítás során, levél minták esetén kb. 1/10 részére. Ez a növény sejtfalának intenzívebb megtörése miatt hozzájárulhatott az extraktumok antimikrobás hatású összetevőinek feltáráshoz.

Megállapítottam, hogy az extrakciók kihozatalának mennyiségére legnagyobb mértékben az oldószer fajtája gyakorol hatást. Az általam vizsgált oldószerek közül vízzel értem el a legjobb hatást, ezt követte az etanol. A hexán Soxhlet extrakciója és szuperkritikus extrakciója során

közel egyforma kihozatalt értem el. Szuperkritikus extrakciós kísérleteim során megállapítottam, hogy csalángyökér-extraktumok esetében az alkalmazandó nyomás optimális értéke 300 bar, e fölött az érték fölött nem lehet elérni számottevő növekedést az extraktum mennyiségében.

Az összes polifenoltartalom és az antioxidáns kapacitás spektrofotometriásan kapott eredményei alapján megállapítható volt, hogy a polifenolok kinyeréséhez a legjobb oldószer a víz. A vizes extraktumok teljes polifenoltartalma és antioxidáns kapacitása minden esetben nagyobb értéket mutat, mint az etanolos, hexános és a szuperkritikus állapotú CO₂ extraktumoké.

A polifenolok mennyiségét befolyásolja, hogy a növényi anyag gyűjtése annak melyik fenológiai fázisában történt. Analitikai méréseimmel igazoltam, hogy a gyűjtésre legalkalmasabb időpont az április, a növény fenológiai fázisának eleje. Ezt az eredményt különösen a levél-minták analízisével tudtam alátámasztani. Fenológiai fázissal kapcsolatos statisztikai számításaim alapján a vizes minták ugyanazon hónapban gyűjtött, de eltérő hőmérsékleten készített extraktumainak teljes polifenoltartalma és antioxidáns kapacitása között sok esetben nincsen szignifikáns különbség.

Mikrobiológiai kísérleti eredményeim alapján megállapítottam, hogy a nagy csalán levelének 80 °C-os és 100 °C-os vizes extraktumainak egyaránt gátló hatása van a következő mikroorganizmusokra: *Candida glabrata*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Staphylococcus aureus*.

A növény gyűjtésének ideje (április és szeptember) is jelentősen befolyásolja az antimikrobás hatás alakulását. Tavaszi levélminták esetében még a *Pseudomonas aeruginosa* antimikrobás hatását is ki tudtam mutatni. Etanolos kivonatok esetében csak a tavaszi levélmintáknál tudtam gátlást kimutatni. A levél vizes extraktumai a gyökéréhez viszonyítva mindkét fenológiai fázisban erősebb gátló hatást fejtettek ki. A rutin és kvercetin antimikrobás hatását vizsgálva megállapítottam, hogy a rutinnak önmagában nincs antimikrobás hatása. A kvercetinnek viszont van, ami a *Pseudomonas aeruginosa* 80 °C-os vizes extraktumában mutatkozott meg tavaszi levél-, és gyökérmintákban. Így az is feltételezhető, hogy ezek a polifenolos vegyületek az egyes növényi részekben a saját fenológiai fázisuknak megfelelően bomlanak (levél) vagy felhalmozódnak (gyökér) a vegetációs időszak végére.

7. Summary

The role of food has considerably changed in recent decades. Consumers not only look for tasty nutrients, but also pay attention to the health protection and disease prevention effects of foods. I chose one of the most well-known herbs, the stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as the topic of my research, because, according to scientific literature, this plant has been efficiently employed for centuries as an important herb in folk medicine. In the course of my research, I aimed at obtaining natural extracts from the stinging nettle (*Urtica dioica* L.) by extraction, so to this end, I gained extracts from the prepared drugs using 3 different extraction methods (conventional, Soxhlet and supercritical extraction), and then I also investigated them in operational, analytical and microbiological aspects. The main chapters of my doctoral dissertation:

1. Preparatory operations. The plant parts of the nettle (leaf, root, flower, fruit) need proper preparation so that they should be suitable for extracting active ingredients from them. I picked the plant parts of the nettle, leaf, root (and flower) in our own forest, then I dried and chopped them in two different ways. After having chopped them, I determined the typical particle size of the drugs and the characteristics of the heap of chopped plants with the help of RRSB model. The reduction of the particle size, thereby the intensified break-down of the plant cell wall, may have contributed to the analysis of antimicrobial components of the extracts.

2. Extraction measurements that I performed on fresh as well as dried leaves and roots of the nettle. I completed the supercritical, Soxhlet and conventional extractions with setting different operation parameters (temperature, pressure, operation time), with different solvents (distilled water, ethanol, hexane and supercritical CO₂) and solvent concentrations. I determined the amount of the extracted material and made comparisons regarding the dry matter. I found that the amount of extraction yield was most influenced by the type of solvent. Out of the solvents I used, water proved to be the best, and ethanol the second-best. Both the Soxhlet extraction with hexane and the supercritical CO₂ extraction completed on drugs resulted in similar – low – yield. In the course of supercritical extraction experiments, I also found that in the case of nettle root extracts, the optimum value of the pressure to be applied was 300 bar, exceeding this value I could not reach significant growth in the amount of extract.

3. Analytical measurements, in the course of which, on the one hand, I compared the total polyphenol content and antioxidant/reducing capacity of extracts from nettles picked in different phenological phases, setting different operation parameters (temperature, solvent, solvent

concentration) and, on the other hand, I looked for a connection between the total polyphenol content/antioxidant capacity of my plant extracts. Beyond determining the total polyphenol content of nettle extracts, I also performed HPLC measurements for analysing the presence of 12 phenolic compounds in the extracts. I investigated especially the presence of rutin and quercetin with help of HPLC and I also tried to prove the antimicrobial effect of these two compounds. Based on the spectrophotometric results of the total polyphenol content and the antioxidant capacity, water was found to be the best solvent for the extraction of polyphenols. The total polyphenol content and antioxidant capacity of aqueous extracts were always higher than that of ethanolic, hexane and supercritical CO₂ extracts.

4. Investigation of the effect of phenological phase was carried out with a series of measurements during a complete vegetation period. I found that the amount of polyphenol depended on the phenological phase in which the plant material had been picked. My analytical measurements proved that the most suitable date for the picking was April, at the beginning of the plant's phenological phase. I could confirm this result especially by the analysis of leaf samples. Based on my statistical calculations in relation to phenological phase, in many cases, there was no significant difference between the total polyphenol content and the antioxidant capacity of the aqueous extracts picked in the same month but gained at different temperatures.

5. Microbiological experiments, in the course of which I investigated the antimicrobial effect of the extracts on 10 strains of microorganism. Based on my measurement results, I found that the 80°C and 100°C aqueous extracts of the stinging nettle's leaves equally had inhibitory effect on the following microorganisms: *Candida glabrata*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The picking period of the plant (April to October) also significantly influenced the development of antimicrobial effect. In case of spring leaf samples, I could even prove the antimicrobial effect of *Pseudomonas aeruginosa*. In the case of ethanol extracts, inhibition could only be detected in spring leaf samples. Compared to the root, the aqueous extracts of the leaf showed stronger inhibitory activity in both phenological phases. Examining the antimicrobial activity of rutin and quercetin, I found that rutin alone had no antimicrobial effect. On the other hand, quercetin had such effect, which was detected in the 80°C aqueous extract of *Pseudomonas aeruginosa* in spring leaf and root samples. Therefore, it is also supposed that these polyphenolic compounds would decompose (leaf) or accumulate (root) in the individual plant parts according to their own phenological phase by the end of the growing season.

Mellékletek

M1. Irodalomjegyzék

- Afifi, U.F., Kasabri, V. (2013): Pharmacological and phytochemical appraisal of selected medicinal plants from Jordan with claimed antidiabetic activities. *Scientia Pharmaceutica* 81. 889-932. DOI: 10.3797/scipharm.1212-20
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Albayrak, S. (2012): Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs as tea and spices in Turkey. *Journal of Food Biochemistry* 36. 547-554. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00568.x
- Albert K. (2018): Élelmiszeripari emulziók membrátechnikai diszpergálással történő előállításának vizsgálata. Doktori (Ph.D) értekezés, SZIE ÉTK ÉMG Tanszék
- Allen T. (1981): Particle size, shape and distribution. *Particle Size Measurement* 103-164.
- Amini, K., Hemmatpoor, B., Moradi, P., Nazari, Z., Mahvar, T. (2014): Antibacterial activity of the ethanol and water extract and investigating the chemical composition of different parts of *Urtica dioica* L. *Science Road Journal* 2.2. 57-65.
- Anand, A., Patience, A.A., Sharma, N., Khurama, N. (2017): The present and future pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *European Journal of Pharmacology* 815. 364-375. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.09.043.
- Apak R., Güclü K., Demirata B., Özyürek M., Celik S. E., Bektasoglu B., Berker K. I., Özyurt D. (2007): Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12 (7) 1496-1547.
- Ashtiani, A.R., Vahidian-Rezazadeh, M., Jafari, M., Galdavi, R., Mohammadi, M. (2018): Study of changes in the plasma levels of chemerin of women with overweight and obese during a period of endurance training on a cycle-ergometer using hydroalcoholic extract of *Urtica*. *Pharmacophore* 9(2).72-79.
- Awad, E., Awaad, A. (2017): Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 67. 40-54. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.05.034.
- Azimi, H., Khakshur, A.A., Aghdasi, I., Fallah-Tafti, M., Abdollahi, M. (2012): A review of animal and human studies for management of benign prostatic hyperplasia with natural products: Perspective of new pharmacological agents. *Inflammation and Allergy - Drug Targets* 11. 207-221. DOI: 10.2174/187152812800392715
- Belák Á., Kiskó G., Kovács M., Maráz A., Mohácsiné Farkas Cs., Pomázi A. (2011): Gyors és molekuláris biológiai módszerek alkalmazása élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálatára - Gyakorlati kézikönyv. Nemzeti Tankönyvkiadó Budapest

- Benzie, I.I.F., Strain, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measuring of "antioxidant power": The FRAP assay. *Annalitical Biochemistry* 239, 70-76.
- Biró G. (1993): Élelmiszer-higiéniá. [Budapest: Agroinform Kiadó és Nyomda Kft]
- Blois, M.S. (1958): Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181.
- Brown, M.H., Emberger, O. 1980. Oxidation-Reduction Potential. *Microbial Ecology of Foods*, Vol 1., New York, Academic Press, 112-125.
- Bobis, O., Dezmirean, D.S., Tomos, L., Chirila, F., Marghitas, L.Al. (2015): Influence of phytochemical profile on antibacterial activity of different medicinal plants against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology* 51.1.113-118.
- Carvalho A.R., Costa G., Figueirinha A., Liberal J., Prior J.A.V., Lopez M.C., Cruz M.T., Batista M.T. (2017): Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International* 99, 185-194 DOI: 10.1016/j.foodres.2017.06.008.
- Ceyhan, N., Keskin, D., Ugur, A. (2012): Antimicrobial activities of different extracts of eight plant species from four different family against some pathogenic microorganisms. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 10(1).193-197.
- Cuicina, L.G., Macedo, R.O. (2018): Thermoanalytical characterization of plant drug and extract of *Urtica dioica* L. and kinetic parameters analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 133. 591-602. DOI:10.1007/s10973-018-6986-4
- Dar, S.A., Ganai F.A., Yousuf, A.R., Balkhi, M.U.H., Bhat, T.M., Sharma, P. (2013): Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology* 51.2. 170-180. DOI: 10.3109/13880209.2012.715172.
- Darsanaki, R.K., Rokhi, M.L., Mahya Mohamaddi, M., Raeisi, G., Nourbakhsh, M., Aliabadi, M.A. (2012): Antimutagenic properties of nettle leaf aqueous extract (*Urtica dioica* L.). *Biomedical and Pharmacology Journal* 5(2). 247-250. DOI: 10.13005/bpj/351
- Deák, T. (1998): Élesztőgombák a természetben és az iparban. *Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó* Budapest, 243 p.
- Deák, T., Kiskó, G., Maráz, A., Mohácsiné F.Cs. (2006): Élelmiszer-mikrobiológia., Budapest, *Mezőgazda Kiadó*.
- Dévay, A. (1998): Tankönyvtár, PTE ÁOK, Gyógyszerész Szak
- De Vico, G., Guida, V., Carella, F. (2018): *Urtica dioica* (Stinging nettle): A neglected plant with emerging growth promoter/immunostimulant properties for farmed fish. *Frontiers in Physiology*. Mini review, 22 p. DOI: 10.3389/fphys.2018.00285
- Disler, M., Ivemeyer S., Hamburger, M., Vogl, C.R., Tesic, A., Klarer, F., Meier, B., Walkenhorst, M. (2014): Ethno veterinary herbal remedies used by farmers in four north-eastern Swiss cantons (St. Gallen, Thurgau, Appenzell Innerrhoden and Appenzell Auserrhoden). *Journal of Ethnobiology and Ethnmedicine* 10.32. 22 p. DOI: 10.1186/1746-4269-10-32.

- Dogan, S., Diken, M.E., Dogan, M. (2010): Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *Journal of Medical Plant Research*. 4(23). 2566-2573. DOI: 10.5897/JMPR10.626
- Durovic, S., Pavlic, B., Sorgic, S., Popov, S., Savic, S., Pertonijevic, M., Radojkovic, M., Cvetanovic, A., Zekovic, Z. (2017): Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different approaches. *Journal of Functional Foods* 32.18-26. DOI: 10.1016/j.jff.2017.02.019
- Erbay, E.A., Dagtekin, B.B.D., Ture, M., Yesilsu, A.F., Torres-Giner, S. (2017): Quality improvement of rainbow trout fillets by whey protein isolate coatings electrospun poly(ϵ -caprolactone) nanofibers with *Urtica dioica* L. extract during storage. *LWT- Food Science and Technology* 78. 340-351. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.01.002
- Farber, J.M.; Peterkin, P.I. (1991): *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 476-511.
- Fidel, PL Jr., Vazquez, JA., Sobel JD. (1999): *Candida glabrata*: review of Epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology* 12(1). 80–96. DOI: 10.1128/CMR.12.1.80
- Finn, R. K. (1959): Theory of agar diffusion methods for bioassay. *Anal. Chem.* 31(6). 975-977
- Frank J. (2007): Dowd, in xPharm: *The Comprehensive Pharmacology Reference* 1-5. DOI: 10.1016/B978-008055232-3.60909-2
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000): The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80. 1925-1941. DOI: 10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4
- Fung, D.Y.C. (2002): Rapid methods and automation in microbiology. *Food Science and Food Safety* 1, 3. DOI:10.1111/j.1541-4337.2002.tb00003.x
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernandes-Gutierrez, A. (2010): Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15. 8813-8826. DOI: 10.3390/molecules15128813.
- Garmendia, A., Raigon, M.D., Marques, O., Ferriol, M., Royo J., Merle, H. (2018): Effects of nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as foliar fertilizer on potato (*Solanum tuberosum* L.) yield and plant growth. *Peer Journal* DOI: 10.7717/peerj.4729
- Ghaima, K.K., Hashim, N.M., Ali, S.A. (2013): Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3.96-99. DOI: 10.7324/JAPS.2013.3518
- Gharibzahedi, S.M.T. (2017): Ultrasound mediated nettle oil nanoemulsions stabilized by purified jujube polysaccharide: Process optimization, microbial evaluation and physicochemical storage stability. *Journal of Molecular Liquids* 234. 240-248. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.03.094

Gharibzahedi, S.M.T., Mohammadnabi, S. (2017): Effect of novel bioactive edible coatings based on jujube gum and nettle oil-loaded nanoemulsions on shelf-life Beluga sturgeon fillets. *International Journal of Biological Macromolecules* 95. 769-777. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.119

Güder A, Korkmaz H. (2012): Evaluation of in-vitro antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and their mixture. *Iran J Pharm Res.*;11: 913–923.

Gulzar, P., Kausar, T., Sahaf, K.A., Munshi, N.A., Ahmad, S., Raja, T.A. (2013): Screening of ethanolic extract of various botanicals against fusarium pallidroseum. (Cooke) SACC. - The causal agent of twig blight of mulberry. *Indian Journal of Sericulture* 52. 1, 24-28.

Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Kolahi, M. (2009): Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.) colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12(1).58-63. DOI: 10.3923/pjbs.2009.58.63

Hegedűs, A., Stefanovitsné Bányai, É. (2012): Természetes antioxidáns-forrásunk a gyümölcs. *Debreceni Egyetem, AGTC, Kertészettudományi Intézet, Debrecen*. ISBN 978-615-5183-26-3

Hojnik M., Skerget M., Knez Z. (2007): Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Separation and Purification Technology* 57, p. 37-46 DOI: 10.1016/j.seppur.2007.02.018

Hsieh, CW., Cheng, JY., Wang, TH., Wang, HJ., Ho, WJ. (2014): Hypoglycemic effects of *Ajuga* extract in vitro and in vivo. *Journal of Functional Food* 6. 224-230. DOI: 10.1016/j.jff.2013.10.010

Jaisinghani, R.N. (2017): Antibacterial properties of quercetin. *Microbiology research* 8(1) DOI: 10.4081/mr.2017.6877

Jalili, C., Salahshoor, M.R., Naseri, A. (2014): Protective effect of *Urtica dioica* L against nicotine induced damage on sperm parameters, testosterone and testis issue in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 12(6). 401-408.

Jun, W., Rong, S. (2014): Supercritical fluid extraction of flavonoids from Dandelion. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 6(1). 97-101. DOI: 10.19026/ajfst.6.3037

Kehrer, J.P., Smith, C.V. (1994): Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. In: Natural antioxidants in human health and disease. Ed. Frei, B., *Academic Press, San Diego, Ca. USA*. 25-62.

Körpe, D.A., Iseri, Ö.D., Sahin, F.I., Cabi, E., Haberal, M. (2013): High-antibacterial activity of *Urtica* spp. seed extracts on food and plant pathogenic bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 64.3. 355-362. Doi: 10.3109/09637486.2012.734290

- Kukric, Z.Z., Topolic-Trivunovic, Z., Kukavica, B.M., Matos, S.B., Pavicic, S.S., Boroja M.M., Savic, A.V. (2012): Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica* 43.257-272. DOI: 10.2298/APT1243257K
- Laczay P. 2008., Élelmiszer-higiéncia Élelmiszerlánc-biztonság., Második kiadás, Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- Litynska-Zajac, M.(2012): Nettle in Polish archaeological sites. *Acta Paleobotanica* 52(1). 11-16.
- Luna-Guevara, M.L., Luna-Guevara, J.J., Hernandez-Carranza, P.B., Ruiz-Espinosa, H., Ochoa-Velasco, C.E. (2019): Phenolic Compounds: A good choice against chronic degenerative diseases. *Studies in Natural Products Chemistry* 59. 79-108. DOI: 10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7
- Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H., Fang, J. (2019): Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control* 106. 106712. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106712
- Maráz, A., Kovács M. (2014) Food spoilage by cold-adapted yeasts. In: Cold-adapted yeasts. (eds. Buzzini, P., Margesin, R.) Springer 497-532
- Malekirad, A.A., Mojtabae, M., Faghieh, M., Vaezi, G., Abdollahi, M. (2012): Effects of the mixture of *Melissa officinalis* L., *Cinnamomum zeylanicum* and *Urtica dioica* on hepatic enzymes activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Pharmacology* 8(3). 204-208. DOI: 10.3923/ijp.2012.204.208
- Mansoori, B., Mohamaddi, A., Hashemzadeh, S., Shirjang, S., Baradaram, A., Asadi, M., Doustvandi, M.A., Baradaran, B. (2017): *Urtica dioica* extract suppresses miR-21 and metastasis-related genes in breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 93. 95-102. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.021.
- Maródi, L. (szerk) (2016): Fertőző betegségek, Medicina Kiadó, Budapest.
- Mayne ST. (2003): Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *Journal of Nutrition* 133(3), 933S–940S. DOI: 10.1093/jn/133.3.933S.
- McCord, J.M., Fridovich, I. (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal Biology and Chemistry*. 244. 6049–6055.
- Mikaeili, A., Karimi, I., Modaresi, M., Bagherinasab, Z. (2013): Assessment of antidermatophytic activities of *Urtica dioica* L. against *Microsporum canis* in guinea pig model. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6). 997-1002. DOI:10.4314/tjpr.v12i6.19
- Modarresi-Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza-Sulaiman, S., Mousavi, L. (2012): Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista de Biologia Tropical* 60(4). 1567-1576. DOI: 10.15517/rbt.v60i4.2074

- Mona, M.M.Y., Elghandour, Reddy, P.R.K., Salem, A.Z.M., Rreddy, P.P.R., Hyder, I., Barbarosa-Pliego, A., Yavasvini, D. (2018): Plant bioactives and extracts as feed additives in horse nutrition. *Journal of Equine Veterinary science* 69. 66-77. DOI:10.1016/j.jevs.2018.06.004
- Namazi, F., Shomali, T., Taghikhani, P., Nazifi, S. (2018): Protective effect of *Urtica dioica* leaf hydro alcoholic extract against experimentally-induced atherosclerosis in rats. *Avicenna Journal Phytomedicine* 8(3). 254-262.
- Namazi, N., Esfajani, A.T., Heshnati, J., Bahrami, A., Nazamiyeh, H. (2012): A systematic review about effects of aerial portions of *Urtica dioica* (Nettle) on some cardiovascular risk factors in diabetes mellitus. *International Journal of Pharmacology* 8(5). 306-313.
- Nász I. 1982. Mikrobiológia és immunitástan. Bp, Medicina Könyvkiadó, 157-158.
- Nencu, I., Vlase, L., Istudor, V., Dutu, L.E., Gird, C.E. (2012): Preliminary research regarding the therapeutic uses of *Urtica dioica* L. Note I. The polyphenols evaluation. *Farmacia*. 60(4). 493-500.
- Olisova, O.Y., Snarskaya, E. S., Gladko, V.V., Burova, E.P. (2018): Russian traditional medicine in dermatology. *Clinics in Dermatology* 36. 325-337. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2018.03.007.
- Orcic D., Franciskovic M., Bekvalac K., Svircev E., Beara I., Lesjak M., Mimica-Dukic N., (2014): Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry* 143. 48-53. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.07.097.
- Otles, S., Yalcin, B. (2012): Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *The Scientific World Journal*. ID 564367, 12 p. DOI:10.1100/2012/564367
- Oyarzabal, O.A., Backert, S. (szerk) (2012): Microbial Food Safety. New York, *Sprogrner Science + Business Media, LLC*
- Ozkol, H., Musa, D., Tuluca, Y., Koyuncu, I. (2012): Ameliorative influence of *Urtica dioica* L. against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Drug and Chemical Toxicology* 35. 3. 251-257. DOI: 10.3109/01480545.2011.598531
- Patil, V.M., Masand, N. (2019): Anticancer potential of flavonoids: Chemistry, biological activities, and future perspectives. *Studies in Natural Products Chemistry* 59. 401-430.
- Pál T. (2013): Az orvosi mikrobiológia tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt. 978 963 226 353 3
- Pereira, C.G., Meireles, M.A.A. (2010): Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, Applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technology* 3. 340-372. DOI 10.1007/s11947-009-0263-2
- Perera, M.N., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Sulakvelidze, A. (2015): Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiology* 52, 42–48. DOI: 10.1016/j.fm.2015.06.006

- Pesti M. (2001): Általános mikrobiológia. Budapest-Pécs, Dialóg Campus
- Pinelli P., Ieri F., Vignolini P., Bacci L., Baronti S., Romani A. (2008): Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Agricultural and Food Chemistry* 56 (19), 9127-9132 p. DOI:10.1021/jf801552d
- Prior R. L., Cao G. (1999): In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods1. *Free Radical Biology and Medicine*, 27 (11-12) 1173-1181
- Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.-J.E., Komaitis M. (2006): Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95.664-671. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.049
- Qian, W., Fu, Y., Liu, M., Wang T., Zhang, J., Yang, M., Sun Z., Li, X., Li, Y. (2019): In vitro antibacterial activity and mechanism of vanillic acid against Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. *Antibiotics* 8(4) 220. DOI:10.3390/antibiotics8040220
- Rafid, M.A., Hassan Al-Wasfi. H., AL-Kaabee, H.J., Dergham, M., AL-Fatlawy, H. (2012): Studying the hypoglycemia and the antibacterial activity of various plant extract of *Urtica dioica*. *Al-Kufa Journal for Biology* 4(2), 13
- Rajput, P., Chaudhary, M., Sharma, R.A. (2018): Phytochemical and pharmacological importance of genus *Urtica* - A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 9(4). 1387-1396. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(4).1387-96
- Sajfirtova, M., Sovova, H., Opletal, L., Bartlova, M. (2005): Near-critical extraction of β -sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. *Journal of Supercritical Fluids* 35, 111-118. DOI: 10.1016/j.supflu.2004.12.008
- Saklani, S., Chandra, S. (2012): In vitro antimicrobial activity, nutritional profile and phytochemical screening of garhwal Himalaya medicinal plant - *Urtica dioica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review* 3(3.1) 268-272.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., (1983): Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308, 203–206.
- Sharifi-Rad, M., Nazaruk, J., Polito, L., Morais-Braga, M.F.B., Rocha, J.E., et al. (2018): Matricaria genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Microbiological Research* 215, 76-88. DOI:10.1016/j.micres.2018.06.010
- Singh, R., Dar, S.A., Sharma, P. (2012): Antibacterial activity and toxicological evaluation of semi purified hexane extract of *Urtica dioica* leaves. *Research Journal of Medical Plant* 6.(2). 123-135. DOI: 10.3923/rjmp.2012.123.135
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

- Siyukhov, H.R., Skhalyakho, A.A., Tazova, Z.T., Lunina, L.V., Chich S.K. (2018): Scientific justification and development of critical solution for the production of phytocomposite mixtures to enrich nonalcoholic beverages. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10. 1511-1516.
- Sofic, E., Copra-Janicijevic, A., Tahirovic, I., Kroyer, G. (2010): Screening of medical plant extracts for quercetin-3-rutinoside (rutin) in Bosnia and Herzegovina. *Medical Plants*. 2(2). 97-102. DOI: 10.5958/j.0975-4261.2.2.015
- Sova, M. (2012): Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Medicinal Chemistry*. 12(8). 749 – 767. DOI: 10.2174/138955712801264792
- Stanciuc, A.M., Gaspar, A., Moldovan, I., Saviuc, C., Popa, M., Marutescu, L. (2011): In vitro antimicrobial activity of Romanian medicinal plants hydroalcoholic extracts on planktonic and adhered cells. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology* 70 (1) 11-14.
- Stefanovits, B.É., Sárdi, É., Papp, N., Hegedűs, A. (2018): Free radical research at the Department of Applied Chemistry and of Genetic and Plant Breeding, at the Szent István University. *Kaleidoscope Journal of History of Culture, Science and Medicine* 9(16) DOI: 10.17107/KH.2018.16.146-158
- Székely, E. (2012): Opalosodasi.pdf. BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék
- Tóth, L. (2010): Gyógynövények, drogok, fitoterápia. Debreceni Egyetemi Kiadó, 2010. ISBN 978 963 318 029 7
- Tóth, R. (2016): Az opportunistá humánpatogén *Candida parapsilosis* patomechanizmusának molekuláris szabályozottsága. Doktori értekezés SZTE TTIK Mikrobiológia Tanszék
- Ullah, R., Hussain, I., Ahmad, S. (2017): Diocanol: one new phenol derivative isolated and characterized from *Urtica dioica*. *Arabian Journal of Chemistry* 10. 1284-1286. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.03.009
- Upton, R. (DAYU R.H.) (2013): Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of Herbal Medicine*, 3(1) 9-38. DOI: 10.1016/j.hermed.2012.11.001
- Vajic, U.J., Milanovic, G.J., Miloradovic, Z., Jovovic, D., Ivanov, M., Danijela, K., Katarina S., Bugarski, B., Mihailovic-Stanojevic, N. (2018): *Urtica dioica* L. leaf extract modulates blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine* DOI: 10.1016/j.phymed.2018.04.037
- Wagas, M., Ayaz, M., Afridi, S., Ahmad, N., Sohail, M.A., Hayat, A., Ramzan, R., Jadoon, M.A., Rehman, M., Niaz, M. (2016): Antimicrobial activity of *Rumex nepalensis* and *Urtica dioica*. *International Journal of Science and Research* 5.3. 1563-1566.
- Yıldız, L., Baskan, K.S., Tütem, E., Apak, R. (2008): Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta*. 77.1. 304-313. doi: 10.1016/j.talanta.2008.06.028.

M2. Szitaanalízis eredményei

A szitaanalízishez bemért mennyiség minden esetben 100 g volt, ezért a maradvány és maradvány % értékek megegyeznek.

Levél mintáim szemcsemérete (3 párhuzamos mérés)

1. mérés	Csalán levél				
Szita sorszáma	Szita lyukmérete (x) µm	Üres szita tömege gramm	Anyag és szita tömege gramm	Fennmaradt anyag tömege gramm	Maradvány (R) %
1.	800	288,10	294,26	6,16	6,16
2.	630	313,04	328,19	15,15	21,31
3.	500	303,67	322,08	18,41	39,72
4.	425	301,68	311,00	9,32	49,04
5.	315	257,62	272,84	15,22	64,26
6.	250	249,04	258,49	9,45	73,71
7.	125	273,01	287,56	14,55	88,26
8.	45	231,86	238,70	6,84	95,10
9.	0	351,22	354,63	3,41	98,51

2. mérés	Csalán levél				
Szita sorszáma	Szita lyukmérete (x) µm	Üres szita tömege gramm	Anyag és szita tömege gramm	Fennmaradt anyag tömege gramm	Maradvány (R) %
1.	800	288,10	292,61	4,51	4,51
2.	630	313,04	330,14	17,10	21,61
3.	500	303,67	322,72	19,05	40,66
4.	425	301,68	312,32	10,64	51,30
5.	315	257,62	272,52	14,90	66,20
6.	250	249,04	257,82	8,78	74,98
7.	125	273,01	286,47	13,46	88,44
8.	45	231,86	238,11	6,25	94,69
9.	0	351,22	355,21	3,99	98,68

3. mérés	Csalán levél				
Szita sorszáma	Szita lyukmérete (x) µm	Üres szita tömege gramm	Anyag és szita tömege gramm	Fennmaradt anyag tömege gramm	Maradvány (R) %
1.	800	288,10	292,33	4,23	4,23
2.	630	313,04	329,74	16,70	20,93
3.	500	303,67	322,23	18,56	39,49
4.	425	301,68	312,58	10,90	50,39
5.	315	257,62	273,09	15,47	65,86
6.	250	249,04	257,91	8,87	74,73
7.	125	273,01	286,94	13,93	88,66
8.	45	231,86	238,37	6,51	95,17
9.	0	351,22	354,87	3,65	98,82

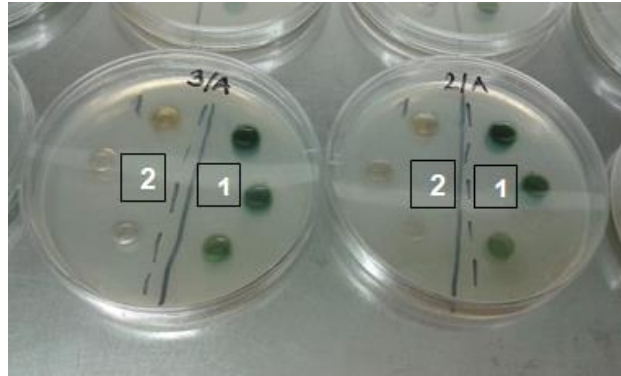
Gyökér mintáim szemcsemérete (3 párhuzamos mérés alapján)

1. mérés		Csalán gyökér			
Szita sorszáma	Szita lyukmérete (x) µm	Üres szita tömege gramm	Anyag és szita tömege gramm	Fennmaradt anyag tömege gramm	Maradvány (R) %
1.	800	288,10	297,68	9,58	9,58
2.	630	313,04	331,23	18,19	27,77
3.	500	303,67	321,93	18,26	46,03
4.	425	301,68	312,49	10,81	56,84
5.	315	257,62	271,54	13,92	70,76
6.	250	249,04	256,92	7,88	78,64
7.	125	273,01	284,39	11,38	90,02
8.	45	231,86	237,98	6,12	96,14
9.	0	351,22	355,06	3,84	99,98

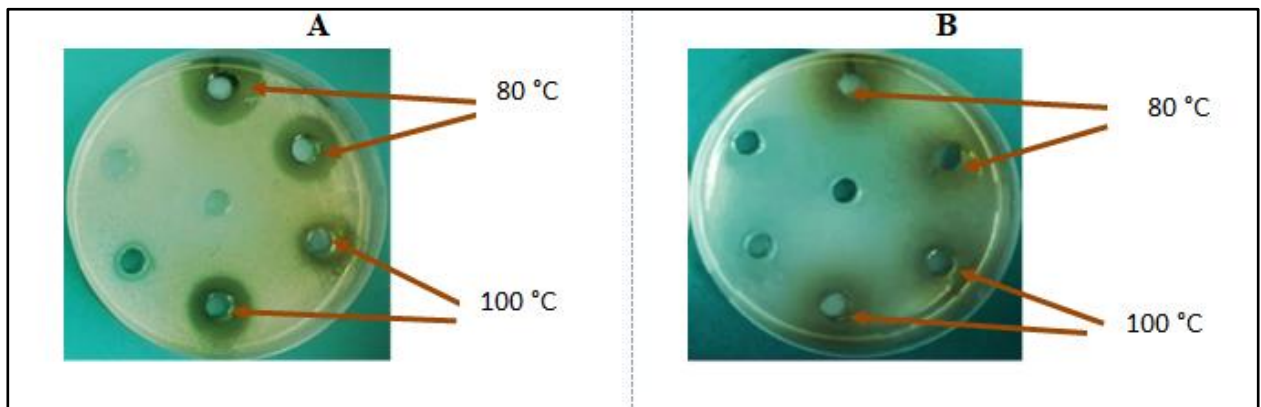
2. mérés		Csalán gyökér			
Szita sorszáma	Szita lyukmérete (x) µm	Üres szita tömege gramm	Anyag és szita tömege gramm	Fennmaradt anyag tömege gramm	Maradvány (R) %
1.	800	288,10	298,95	10,85	10,85
2.	630	313,04	332,46	19,42	30,27
3.	500	303,67	320,08	16,41	46,68
4.	425	301,68	312,56	10,88	57,56
5.	315	257,62	271,15	13,53	71,09
6.	250	249,04	257,08	8,04	79,13
7.	125	273,01	283,71	10,70	89,83
8.	45	231,86	237,34	5,48	95,31
9.	0	351,22	355,04	3,82	99,13

3. mérés		Csalán gyökér			
Szita sorszáma	Szita lyukmérete (x) µm	Üres szita tömege gramm	Anyag és szita tömege gramm	Fennmaradt anyag tömege gramm	Maradvány (R) %
1.	800	288,10	296,68	8,58	8,58
2.	630	313,04	329,30	16,26	24,84
3.	500	303,67	322,14	18,47	43,31
4.	425	301,68	311,75	10,07	53,38
5.	315	257,62	271,22	13,60	66,98
6.	250	249,04	257,43	8,39	75,37
7.	125	273,01	285,62	12,61	87,98
8.	45	231,86	238,14	6,28	94,26
9.	0	351,22	356,19	4,97	99,23

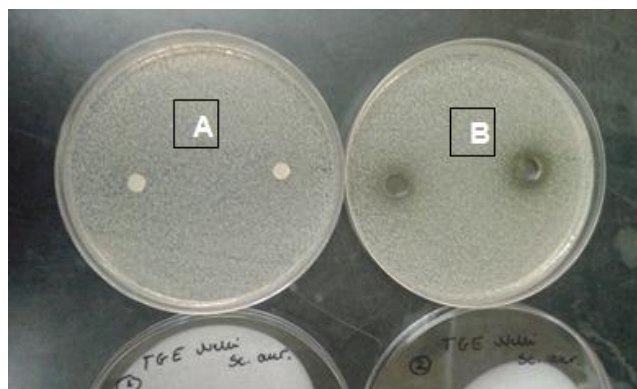
M3. Mikrobiológiai vizsgálatok agarlyuk-, és korongdiffúziós módszerrel



1. ábra. Levél- (1), és gyökér- (2) kivonatok agarlyuk diffúziós vizsgálata inkubálás előtt



2. ábra. A levélkivonatok antimikrobás hatása A/ *Candida glabrata* és B/ *Staphylococcus aureus* mikroorganizmusokra 80 °C-on és 100 °C-on készített vizes extraktumok esetében



3. ábra. Levélkivonat hatása a *Staphylococcus aureus* baktériumra A/ korong-diffúziós és B/ agarlyuk-diffúziós módszerrel

M4. Statisztikai elemzés ANOVA teszttel a friss levél vizes extraktumainak teljes polifenoltartalom mérésének példáján bemutatva

Friss levél április TPC Multiple Comparisons						
Dependent Variable: adat						
LSD						
(I) csoport	(J) csoport	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
tea	60 °C	-5,98017 [*]	1,15100	,000	-8,3811	-3,5792
	80 °C	-8,99400 [*]	1,15100	,000	-11,3949	-6,5931
	100 °C	-11,97283 [*]	1,15100	,000	-14,3738	-9,5719
60 °C	tea	5,98017 [*]	1,15100	,000	3,5792	8,3811
	80 °C	-3,01383 [*]	1,15100	,016	-5,4148	-,6129
	100 °C	-5,99267 [*]	1,15100	,000	-8,3936	-3,5917
80 °C	tea	8,99400 [*]	1,15100	,000	6,5931	11,3949
	60 °C	3,01383 [*]	1,15100	,016	,6129	5,4148
	100 °C	-2,97883 [*]	1,15100	,018	-5,3798	-,5779
100 °C	tea	11,97283 [*]	1,15100	,000	9,5719	14,3738
	60 °C	5,99267 [*]	1,15100	,000	3,5917	8,3936
	80 °C	2,97883 [*]	1,15100	,018	,5779	5,3798

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Friss levél május TPC Multiple Comparisons						
Dependent Variable: adat						
LSD						
(I) csoport	(J) csoport	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
tea	60 °C	2,00017 [*]	,60901	,004	,7298	3,2705
	80 °C	-5,93367 [*]	,60901	,000	-7,2040	-4,6633
	100 °C	-8,25267 [*]	,60901	,000	-9,5230	-6,9823
60 °C	tea	-2,00017 [*]	,60901	,004	-3,2705	-,7298
	80 °C	-7,93383 [*]	,60901	,000	-9,2042	-6,6635
	100 °C	-10,25283 [*]	,60901	,000	-11,5232	-8,9825
80 °C	tea	5,93367 [*]	,60901	,000	4,6633	7,2040
	60 °C	7,93383 [*]	,60901	,000	6,6635	9,2042
	100 °C	-2,31900 [*]	,60901	,001	-3,5894	-1,0486
100 °C	tea	8,25267 [*]	,60901	,000	6,9823	9,5230
	60 °C	10,25283 [*]	,60901	,000	8,9825	11,5232
	80 °C	2,31900 [*]	,60901	,001	1,0486	3,5894

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Friss levél június TPC Multiple Comparisons						
Dependent Variable: adat						
LSD						
(I) csoport	(J) csoport	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
tea	60 °C	-2,13233*	,21901	,000	-2,5892	-1,6755
	80 °C	-5,38350*	,21901	,000	-5,8404	-4,9266
	100 °C	-7,52550*	,21901	,000	-7,9824	-7,0686
60 °C	tea	2,13233*	,21901	,000	1,6755	2,5892
	80 °C	-3,25117*	,21901	,000	-3,7080	-2,7943
	100 °C	-5,39317*	,21901	,000	-5,8500	-4,9363
80 °C	tea	5,38350*	,21901	,000	4,9266	5,8404
	60 °C	3,25117*	,21901	,000	2,7943	3,7080
	100 °C	-2,14200*	,21901	,000	-2,5989	-1,6851
100 °C	tea	7,52550*	,21901	,000	7,0686	7,9824
	60 °C	5,39317*	,21901	,000	4,9363	5,8500
	80 °C	2,14200*	,21901	,000	1,6851	2,5989

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Friss levél október TPC Multiple Comparisons						
Dependent Variable: adat						
LSD						
(I) csoport	(J) csoport	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
tea	60°C	1,05483	,64171	,116	-,2837	2,3934
	80 °C	6,48983*	,64171	,000	5,1513	7,8284
	°C	10,45667*	,64171	,000	9,1181	11,7952
60°C	tea	-1,05483	,64171	,116	-2,3934	,2837
	80 °C	5,43500*	,64171	,000	4,0964	6,7736
	°C	9,40183*	,64171	,000	8,0633	10,7404
80 °C	tea	-6,48983*	,64171	,000	-7,8284	-5,1513
	60°C	-5,43500*	,64171	,000	-6,7736	-4,0964
	°C	3,96683*	,64171	,000	2,6283	5,3054
°C	tea	-10,45667*	,64171	,000	-11,7952	-9,1181
	60°C	-9,40183*	,64171	,000	-10,7404	-8,0633
	80 °C	-3,96683*	,64171	,000	-5,3054	-2,6283

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Publikációs Lista

IF-os folyóiratcikkek

1. Kornélia Kőszegi, Gyula Vatai, Erika Békássy-Molnár: Comparison the Soxhlet and supercritical fluid extraction of nettle root (*Urtica dioica* L.). *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 59(3), 168-173. (2015). DOI: 10.3311/PPch.7582 IF: 0.84
2. Arijit Nath, Máté András Molnár, Attila Csighy, Kornélia Kőszegi, Ildikó Galambos, Klára Pásztorné Huszár, András Koris and Gyula Vatai: Biological activities of lactose-based prebiotics and symbiosis with probiotics on controlling osteoporosis, blood-lipid and glucose levels. Review. *Medicina* 54(6), 98 (2018). DOI: 10.3390/medicina5406009 IF: 1,467
3. Kornélia Kőszegi, Erika Békássy-Molnár, Noémi Koczka, Tímea Kerner, Éva Stefanovits-Bányai: Changes in total polyphenol content and antioxidant capacity of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) from spring to autumn. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* DOI: [https:// doi.org/ 10.3311/PPch.14338](https://doi.org/10.3311/PPch.14338) (2019). IF: 1.248

NEM IF-os folyóiratcikk, idegen nyelv

Kornelia Koszegi, Joseph Michael Kocsis, Gyula Vatai, Erika Bekassy-Molnar: Antimicrobial effects of the Stinging Nettle (*Urtica Dioica* L.). Review. *Analecta Technica Szegedinensia* 11(2) 10-15. (2017)

Magyar nyelvű könyv részlet

Békássyné Dr.Molnár Erika, Dr.Friedrich László, Galicz István, Dr.Hitka Géza, Kőszegi Lászlóné, Nágl Péter, Pásztorné Dr.Huszár Klára, Stégerné Dr.Máté Mónika, Török Zita
Módszertani Füzet VII. Szemelvények az élelmiszeripari technológiák oktatásának módszertanáról Budapesti Corvinus Egyetem (2015) 2,1 ív

Magyar nyelvű konferencia kiadvány (teljes)

Terék O., Papp I., Honfi P., Jámborné Benczúr E., Kőszegi L.né., Máthé Á.: Előzetes eredmények a 'Bacardi' krizantémfajta fotoszintézissel kapcsolatos posztharveszt folyamatairól különböző tartósító oldatok esetén., „Hagyomány és haladás a növénynevelésben“ XV. Növénynevelési Tudományos Napok 2009. március 17. MTA Agártudományok Osztályának Növénynevelési Bizottsága p. 482-486., (2009).

Magyar nyelvű konferencia kiadvány (összefoglaló)

1. Kőszegi Lászlóné, Fogarassy Eszter, Békássy Molnár Erika, Vatai Gyula: A must sűrítése során alkalmazott membránszűrési eljárások optimális megvalósításának tervezése „Műszaki Kémiai Napok’2011. Veszprém.” 2011. április 27-29. Poszter Konferenciakiadvány p: 264
2. Kőszegi K., Galambos I., Békássy-Molnár E., Vatai Gy.: Komplex eljárás ivóvíz előállítására nagy arzén- és huminsav-tartalmú kútvízből (Kísérleti terv, első eredmények) „Műszaki Kémiai Napok’2012. Veszprém.” 2012. április 24-26. Konferencia előadás. Konferenciakiadvány p: 22.

Nemzetközi konferencia kiadvány (teljes)

1. K. Koszegi, G. Gurin, I. Galambos, Gy. Vatai, E. Bekassy-Molnar: Industrial application of GEH package for coexistent removal of arsenic and humic acid. PERMEA 15-19 September 2013 Warsaw, Poland. Angol nyelvű konferencia előadás Konferenciakiadvány p: E6-E14
2. Kőszegi K., Simándi B, Vatai Gy, Békassy-Molnár E. Extraction of the active substances of the stinging nettle (*Urtica Dioica* L.) by Soxhlet- and supercritical extraction
Élelmiszertudományi Konferencia 2013. november 7-8. Budapest, Magyarország, BCE 1118 Budapest, Villányi út 35-43. magyar nyelvű konferencia előadás Konferenciakiadvány p: 84-87
3. Koszegi K., Simandi B., Vatai Gy., Bekassy-Molnar E.: Comparison the Soxhlet- and supercritical fluid extraction of nettle root (*Urtica dioica* L.) „Műszaki Kémiai Napok” 2014. Veszprém 2014. május 14-16. Angol nyelvű konferencia előadás. Konferenciakiadvány p: 82-88.
4. Koszegi Kornelia, Kocsis Joseph Michael, Vatai Gyula, Bekassy-Molnar Erika: Antimicrobial effects of the Stinging nettle (*Urtica dioica* L.). Proceedings of 1st International Conference on Biosystems and Food Engineering, Budapest (2016), ISBN 978-963-269-598-3, PDF E125. p:7

Nemzetközi konferencia kiadvány (összefoglaló)

1. Fogarassy E., Koszegi K., Bekassy S., Bekassy Molnar E., Vatai Gy.: Optimization of grape juice concentration by using multistep membrane technique. Training Nanostructured materials and membranes for Energy. Lilleström, Norvégia (2009). Poster (angol nyelven).
2. Koszegi K., Simandi B., Vatai Gy., Bekassy-Molnar E.: Examining the effectiveness of different extractions using nettle leaf. The Scientific board of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists 21 to 24 October 2014 in Opatija, Croatia. Poster (angol nyelven)
3. Kőszegi K., Békássy-Molnár E., Stefanovits-Bányai É., Szabó P., Végvári Gy., Maráz A.: Chemical composition and antimicrobial effect of aqueous and ethanolic extracts of stinging

nettle (*Urtica dioica* L.). 2nd International Conference on Biosystems and Food Engineering Budapest, 2018. június 8. Angol nyelvű konferencia kiadvány

4. Kornélia Kőszegi, Éva Stefanovits-Bányai, Tímea Kerner, Erika Békássy-Molnár: Stinging nettle extract health benefits -A comparative analysis Young Researchers'International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE II) Budapest, 2018. május 3-5. Angol nyelvű konferencia kiadvány 66

5. Kőszegi K, Végvári Gy, Békássy-Molnár E, Maráz A.: Characterization of phenolic compounds of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) extracts by HPLC analysis and determination of their antimicrobial activity. 3rd International Conference on Biosystems and Food Engineering, Budapest on 4th of December, 2019. Angol nyelvű konferencia kiadvány, PDF E231, 1

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek és barátnőmnek Békássyné dr. Molnár Erika tanárnőnek áldozatos munkájáért. Köszönöm, hogy 2002. óta szünet nélkül mellettem állt -és áll most is- segített, bátorított úgy, hogy sohasem adta fel. Közös küzdelmünkkel életem piros betűs részévé vált.

Nagy hálával tartozom Stefanovitsné Dr. Bányai Éva tanárnőnek, konzulensemnek, aki mellém állt elkeseredettségemben, és hatalmas erővel, kitartással és áldozatos, hosszú napokat igénylő vidám, de kemény munkával segített összeállítani analitikai eredményeimet és megírni második impakt faktoros cikkem.

Nagy köszönettel tartozom Dr. Maráz Anna tanárnőnek, aki konzulensként megszerettette velem a mikrobiológiát. Közös sokszor este ½ 10-ig tartó kísérleteink emlékeztetések maradnak számomra. Köszönöm Mohácsiné Dr. Farkas Csilla tanárnőnek és Mikrobiológia tanszék munkatársainak a sok segítséget.

Dr. Vatai Gyula tanár úrra mindig számíthattam, mert bízott bennem. Köszönöm azt a sok segítséget és lehetőséget amit kaptam tőle munkám során.

Nagy köszönettel tartozom Dr. Vozáry Eszter tanárnőnek, aki szintén sok napot szánt arra, hogy eligazítson a statisztika útvesztőjében.

Köszönettel tartozom Dr. Amtmann Mária tanárnőnek HPLC-s mérésém kiértékelésében adott segítségével. Ugyancsak HPLC-s méréseimben nyújtottak hatalmas segítséget Dr. Végváry György tanár úr, a Kaposvári Egyetem intézetigazgatója és Dr. Szabó Pál úr tudományos főmunkatárs (MTA TTK) Köszönet érte.

Hálás köszönettel tartozom †Dr. Simándi Béla tanár úrnak azért, hogy erejét meghaladva segített amíg csak tudott.

Köszönetet mondok Dr. Blázovics Anna tanárnőnek SOTE-n végzett kísérleteim biztosításához, Dr. Kleiner Dénesnek (SOTE) analitikai méréseimhez nyújtott segítségével, Dr. Plander Szabinának a BME-n végzett kísérleteimhez nyújtott segítségével, és természetesen Benkéné Lődy Ilonának aki a szuperkritikus extrakciós méréseimnél mindvégig mellettem állt, és nagyon sokat tanultam tőle.

Köszönöm †Dr. Márki Edit tanszékvezetőmnek és Gudor Enikőnek, hogy hozzájárultak munkám nyugodt elvégzéséhez.

Köszönöm Molnár Máté munkatársamnak, hogy bármikor kérhettem tőle segítséget, akkor is, amikor a munkáját kellett félbe szakítania miattam.

Köszönöm Dr. Arijit Nathnak a folyamatos biztatását és támogatását.

Ezen kívül szeretném megköszönni az Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék minden jelenlegi és volt dolgozójának az évek alatt nyújtott sok-sok segítséget és a közös munkát.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Családomnak, Barátaimnak, Bandi bácsinak és azoknak a kiváló embereknek biztató, megértő és kitartó támogatását, akik kérték, hogy ne említsem meg őket dolgozatomban.

Omnia ad maiorem Dei gloriam

