

DEBRECENI EGYETEM
TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

Prof. Dr. Szilvássy Zoltán
egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető:

Dr. Domokos-Szabolcsy Éva
egyetemi docens

A LUCERNA LEVÉLFEHÉRJE-KONCENTRÁTUM ELŐÁLLÍTÁSA, ÉRTÉKNÖVELÉSI
LEHETŐSÉGE SZELÉN FORTIFIKÁLÁSSAL

Készítette:

Kovács Zoltán
doktorjelölt

Debrecen

2023

A LUCERNA LEVÉLFEHÉRJE-KONCENTRÁTUM ELŐÁLLÍTÁSA, ÉRTÉKNÖVELÉSI
LEHETŐSÉGE SZELEN FORTIFIKÁLÁSSAL

Értekezés doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az élelmiszertudományok tudományágban

Írta: KOVÁCS ZOLTÁN okleveles biotechnológus (MSc)

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola
(Élelmiszertudományi doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Domokos-Szabolcsy Éva Ph.D.

Az értekezés bírálói:	fokozat	aláírás
.....		
.....		
A bírálóbizottság:	fokozat	aláírás
elnök:		
.....		
tagok:		
.....		
.....		
.....		
.....		

Az értekezés védésének időpontja: 20...

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	8
2. CÉLKITŰZÉS.....	10
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1 A fehérjeellátás kérdése.....	11
3.2 Magalapú fehérjeforrások.....	12
3.3 A zöld fehérje	14
3.3.1 A zöld biomassa legfontosabb fehérjei	16
3.3.2 Zöld alapú fehérjehasznosítás, a zöld biofinomítás koncepciójának kialakulása	17
3.3.3 Zöld biofinomítás - Green biorefinery	19
3.3.4 A lucerna, mint a zöld biofinomítók egyik legfontosabb alapanyaga.....	22
3.3.5 Levélfehérje kinyerési módszerek és alkalmazások	22
3.3.6 Zöld biofinomítás illeszkedése a körforgásos gazdálkodás filozófiájába.....	26
3.4 A szelén általános jellemzői és szerepe az élővilágban.....	28
3.4.1 Szelén felfedezése és általános kémiai jellemzői.....	28
3.4.2 Szelénformák a természetben és antropogén környezetben.....	28
3.4.3 A globalizáció, klímaváltozás és a szelén kapcsolata	30
3.4.4 A szelén élettani szerepe	30
3.4.4.1 Selenoproteinek	31
3.4.4.2 Szelénnel összefüggő betegségek.....	32
3.4.5 Szelén a növényvilágban.....	34
3.4.5.1 Szelénformák felvétele a növényekben	36
3.4.6 A szelén a takarmányozásban és élelmiszeriparban	37
3.4.6.1 Takarmányok szelénkiegészítése	37
3.4.6.2 Szelén az élelmiszerekben, táplálékkiegészítőkben	39
3.4.7 A szeléndúsítás (<i>fortification</i>).....	41
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	44
4.1 Kísérleti beállítások	44
4.1.1 Tenyészedényes lucerna kísérlet, szelénkezelések és a mintavétel (betakarítás) módja.....	45
4.1.2 Szabadföldi lucernatermesztés kísérleti beállításai és az alkalmazott szelénkezelések	47
4.4 A vörös elemi szelénszol előállítása és karakterizálása.....	48

4.5 Zöld biomassa betakarítás és feldolgozása a tenyészedényes és kisparcellás kísérletből	51
4.6 Teljes szeléntartalom meghatározás	53
4.7 Szelénspeciáció mérések	54
4.8 Nyersfehérje-meghatározás	56
4.9 Aminosavösszetétel-meghatározás	56
4.10 Összes fenoloskomponens-tartalom és fitonutriensek kvalitatív, kvantitatív meghatározása	56
4.10.1 Összes fenoloskomponens-tartalom meghatározás.....	56
4.10.2 Fitonutriensek kvalitatív és kvantitatív meghatározása	57
4.11 Statisztikai értékelés és ábravizualizáció.....	58
5. EREDMÉNYEK	59
5.1 Szeléndúsított tenyészedényes lucernanövények jellemzése.....	59
5.2 Szabadföldi lucernakísérlet betakarítható biomassa eredményei	62
5.3 Szelénkezelt-lucernafrakcionálás eredményei.....	63
5.4 Szárazanyagtartalom-eredmények a tenyészedényes lucernakísérletben.....	65
5.5 Szárazanyagtartalom-eredmények a szabadföldi lucernakísérletben	66
5.6 Lucernaeredetű frakciók pH-és Brix-értékei	67
5.7 Nyersfehérje-tartalom és aminosav-összetétel szeléndúsított lucernafrakciókban.....	69
5.7.1 Nyersfehérje-tartalom eredmények a tenyészedényes kísérletből	69
5.7.2 A szabadföldi kísérlet nyersfehérje-tartalom eredményei	73
5.7.3 Proteinogén aminosavak kvantitatív értékelése	75
5.8 Szeléntartalom és szelénspeciáció-mérések eredményei.....	77
5.8.1 Teljes szeléntartalom-eredmények a tenyészedényes kísérletben	77
5.8.1.1 A lucernaszár és -levélminták teljes szeléntartalom-eredményei tenyészedényes kísérletben	78
5.8.1.2 Zöld frakciók teljes szeléntartalom-eredményei a tenyészedényes kísérletben	80
5.8.1.3 A szabadföldi lucerna kísérlet során nyert rost, levélfehérje-koncentrátum (LFK), és barnalé teljes szeléntartalma	85
5.8.2 Szelénspeciáció mérés eredmények	86
5.8.2.1 A lucernalevél és szár szelénspeciáció-eredményei.....	87
5.8.2.2 A zöld frakcionált levélfehérje-koncentrátum (LFK), rost és barnalé szelénspeciáció-eredményei	88
5.9 Fitonutriensek és fenolos komponensek szeléndúsított lucerna-frakciókban.....	91
5.9.1 Kvalitatív vizsgálatok, a lucernafrakciók fitonutriens-profiljának megállapítása ...	92
5.9.2 Kvantitatív fitonutriens-vizsgálatok eredményei	95

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	99
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	103
8. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK	104
9. ÖSSZEFOGLALÁS.....	105
10. SUMMARY	108
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	111
12. IRODALOM	112
13. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	140
14. NYILATKOZATOK.....	145
15. MELLÉKLETEK.....	146

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFS	atomfluoreszcens spektrometria
CRM	kanadai referencia anyag, megfelel a Kanadai Nemzeti Metrológiai Intézet specifikációinak
Cys	cisztein
DMDSe	dimetil-diszelenid
DMS _e	dimetil-szelenid
EFL	<i>lucerne leaf extract</i> (lucernalevél-kivonat)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Élelmészeti és Mezőgazdasági Világszervezet)
GAE	galluszsav-egyenérték
HPLC-ICP-MS	nagynyomású folyadék-kromatográfia- induktív csatolású plazma- tömegspektrométer
LFK/LPC	levélfehérje-koncentrátum/ <i>leaf protein concentrate</i>
LC-ESI-MS	folyadék-kromatográfia-elektrospray ionizáció- tömegspektrometria kapcsolt analitikai rendszer
LC-MS	folyadék-kromatográfia-tömegspektrometria
Met	metionin
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
MSeCys	metilszelenocisztein
PTFE	politetrafluoretilén
RPI	RuBisCO protein izolátum
RuBisCO	Ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz-oxigenáz
SARS-CoV-2	súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus 6 (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 6</i>)

SARS-CoV-2 S1	SARS-CoV-2 receptor kötő glikoprotein S1
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis
Se(VI)	szelenát
Se(IV)	szelenit
Se ⁰	vörös elemi szelén
Se ²⁻	szelenid
SELM-1	szeléndúsított élesztő referenciaanyag (<i>Selenium enriched yeast certified reference material</i>)
SCP	egysejtfehérje (<i>single cell protein</i>)
SeCys	szelenocisztein
SECIS	szelenocisztein inszerciós szekvencia (<i>selenocysteine insertion sequence</i>)
SeMet	szelenometionin
UGA	uracil-guanin-adenin bázis triplet
WMD	<i>White muscle disease</i> (fehérizom-betegség)

1. BEVEZETÉS

A globalizálódó, növekvő népesség és a források egyenlőtlen eloszlása következtében új, innovatív alternatívák jelennek meg a kielégítő fehérje- és ásványianyag-ellátás fenntartásához. Nagy nyomás nehezedik a mezőgazdaságra mivel több élelmiszert és jobb minőségben szükséges előállítani a források és nyersanyagok kimerülése, degradációja mellett. Doktori értekezésemben a fehérje- és szelénellátás összekapcsolásának alternatív megoldását vizsgálom.

A szelén különleges tulajdonságokkal rendelkező elem a környezetünkben. Többféle oxidációs állapotban és vegyi formában fordul elő a földi körülmények között. Ezek a tulajdonságai, illetve a kénnel mutatott analógiája révén aktív szereppel bír az élő szervezetek felépítésében. Egyes taxonokban esszenciális mikroelem, azonban nem egyértelmű pótolhatatlan szerepe más élőlénycsoportokban. A humán genomban 136 annotált szeléntartalmú fehérjét ismerünk (*SelenoDB*, 2023), melyekbe a proteinogén szelenocisztein (SeCys) aminosav beépül. Mikroelemként a szelén iránti igény szűk tartományban mozog, a hiánytüneteket okozó, illetve a toxikus mennyiség között egy nagyságrendnyi határ húzódik. Az ajánlott napi bevitel 55 µg, de nem lehet több 400 µg-nál (*National Research Council (US) Subcommittee on Selenium*, 1983). A földkéregben található egyenlőtlen eloszlása révén a különböző földrajzi területeken élők között szelén-alultápláltság okozta megbetegedések és krónikus szelénmérgezések is előfordulnak. A szárazföldi táplálékláncban a növények a szelén elsődleges forrásai, a szervetlen tápanyagokkal együtt a talajból veszik fel és részben szerves formákká alakítják. A kén metabolizmushoz kötődve a szulfát transzporterekén keresztül a növények a szelenát-iont (SeO_4^{2-}) aktív formában veszik fel leggyorsabban a talajoldatból. Ezzel együtt más szervetlen és szerves formák, mint a szelenit és szelenometionin felvétele is ismert, nemcsak gyökéren, hanem leveleken keresztül is.

A növények azonban nem csak a szelén metabolizmusuk miatt érdekesek/értékesek a táplálékláncban. A növények primer produkciója révén keletkező biomassza a történelem kezdete óta nyersanyagként szolgál a takarmányozásban és humán ételmezésben. A mezőgazdasági igények és a technológia fejlődésével együtt a múlt század végére olyan újszerű, innovatív hasznosítási módok is elterjedtek melyek, a kőolaj-finomítás elveit figyelembe véve, működésük során a friss, frakcionált növényi biomasszából minél nagyobb hozzáadott értékű termékek, ipari alapanyagok előállítását végzik rentábilis módon, minimalizálva a hulladékképződést. A zöld biofinomítás alapanyagai lehetnek célzottan termesztett növények

lág, nedves föld feletti vegetatív szervei, mint a lucerna, fűfélék, zöldgabonák friss hajtása vagy a belőlük készített fermentált szilázs és szenázs. Az ajánlott fajok mellett a kertészeti/mezőgazdasági növénytermesztés során képződött zöld hulladéknak is nagy relevanciája van.

A zöld biomasszában található egyik legértékesebb biomolekula a fehérje, melynek minél hatékonyabb kinyerésére irányulnak a technológiai fejlesztések. A feldolgozási módszertől függően a koncentrált zöldfehérje szolgálhat takarmány- vagy élelmiszer-fehérjeként is. A levélfehérje-koncentrátum mellett az alap technológiai sor fizikai és kémiai lépéseivel kiperéselt növényi rostfrakciót és barna színű növényi savót, más néven barnalevet kapunk nagy mennyiségben. A kutatási szintről a gyakorlatban megvalósított zöld biofinomítók nagy hányada mérsékelt éghővön, Európában és Észak-Amerikában működik. A klimatikus adottságokat figyelembe véve itt az egyik legígéretesebb növényfaj a lucerna (*Medicago sativa* L.). Fehérjetartalma 20 % is lehet (szénában), évelő, évente többször betakarítható, öntözés és növényvédelem nélkül is termesztethető.

A fehérje mellett a frakcionált zöld biomasszában, belőlük készített termékjelöltekben értéket képviselnek a makro-, és mikroelemek is. Humán- és állategészségügyi szempontból a mikroelemeknek köztük a cinknek, jódnak, vasnak és a szelénnek van különös jelentősége. Az egyes elemek növényen belüli felhalmozódását részben a genetikai tényezők, részben a környezetből való hozzáférhetőségük befolyásolja. Ahol nem elégséges a táplálékláncba került mikroelemek mennyisége, ott segítséget jelenthet a hatékonyabb elemfelvételt célzó növénynevelés és az agronómiai dúsítás (*fortification*). A fortifikálás révén, a zöld vegetatív növényi szövetekben megnövelt elemek koncentrációja növelheti az értékét az előállított termékeknek is, ha a zöld biofinomítás felől közelítünk a kérdéshez.

Jelen doktori munkában összefoglalom a zöld biofinomítás és az agronómiai szeléndúsítás (*fortification*) összekapcsolásának lehetőségét vizsgáló kutatást. A lucerna, mint elterjedt zöldbiomassza-növény egy vegetációs időszakon belül többször betakarítható, így a betakarításonkénti szelénakkumuláció és annak hatása más, értékmérő paraméterekre különösen érdekes a dúsítási módszer szempontjából.

Vizsgálataink során három különböző szervetlen szelénformával (szelenát, szelenit, vörös elemi szelén) végeztünk talajkezelést eltérő koncentrációkban (5, 10, 50 mg/kg) tenyészedényes lucernakultúrában. A szelénkezeléseket követően egymás után 4 alkalommal takarítottuk be a friss lucerna-biomasszát és a zöld biofinomításnak megfelelő technológiával

feldolgoztuk, így présrost-, levélfehérje-koncentrátum- (LFK) és barnalé-frakciókat kaptunk. Vizsgáltuk a különböző szelénformák hatását a lucerna föld feletti részeire és a biofinomítás-frakciókra. A tenyészedényes eredmények alapján szabadföldi kisparcellás kísérletet állítottunk be a három vizsgált szelénformával. Az eredmények pontosabb képet mutatnak a szeléndúsítás és zöld biofinomítás összefüggéseiről, kihozatalra gyakorolt hatásáról.

2. CÉLKITŰZÉS

Szeléndúsított növények termék célú zöld biofinomítással történő feldolgozása több nemzetközi szervezet által megfogalmazott, egymással átfedő, fenntartható fejlődési célok és irányelvek megvalósításába illeszthető be. Az Egyesült Nemzetek Szervezetének 17 pontban összefoglalt Fenntartható Fejlődési Céljai (*Sustainable Development Goals*), az Európai zöld megállapodás és a FAO Stratégiai keret (*Strategic Framework*) 2022-31 céljai között található kapcsolódási pontok a zöld biofinomítás számára. Munkánk újszerűségét támasztja alá, hogy a *ScienceDirect* adatbázis „green biorefinery” és „selenium fortification” keresőszavakra 0 rekordot, a *Google Scholar* pedig 1 eredményt talál az elérhető internetes forrásokban 2023. januári lekérdezés alapján.

A doktori kutatás célkitűzései:

Zárt, tenyészedényes körülmények között vizsgáltuk az agronómiai szelénutánpótlás lehetőségét lucernában (*Medicago sativa* L.) három szerves szelénformát összehasonlítva. A kezelt növényeket pedig zöld biofinomítással feldolgoztuk. Ehhez kapcsolódóan az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Kémiai formától és dózistól függően, a szeléndúsítás milyen hatást gyakorol az évelő takarmánynövény, lucerna növekedésére és a zöld biofinomítás lépéssorait követve befolyásolja-e a kinyert frakciók arányát és kihozatalát?
- Melyik szerves szelénforma és koncentráció az, amely optimális növénytermesztési szempontból és ezzel együtt felhasználási szempontból?
- A fortifikálás során, a lucernában milyen formákban halmozódik fel a talajból felvett szerves szelén, és ezek a *speciess*ek hogyan oszlanak meg a feldolgozott lucernafrakciókban?
- Hogyan befolyásolja az alkalmazott szelénforma és a koncentráció a szelén szerves módosulatokba épülését lucernában?

- A szelén fortifikálás befolyásolja-e a lucernából előállított frakciók/termékjelöltek fehérjetartalmát, illetve fitokémiai összetételét?
- A tenyészedényes kísérletek eredményeit figyelembe véve, szabadföldi, kisparcellás körülmények között, milyen, gyakorlati szempontból relevánsabb eredményekre számíthatunk?

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A fehérjeellátás kérdése

Becslések szerint a Föld népessége 2050-re eléri a 9,5 milliárd főt (*Roberts, 2011*). Számos tudományos kutatás keresi az alternatív megoldásokat arra a kérdésre, hogyan fogunk megfelelő minőségű és mennyiségű étellemmel ellátni egy növekvő populációt (*Godfray et al., 2010*), a véges és csökkenő megművelhető mezőgazdasági területek és a klímaváltozás kihívásainak tükrében (*Searchinger et al., 2014*). Az egészséges étrendhez az összetett szénhidrátok, telítetlen és telített zsírok, olajok, vitaminok és ásványi anyagok fogyasztása mellett a megfelelő fehérjebevitel is elengedhetetlen (*Willett et al., 1995*). A fehérjetartalom kulcseleme a nitrogén melynek széles körű hozzáférhetőségét tette lehetővé a kémiai Nobel-díjas, Haber-Bosch szintézis (*Smil, 1999*). A 450 °C fokon, 200-300 bar nyomáson lezajló reakcióba nitrogénből és hidrogénből előállított ammónia 80%-át a mezőgazdaság használja fel (*Erisman et al., 2008*).

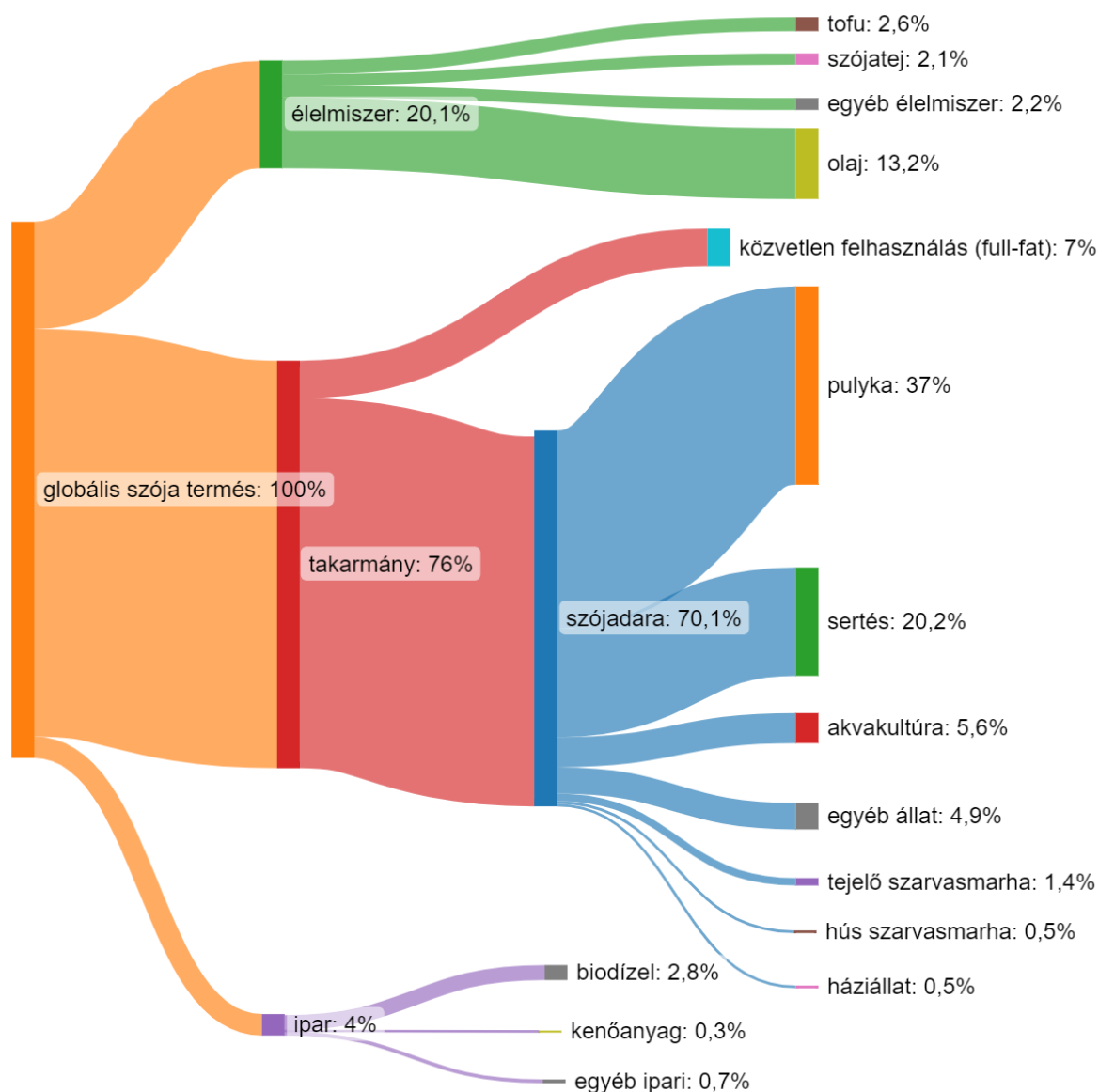
Mégis az élelmezés egyik szűk keresztmetszete a fehérjeellátás, az élő és élettelen környezet komplexitásából adódóan. A magas biológiai értékű állati fehérje előállítása nagy energia befektetéssel, termőföld használatával és ivóvíz felhasználással jár (*Pimentel & Pimentel, 2003*), ebből kifolyólag a fejlődő országok élelmiszer-ellátásában kisebb hányadot tesznek ki az állati fehérjék. Ehhez járul még hozzá a tengeri halászatból származó fehérje (*Tacon, 2022*). További konvencionális fehérjeforrások közé tartoznak a gombák és a növényi magvak, beleértve a gabonafélék, hüvelyesek, diófélék magjait, terméseit. A hagyományos fehérjeellátási-lánc szereplői mellett azonban növekszik az érdeklődés az alternatív források iránt, úgymint a rovarfehérje, algafehérje és az egysejt fehérje (SCP) (*Matos, 2019; Mézes, 2018*). A fejlődő országokban a megfelelő mennyiségű és minőségű étel elérése napjainkban sem megoldott (*Sanchez, 2002*), az 1980-as években, a médiában nagy port kavart éhezés az afrikai országokban továbbra is fennáll (*Glantz, 1987*), a klímaváltozás következtében pedig egyes területeken súlyosbodott (*Coly, 2022*).

3.2 Magalapú fehérjeforrások

A népesség jelentős többsége (kb. 4 milliárd fő) ma is növényialapú fehérjeforrásokból elégíti ki szükségleteit (Sabaté & Soret, 2014). A növényi fehérjeforrások döntő hányada magalapú. A *Poaceae* családba tartozó gabonafélék alapvető jelentőséggel bírnak, bár alacsonyabb fajlagos fehérjetartalommal rendelkeznek. Jellemzően a búza (*Triticum aestivum* L.) szemtermés fehérjetartalma 11-18 % között változik, míg a kukorica (*Zea mays* L.) 7-9%, a rizs (*Oryza sativa* L.) pedig átlagosan 8% nyersfehérjét tartalmaz (Pepó & Sárvári, 2011). A mennyiségi jellemzők mellett lényeges említést tenni arról is, hogy a búza, rozs (*Secale cereale* L.) és árpa (*Hordeum vulgare* L.) allergén gliadin és glutén fehérjéi hátrányt jelentenek az élelmiszeripari alkalmazásuk során (Baumgartner et al., 2007). A nagymagvú hüvelyesek botanikai szempontból a hüvelyesek, *Fabaceae* családjába tartoznak. Magasabb fehérjetartalmuknak köszönhetően fontos népelelmezési szerepet töltenek be trópusi, szubtrópusi országokban (Akibode & Maredia, 2012). Indiában éves szinten több mint 10 millió tonnát fogyasztanak hüvelyes magokból (Kay, 1979; Singh et al., 2015). A 20-28% fehérjetartalmú csicseriborsó, lóbab, borsó és lencse lizinben (1,30-2,13%), argininben és leucinben gazdag termékek, és képesek a humán esszenciális aminosavigényt kielégíteni. Ezzel együtt kéntartalmú aminosavakban (Met: 0,20-0,37%, Cys: 0,18-0,38%) és triptofánban (0,19-0,29%) jellemzően szegények (Comai et al., 2007; Iqbal et al., 2006; Tiwari & Singh, 2012). A hüvelyesek magjaiban található fehérjék három csoportba sorolhatók: tartalékfehérjék, biológiailag aktív fehérjék és allergén fehérjék. Közöttük vannak humán egészségügyi szempontból negatív hatásúak. Ilyenek az antinutritív tulajdonságokkal bíró, enzim inhibitorok (tripszin, kimotripszin inhibitorok) és lektinek, valamint az allergiás reakciót kiváltó glikoproteinek (Parca et al., 2018; Tiwari & Singh, 2012).

Külön említést érdemel a *Faboideae* alcsalád élelmiszer és takarmány szempontból legfontosabb növényfaja, a 35-40% fehérjetartalommal és kedvező aminosav összetétellel rendelkező szója (*Glycine max* L.). Antinutritív anyagai miatt azonban nem célszerű feldolgozatlan formában fogyasztani vagy takarmányozási célokra hasznosítani hasonlóan a többi hüvelyeshez. A FAO szerinti kategorizálás alapján a szója a magas olajtartalmú hüvelyesek közé tartozik. Fehérjeit – takarmányozási célokra – elsősorban az olajtartalom extrahálását követően nyerik vissza, préselt maradványként (Fébel, 2018). Elterjedt még a hidrotermikus kezeléssel előállított teljes olajtartalmú szója. A szójafehérje feldolgozott élelmiszerek legnépszerűbb növényifehérje-összetevője. Különösen a keleti kultúrákat figyelembe véve, a szója élelmiszerként való felhasználásának változatos módjai ismertek. A

globális termelést és felhasználást tekintve azonban a megtermelt szója döntő hányadát, 76%-át használjuk haszonállatok takarmányozására (1. ábra) közvetlenül élelmiszerekbe csak 20%-a kerül.



1. ábra: A globális szójafelhasználás százalékos megoszlása 2017-2019 között

(saját szerk. (Fraanje & Garnett 2020)).

Globalizált világunkban a kontinensek közötti szállítására és a kikötők közelében történő azonnali feldolgozására berendezkedett gazdaság gördülékenyen képes szójababbal ellátni szinte bármelyik országot (Jia et al., 2020; Popp et al., 2015, 2018). A szója monopolhelyezete azonban a kiszolgáltatottság veszélyét is magában rejti, kimondottan a hazánkhoz hasonló,

importra szoruló országok esetében (Zsombik, 2018). Az állattenyésztés/ takarmányozás költségeinek döntő hányadát teszi ki a megfelelő mennyiségű és minőségű fehérje biztosítása. Így a kiszolgáltatottság mérséklése érdekében alternatív megoldásokat kell keresnünk (Popp *et al.*, 2015, 2018). Klímánkon a napraforgó (*Helianthus annuus* L.) és a repce (*Brassica napus* L.) jelentősége is említésre méltó, mint takarmányfehérje-forrás (Orosz & Tóth, 2016).

3.3 A zöld fehérje

Fehérjefelhalmozódás tekintetében a termés/mag mellett, a földfeletti vegetatív szervek (leveles szár) is figyelmet érdemelnek, bár fajlagos fehérjetartalmuk alulmarad a szójamaghoz viszonyítva. Fajtól függően széles határok között változik proteintartalmuk, ahogy az 1. táblázatban látható.

Nagy előnyük azonban, hogy moduláris szerveződésük révén a leveles szár regenerációra képes. Ezt kihasználva az olyan évelő, többször betakarítható növény, mint például a lucerna, összességében 3-10-szer több fehérjét szolgáltathat, mint az évi egyszer betakarítható szójabab (Popp *et al.*, 2016; Fári, 2018a).

Az aminosav-szintézis elsődleges színhelye a levelekben található, a fotoszintézisben nyert energia és szénváz a nitrogénasszimiláció során beépül a glutaminba, az elsőként keletkező aminosavba. Ezt követően pedig mind a 20+2 fehérjealkotó aminosav előállítható a glikolízis és a citrátkör anaplerotikus folyamataival (Noctor *et al.*, 2002). A levelek mezofillum sejtjeiben található a növényi fehérjék háromnegyede (Staswick, 1994).

Ugyanakkor a zöld alapú fehérje érdekes akkor is, amikor a kertészeti/mezőgazdasági növényt célzottan termése vagy bizonyos generatív vagy vegetatív szerve miatt termesztik, és a zöld biomassza, mint hulladék visszamarad (Domokos-Szabolcsy *et al.*, 2023; Tamayo Tenorio, 2017). Ez az évenként keletkező több tonnányi biomassza értékes alapanyag a biofinomító ipar számára, melynek részeként fehérjekivonatok nyerhetők élelmiszer vagy takarmány célú felhasználásra (Kamm *et al.*, 2005).

Célzott növényfajokkal különböző szintű zöld biofinomítók üzemelnek Európában és Amerikában. A lucerna tekinthető az első és legelterjedtebb alapanyagnak (Kromus *et al.*, 2004; Kamm *et al.*, 2010). Írorszában azonban működnek évelő fűféléket feldolgozó mini üzemek is (O’Keeffe *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011).

1. táblázat: Mezőgazdasági növényfajok friss leveles szárának nyersfehérje-tartalma 100 g szárazanyagra vetítve.

Rendszertani kategória	Növényfaj	Nyersfehérje	Hivatkozás
		g/100 g szárazanyag	
<i>Disznóparéjfélék</i>	mángold	24,6	nem publikált saját adat
<i>(Amaranthaceae)</i>	spenót	24,1	(Dudás, 2009)
	cukorrépa	15,5	(Tamayo Tenorio et al., 2016)
	amaránt	24-30	(Telek, 1983)
<i>Pillangósvirágúak</i>	fehér here	17-33	(Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, 2023g)
<i>(Fabaceae)</i>	vörös here	19,7	(Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, 2023f)
	kék csillagfürt	15,5	(Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, 2023b)
	bükköny	23	(Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, 2023c)
	lóbab	17,8	(Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, 2023d)
	arábiai bíborbab	18; 28-33	(Addo-Bediako, 2013; Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, 2023e)
	lucerna	20,6	(Feedipedia - Animal Feed Resources Information System, 2023a)
<i>Keresztesvirágúak</i>	káposzta	13-28	(Gupta et al., 1993)
<i>(Brassicales)</i>	lóretékfa	29-40	(Liyanage et al., 2014)
	kelbimbó	25,6	nem publikált saját adat
	brokkoli	25,2	nem publikált saját adat
	repce	21-26	(Telek, 1983)
	mustár	24-26	(Telek, 1983)
<i>Fészkesvirágúak</i>	napraforgó	25-29	(Telek, 1983)
<i>(Aserales)</i>	csicsóka	5-21	(Kaszás et al., 2016; Wang et al., 2020)
	saláta	17,2	nem publikált saját adat
<i>Burgonyavirágúak</i>	batáta	16-31	(Sun et al., 2014)
<i>(Solanales)</i>	paprika	19-22	(Telek, 1983)
	dohány	30; 36,4	(Telek, 1983)
<i>Perjefélék</i>	kukorica	12,4	(Ayasan et al., 2020)
<i>(Poaceae)</i>	tritikálé	8-10	(de Zumelzu et al., 2002)
	évelő fűvek	16-28	(O'Keeffe et al., 2009; Sharma et al., 2011)
<i>Csalánfélék (Urticaceae)</i>	csalán	20-36	(Hughes et al., 1980; Dudás, 2009)
<i>Kutyatejfélék (Euphorbiaceae)</i>	manióka	25,5	(Telek, 1983; Ravindran, 1993)
<i>Zellerfélék (Apiaceae)</i>	petrezselyem	23,4	nem publikált saját adat

3.3.1 A zöld biomassza legfontosabb fehérjéi

A leggyakoribb fehérje a Földön a RuBisCo (ribulóz biszfoszfát karboxiláz-oxigenáz) enzim, mennyiségének becslése széles határok között mozog, 0,04-0,7 gigatonna a bolygón, döntő hányada szárazföldi hajtásos növények a levelében található (*Bar-On & Milo, 2019; Ellis, 1979; Fiorentini & Galoppini, 1983*). A levél mezofillumot tekintve a sejtszinten található fehérjék 80%-a a kloroplasztiszban lokalizált. Hozzáférhetőségük alapján a levél fehérjék két csoportra bonthatók. Az oldható fehérjék több mint 50 %-át a RuBisCo enzim adja a C3-as növényekben. A C4-es növények esetében a RuBisCo aránya sokkal alacsonyabb, 8-16% között változik (*de Jong & Nieuwland, 2011*). A fehérjék másik csoportja a membránkötött fehérjék, melyek a kloroplasztisz tilakoid membránjába ágyazódva klorofill és karotinoid molekulákkal állnak kapcsolatban (*Santamaría-Fernández & Lübeck, 2020*). A fehérjék egy kisebb csoportja a sejtfalban található és a citoszkeleton működésében töltenek be fontos szerepet vagy egyéb katalitikus, szabályzó feladatot látnak el.

A RuBisCo minden oxigenikus fotoszintetizáló élőlényben megtalálható enzim. A szerves szénasszimiláció szinte kizárólagos kulcsa a bioszféra kemolitotróf és fotolitotróf elsődleges termelőiben. A RuBisCo alacsony szén-dioxid affinitása ellenére a bruttó primer produkció elsőrendű szereplője, így a leggyakoribb fehérjének tarthatjuk a Földön. A hajtásos növényekben a RuBisCo negyedleges szerkezete 8 nagy (53 kDa) és 8 kis alegységből (14 kDa) épül fel. A komplex így 550 kDa tömegű fehérje, összevetve a membránfehérjék alegységeinek átlagos 5-60 kDa-os tömegével (*Tamayo Tenorio, 2017; Nynäs, 2018*). A levélfehérjét, pontosabban a RuBisCO-t, már az 1940-es években javasolták az emberi fogyasztásra alkalmas potenciális fehérjeforrásaként (*Pirie, 1942*). A RuBisCO aminosav-összetétele kedvező az emberi fogyasztás szempontjából, mivel szinte az összes esszenciális aminosavat megfelelő mennyiségben tartalmazza (*de Jong & Nieuwland, 2011*).

Állatkísérletekben igazolták a RuBisCO-t tartalmazó levélfehérje-koncentrátumok jó emészthetőségét (*Subba Rau et al., 1972; Carlsson & Hanczakowski, 1985*). Shah és munkatársai (1980) vizsgálatukban kimutatták, hogy a levélfehérje hasonló nutritív értékkel bír, mint a tej, a gyermekeknek szánt táplálékkiegészítőben. Az élelmiszeriparban lényeges technofunkcionális tulajdonságok miatt is értékes, a natív RuBisCO jó zselésítő és habképző tulajdonságokkal rendelkezik, de állítottak már elő belőle hússzerű textúrájú fibrilláris szerkezetet is (*Lamsal et al., 2005; Nynäs, 2018*). Élelmiszeripari felhasználása esetén azonban fontos a megfelelő kinyerési technológia alkalmazása (*Tanambell et al., 2022*). A dohánylevélből kivont fehérje aminosavösszetétele, és emészthető fehérjetartalma kimagasló

más növényi vagy állati fehérjével összevetve (Fantozzi & Sensidoni, 1983; Salvucci & Anderson, 1987). Gazdasági szempontból pedig megfelelő sűrűségben termesztve a növényt négyszer több fehérje nyerhető a friss zöld levelekből, mint azonos területen termesztett szójababból (Tso & Kung, 1983; Tso, 1990). A levélfehérje, mint élelmiszeradalék üdítőitalok tápértékének növelésére alkalmazható, laktózérzékenyek számára készített növényi tejek és gabonatermékek aminosav összetételének javítására alkalmas. Terápiás célokra, például vesebetegeknek, ahol fontos az alacsony Na^+ , K^+ bevitel, előnyösebb a valódi fehérjét tartalmazó étrend, mint az egyszerű, szintetikus aminosavak keveréke. Gasztrointesztinális problémákkal küzdő betegek táplálásánál kedvező a folyadék diéta szempontjából a növényi fehérje (Fantozzi & Sensidoni, 1983).

3.3.2 Zöld alapú fehérjehasznosítás, a zöld biofinomítás koncepciójának kialakulása

A zöld biomassza alkalmazása fehérjeforrásként nem újkeletű dolog (Ereky, 1918; Pirie, 1966, 1987). A zöld biomassza ősidők óta létező legegyszerűbb hasznosítási módja a szárítás, szénakészítés, ami jelentős fehérjetartalom és biológiai értékcsökkenéssel jár. A szilázs/szenázs készítés a XIX. században terjedt el, mint takarmánytartósítási technika. Ereky Károly 1918-ban megalkotta a 'biotechnológia' fogalmát, melyhez a következő definíciót használta: „*Biotechnológia minden munka, amellyel alapanyagokból termékeket állítunk elő élő organizmusok segítségével.*” (Ereky, 1918, 1919; Bud, 1989; Sevelle, 2011; Fári & Popp, 2015, 2016). Vagyis biotechnológiának tekintette a növényi fotoszintézist is a keletkező biomassza és a benne található értékes anyagok miatt. Ereky megfigyeléseire alapozva felismert egy alternatív és hozzáférhető megoldást a növekvő fehérjeigény és -hiány megoldására a mezőgazdaságban és élelmiszeriparban a háború utáni Magyarországon (Fári, 2016). Gépészeti ismereteire támaszkodva úgynevezett zöld malmot alkotott, mely nedves őrlési folyamat során képes a friss növényi levelekből és hajtásokból kinyerni az értékes fehérjetartalmat, ezzel kiváltva a háború után eleve nehezen beszerezhető magalapú takarmányokat (Ereky, 1926a). Találmányát hazánkban és külföldön is szabadalmaztatta (Ereky, 1926b, 1926c, 1926d, 1926e, 1927, 1928).

Az *Ereky-process* füvek, lucerna és egyéb frissen betakarított biomassza nedves frakcionálásán alapul, mellyel szétválaszthatóak a nehezen emészthető rostok az oldott állapotú fehérjéket és fitonutrienseket tartalmazó vizes frakciótól (Ereky, 1933). Az így nyert növényi levet (*juice*) hasonló tulajdonságai miatt, zöld tejnek nevezte és frissen hozzáadta a folyékony sertéstakarmányhoz.

Ugyanakkor szilárd hordozókkal keverve (úgy mint gabonadara), szárítva tartósíthatóvá vált, és a vegetációs időszakon kívül is elérhető maradt takarmányozásra. A II. Világháború után Ereky munkássága feledésbe merült.

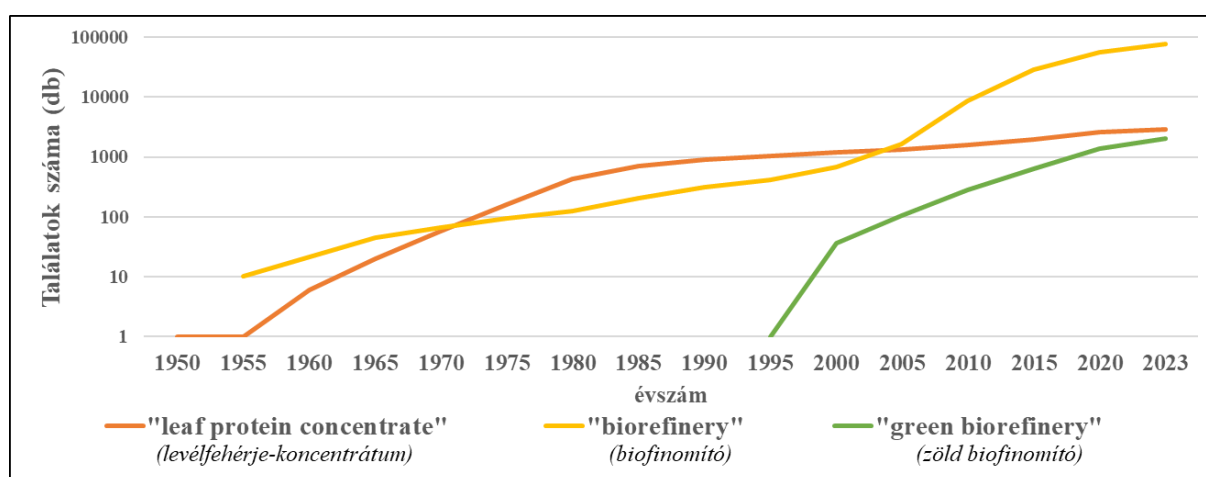
Később Norman W. Pirie angol biokémikus folytatta ezt a munkát, mikor a háború sújtotta Anglia élelemellátásának alternatíváit kutatta a *Food Investigation Board* és az *Imperial Chemical Industries* felkérésére 1940-ben (Pirie, 1966, 1987). Ugyan R. E. Slade és J. H. Birkinshaw már korábban is végeztek vizsgálatokat fermentációval (Slade & Birkinshaw, 1938), Pirie munkássága nemzetközileg ma ismertebb a levélfehérje témakörben. Az általa fejlesztett módszert Pirie-process néven ismerhetjük, mely az Ereky-féle eljárás továbbfejlesztett változata. A zöldségtörés (zöld malom) és zöldségtörő eljárást követően a zöldségtör (zöld tej) termális eljárással koagulálta és szárítást követően nyert belőle 45-50 % nyersfehérje-tartalmú levélfehérje-koncentrátumot (LFK) (*Leaf Protein Concentrate*, (LPC)) (Fári, 2016). Az eljárás melléktermékei, a présrost és a savó (barnalé) pedig másodlagos nyersanyagként hasznosítható volt. Tudománytörténeti forrásokra támaszkodva nevezhetjük az eljárást „Ereky-Pirie-process”-nek is (Pirie, 1966; Fári, 2016). A levélfehérje kutatások Pirie munkásságát követően a háborúból kilábalt országokban sem haltak el, a technológia fejlődésével jobb kihozatalú présgépek terjedtek el. A XXI. század elején pedig ezen technológiai fejlesztések együttes alkalmazására megfogalmazódott az úgynevezett zöld biofinomítás koncepciója. Ez az integráló szemlélet a biomassza-hasznosítás új iparág szerű megvalósítása, az értékes molekulák és fehérjetartalom kinyerésén túl minden mellékterméket, mint másodlagos nyersanyagot feldolgoznak a termelési hálózatban (Kamm & Kamm, 2007; Mandl, 2010; Xiu & Shahbazi, 2015).

Magyarországon Ereky munkáját Tangl Harald fedezte fel újra, és ismételte meg a kísérleteit 1949-ben (Tangl, 1949, 1955). 1964-ben Holló János, a Műszaki Egyetem professzora munkatársaival, Zagyvai Istvánnal és Koch Lehellal szabadalmaztatta új módszerét levélfehérje-koncentrátum előállításához (Holló et al., 1968), munkájuk a magyar biotechnológia-történet meghatározó mérföldköve lett (Holló & Kralovánszky, 2000). Kísérleteik alapján 1972-ben Tamásiban felépült a világ első levélfehérje-feldolgozó üze me a VEPEX Kft. (*Vegetable Protein Extract*). Az ezt követő évtizedekben hasonló üzemek épültek Angliában, Dániában, Új-Zélandon (Bickoff et al., 1970; Telek, 1979, 1983; Sinclair, 2009). A VEPEX nem élte túl az 1973-as olajválságot, a termelés gazdaságtalanná vált az energiaár robbanásszerű emelkedése miatt.

2001 óta a Debreceni Egyetem kutatói, Fári Miklós irányításával új lendületet adtak a témának és a Tedej Zrt-vel, mint vállalati partnerrel kutatás-fejlesztési (K+F) programot indítottak. Ennek keretében felépült egy 200 l/h zöldlé előállítására alkalmas demonstrációs üzem Hajdúnánás-Tedejen (Bódi & Fári, 2002; Fári, 2011, 2016). Majd 2017 – 2021 között folytatott PROTEOMILL program keretében léptéknövelés történt és egy újabb üzem épült fel, melynek termelési kapacitása már 4000 liter zöldlé óránként. A kutatás-fejlesztés a Debreceni Egyetemen folyt, négy munkacsoportra osztva, hogy a zöld biofinomító ipar elveit követve, a feldolgozás során keletkező frakciókból minél nagyobb hozzáadott értékű termékeket lehessen létrehozni (Bákonyi et al., 2020; Kaszás et al., 2020a; Barna et al., 2022; Domokos-Szabolcsy et al., 2022, 2023).

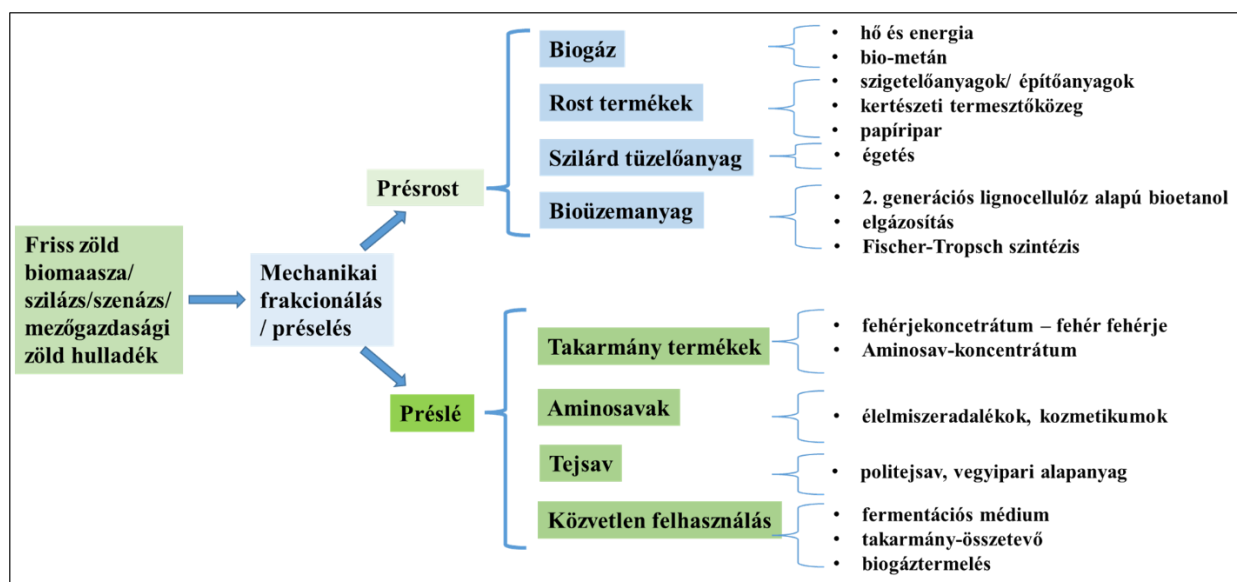
3.3.3 Zöld biofinomítás - Green biorefinery

A történelmi áttekintésben megismerhettük a „zöld malom” és levélfehérje-koncentrátum kutatások főbb állomásait, hazai vonatkozásait. Ehhez kapcsolódóan a nemzetközileg ismert angol nyelvű *terminus technicus*-ok mint a „*leaf protein concentrate*” „*biorefinery*” és „*green biorefinery*” megjelenését a tudományos közleményekben a 2. ábra mutatja. A levélfehérje-koncentrátum (LFK) (angolul *leaf protein concentrate (LPC)*) kifejezés található meg a legrégebb óta a szakirodalomban, azonban a biofinomító (*biorefinery*) szó adta a legtöbb találatot. Érdekes viszont azt kiemelni, hogy a biofinomítás tágabb fogalmi kör, jelentős részben a cellulóزالapú gazdálkodás, bioenergia-, biogáztermelés témakörökhöz kapcsolódik. A zöld biofinomítás (*green biorefinery*) viszonylag új és a modern technológiák elterjedése révén dinamikusán fejlődő területe a biofinomító iparnak.



2. ábra: A „*leaf protein concentrate*”, „*biorefinery*” és „*green biorefinery*” keresőszavakra kapott találatok száma a Google Scholar internetes adatbázisban, 1950-től 2022-ig logaritmikus skálán ábrázolva (saját szerkesztés).

A zöld biofinomítás során a frissen betakarított vagy szilázs/szenázsként tartósított biomasszából előállítható termékek palettája széles lehet (3. ábra). A feldolgozási folyamat során nem csak a levélfehérjék koncentrálhatóak, hanem értékes másodlagos anyagcsere termékek, fitonutriensek is (Kaszás *et al.*, 2020b). Mandl (2010) szerint a zöld biofinomítás kezdő, kulcslépése a mechanikai frakcionálás, préselés, az alapanyag pedig lehet friss zöld biomassza vagy szenázs/szilázs is, ahogy már említésre került.



3. ábra: A zöld biofinomítók termék-előállítási lehetőségei (saját szerkesztés Mandl, 2010; Xiu & Shahbazi, 2015; Kamm *et al.*, 2016 nyomán).

A biofinomításban hasznosítható zöld biomassza származhat célzottan termesztett növényfajokból, illetve mezőgazdasági/kertészeti növényfajok zöld hulladékából. A legtöbb zöld biomasszát a zöldtakarmányok adják, a kaszálók gyeptársulásai, a lucerna, a herefélék és éretlen gabonafélék. A XX. század második felében a dohány volt a levélfehérje kivonással foglalkozó kutatások középpontjában (Knuckles *et al.*, 1979; Telek, 1979; Fantozzi & Sensidoni, 1983; Tso & Kung, 1983; Tso, 1990).

Folyamatos a kutatás a zöld biofinomításba bevonható új növények iránt, mint a cukorrépa-levél, csicsókahajtás, trópusi növényfajok és kertészeti hulladékok (Sodamade *et al.*, 2013; Kaszás *et al.*, 2016; Tamayo Tenorio, 2017; Kaur & Bhatia, 2021; Domokos-Szabolcsy *et al.*, 2022). Többek között zöld tritikáléból 57-74% nyersfehérje-tartalmú LFK-t sikerült előállítani (Jørgensen *et al.*, 2020) csicsókából készült LFK esetében 24-31% (Kaszás *et al.*, 2020a), cukorrépa LFK-ban pedig 29% (Tamayo Tenorio *et al.*, 2016) volt a nyersfehérje-tartalom.

A nedves frakcionálás egyidejűleg használható élelmiszer- és nem élelmiszeripari termékek előállítására (Carlsson, 1994). Európában és számos más országban kifejlesztették a zöld növényi frakcionálást (Pirie, 1987; Carlsson, 1998; Mandl, 2010; Hermansen et al., 2017; Domokos-Szabolcsy et al., 2023;). A zöld biofinomító koncepció mentén ma már 80 országban folynak kutatások (Carlsson, 1997; Domokos-Szabolcsy et al., 2023). Több száz mérsékelt és trópusi növényfajt vizsgáltak már, mint potenciális zöld biomassza alapanyagot (Telek, 1983; Telek & Graham, 1983) és több mint 300 000 növényfaj még érdemes lenne a vizsgálatokra. A zöld biofinomítók az óránként néhány tonnától (mezőgazdasági lépték) az óránként 100 tonna (ipari lépték) feldolgozott zöld biomasszáig képesek üzemelni.

Első lépésként lassú nedves frakcionáló technológiát alkalmaznak (elsődleges finomítás), hogy a zöld levelek (vagy friss mezőgazdasági/ kertészeti hulladékok) tartalmát természetes formában izolálják. Így a rostban gazdag présfogácsa és a tápanyagban gazdag zöldlé elválasztható. A zöld biofinomítók előnyei a hektáronkénti magas biomassza nyereség, a könnyű mezőgazdaságtermeléshez-kapcsolhatóság és a nyersanyagok alacsony ára. Egyszerű technológiát alkalmaznak, és a további feldolgozáshoz (finomításhoz) jó biotechnikai és kémiai potenciál áll rendelkezésre. A nyersanyagok és az elsődleges termékek megőrzése érdekében szükséges a gyors feldolgozás, vagy a tartósítási módszerek használata, például szilázs előállítása vagy szárítás, ugyanezek a tartósítási lépések megváltoztatják a termékek összetételét (Kamm et al., 2005).

A cellulóz és a keményítő mellett a présrost értékes festékek, pigmentek, gyógyszer alapanyagok és egyéb szerves vegyületek forrása. A zöldlé fehérjét, szabad aminosavakat, szerves savakat, festékeket, enzimeket, hormonokat, egyéb szerves anyagokat és ásványi sókat tartalmaz (Fehér et al., 2012; Csatári et al., 2022). A zöldléből kiindulva olyan értékes termékeket állíthatunk elő, mint a tejsav és származékai, aminosavak, etanol és fehérjék. A présrost takarmánypelletek előállítására használható, vagy értékes vegyipari alapanyagok, például levulinsav előállítására szolgáló nyersanyag, valamint fermentálva metánná és szénhidrogénekké (szintetikus bioüzemanyagok) konvertálható (Xiu & Shahbazi, 2015; Kamm et al., 2016).

Az iparosodott mezőgazdaság zárt állattartással és monokultúras növénytermesztéssel jár, ennek következtében a gyepgazdálkodás és legeltetés mára a nemzeti parkok területére szorult (Vinczeffy, 2004). A széles körökben elérhető, kedvező élelmiszerellátás ára az intenzív mezőgazdasági termelés. Az élő gyepek azonban biodiverzitás növelő, természetvédelmi célú fenntartásába is beilleszthető a zöld biofinomítás, összekapcsolva ezzel a takarmányozást,

bioenergia és értékes biomolekulák (*biochemicals*) termelését (*O’Keeffe et al.*, 2009; *Sharma et al.*, 2011).

3.3.4 A lucerna, mint a zöld biofinomítók egyik legfontosabb alapanyaga

A *Leguminosae* alcsaládból mintegy 60 különböző fajt tesztenek takarmányozási célból melyek közül a lucerna (*Medicago sativa* L.) a leggyakoribb (*Kulkarni et al.*, 2018). Kontinentális éghajlaton, ahol a legtöbb zöld biofinomítással kapcsolatos kutatás folyik és üzem létesült (*Bickoff et al.*, 1970; *Bódi & Fári*, 2002; *Kamm et al.*, 2010; *Zhang et al.*, 2017; *Bákonyi et al.*, 2020; *Hansen et al.*, 2022) a leggyakoribb és perspektivikus növényfaj a lucerna. A lucerna ökológiai szempontból előnyös. Nitrogénfixáló takarmánynövényként hozzájárul az intenzív mezőgazdaság negatív környezeti hatásainak mérsékléséhez, ami hosszú távon a talaj egészségének és termékenységének javulását, növekvő szénmegkötést eredményez. A lucernához hasonló takarmánynövények kulcsfontosságú szerepet játszanak a növénytermesztésben és takarmányozásban (*Ates et al.*, 2018).

A lucerna globális terméshozama több mint 400 millió tonna évente (*Filippa et al.*, 2020). A növény eredetileg a Közel-Keletről származik, azonban napjainkban világszerte termesztik. Lágyszárú, évelő, a gyökérkoronában található rügyekből képes kihajtani a kedvezőtlen növekedési feltételek okozta nyugalmi állapot után (*Fernandez et al.*, 2019). Mélyre hatoló gyökérrszettel rendelkezik, így a szárazságot is jól tolerálja (*Huang et al.*, 2018). Sűrű gyökérrendszere gazdagítja a talaj szervesanyag-tartalmát, a talaj biológiai aktivitását, valamint csökkenti a talajeróziót (*Owusu-Sekyere et al.*, 2013).

Zöld biomasszáját hőmérséklettől és öntözési körülményektől függően 3-7 alkalommal lehet betakarítani egy vegetációs időszakban. A többször betakarított zöld biomassza 2-3 tonna/ha nyersfehérjét szolgáltat; emellett jó klorofill-, karotinoid- és C-, E- és B-vitamin forrás. A másodlagos anyagcseretermékek közül számos flavonoidot, fenolos vegyületet, fitoösztrogént és szaponinokat tartalmaz. Ezenkívül értékes ásványi anyagok forrása, mint például Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Zn, Si (*Bora & Sharma*, 2011).

3.3.5 Levélfehérje kinyerési módszerek és alkalmazások

Hilaire Marin Rouelle, francia kutató 1773-ban izolált először fehérjéket zöld növényi levelekből (*Pirie*, 1966). A bürök (*Conium maculatum* L.) mellett több növényfajt is vizsgált és megállapította, hogy a levelekből hasonló tulajdonságú anyag, fehérje nyerhető ki. Mindezt a fehérjék leírása előtt 65 évvel. Rouelle mozsárban összezúzta a friss leveleket, az így kapott zöld *levet* pedig textilanyagon átszűrte, majd melegítette, kb. 50-60 °C fokig. Ma már tudjuk,

hogy ezzel az úgynevezett „klorofillfrakciót” denaturálta, az így nyert zöld koagulumot pedig újabb textilen szűrve választotta el a barna színű savótól, melyből további melegítéssel fehér színű csapadékot nyert ki (Pirie, 1966, 1987).

A friss zöld levelek értékes és kimagasló fehérjetartalma ismert. A hozzáférhetőség azonban alacsonyabb a cellulóztartalmú sejtfal miatt, mely monogasztrikus állatok számára csökkenti a citoplazma értékes tápanyagainak felszabadulását, a tápanyagok és egyben a fehérjék felszívódását. A levelek értékes anyagainak hozzáférhetőségét tovább nehezíti a szövetek és sejtek struktúrája. A magban, gyökérben és termésben lévő sejtek és azok raktározásra differenciálódott organelumai méretben és mennyiségben is eltérnek a levél mezofillum sejtek struktúrájától. Az oleoszómák és proteinoplasztiszok átlagosan 0,5-5 µm-esek és nagy sűrűségben találhatók a magban és gyökérben, a termésben pedig a keményítőszemcsék akkumulálódnak (10-100 µm).

Ezzel szemben a levél strukturáltsága komplexebb. A mezofillum sejtek fehérjéinek jó része a 3-5 µm-es kloroplasztiszban található, pigmentekhez és lipidekhez kötötten, kialakítva a speciális tillakoid membránszerkezetet (Tamayo Tenorio, 2017).

A sejt- és szubcelluláris membránokat felbontó ágensek kétségtelenül meghatározó szerepet játszanak az LFK kivonásában. Ezenkívül a növényfaj, az érettségi állapot, a szövet, a nyálkaanyagok jelenléte, a betakarítás utáni kezelés, a pH, az extraháló anyag összetétele, a flotációs arányok, az extrakciós idő és a hőmérséklet is befolyásolja a kihozatazt.

Egy lassú, kíméletes préselési folyamat során az ép növényi levelek és fiatal hajtások kipréselhetők, rost és présle (zöldlé) frakciókra szedhetők. Az így nyert zöldlében a legfinomabb sejtfal darabok (50-100 µm) erős víztartó képességük miatt a citoplazma nagy mennyiségét és így fehérjéket is képesek megkötni (Tamayo Tenorio, 2017). Ezek a finom cellulóz szálak szűréssel vagy dekantálással eltávolíthatók, azonban mint mátrix anyag is hasznosulhatnak a takarmányban vagy élelmiszerben.

Az ipari zöld biofinomítók egyik szűk keresztmetszete a fizikai feltárás, préselés folyamata. Műszaki szempontból erre a célra a nagy kapacitás elérése érdekében a szalagprésék bizonyulnak a legalkalmasabbnak (Fári, 2020), de a technológiai fejlesztések folyamatosan zajlanak. Laboratóriumi körülmények között és K+F+I projektek keretében kísérleti fázisban az Angel márkájú rozsdamentes acél ikercsigás présgépek széles körben elterjedtek, akár zöld biofinomítás, nehézfém remediáció vagy orvos biotechnológiai alkalmazási céllal (Saltiola, 2020; Pietschmann et al., 2021; Hansen et al., 2022; Tanambell et al., 2022).

Az összetett sokkomponensű mátrix közegből, mint a kipréselt növényi zöldlé a makromolekulás kolloid állapotú fehérjék kinyerését segítheti a különböző pufferoldatok alkalmazása. A foszfátpufferek és a megfelelően beállított pH-érték növelik a kihozatalt. Dohányfehérjék kivonásánál 0,085 mol/l koncentrációjú foszfátpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$) (pH 7,85) 4,7:1-hez arányban préselést követően a levelekhez adva, segítette a legjobb fehérjekihozatalt, 12,85 mg/g levél koncentrációban (*Fu et al.*, 2010).

A levélfehérje kinyerése a kipréselt zöldléből 60 °C és 95 °C közötti hőmérsékleten történő hőkoagulációval az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás. Mivel a RuBisCO enzim a levélfehérje mintegy 50%-át teszi ki (*Santamaría-Fernández & Lübeck*, 2020), és denaturálódási hőmérséklete 76,2 °C (*Lamsal et al.*, 2007); ezért a koaguláció optimális hőmérséklete 80 °C. A hő megbontja a fehérje harmadlagos, negyedleges szerkezetét, és ennek következtében a hidrofób oldalláncok felszabadulásával csökkenti a vízőldékonyságát.

A zöldlében található fehérjéket 80 °C-ra történő 2-4 perces melegítéssel koagulálni lehet (*Kaszás et al.*, 2020a; *Domokos-Szabolcsy et al.*, 2023). A teljes koagulum azonban zöld színe, keserű íz- és illatanyagai, alacsony vízőldhatósága és emészthetősége miatt élvezhetetlen, emberi fogyasztásra való elfogadottsága alacsony. Következésképpen szelektív hőkoagulációs technikát alkalmaznak a levélfehérje frakcionálására „zöld” és „fehér” fehérjékre, amelyek monogasztrikus állatok takarmányozására, illetve emberi fogyasztásra megfelelőbbek. A kétlépcsős folyamat során a zöld levet először 55 °C-ra melegítik, a zöld fehérjefrakció leválasztásához, majd a felülúszót 80 °C-ra melegítik az ún. fehér fehérjefrakció kicsapásához. A levélfehérje termális koagulációs módszere hatékony, azonban számos hátránnyal is rendelkezik, mint például a magas energiaigény, az előállított LFK alacsony vízőldhatósága, és a fehérje funkcionális csoportok tulajdonságainak megváltozása (*Lamsal et al.*, 2007).

Szakirodalom alapján a sav- és hőkezelés kombinációjával növelhető a denaturáció hatékonysága. Ennél a módszernél a zöldlé pH-ját először sav hozzáadásával csökkentik (pl. 3 M HCl), majd a levélfehérjék izolálásához melegítik. Ezzel a módszerrel történő koaguláció gyorsabb, mint a csak termális kicsapás, és a hagyományos savas kicsapási módszerhez képest nagyobb koagulumokat eredményez (*Hansen et al.*, 2022). Ezenkívül nagyobb LFK-hozamot eredményez amellet, hogy költséghatékonyabb a hagyományos hőkoagulációs módszerhez viszonyítva (*Zhang et al.*, 2017). Az így izolált fehérje magasabb emészthetőséget és felszívódási arányt is eredményezett (*Zhang et al.*, 2017; *Martin et al.*, 2019).

Martin és munkatársai (2019) cukorrépa levelekből kivont RuBisCO fehérjét hasonlítottak össze a kereskedelemben kapható tejsavófehérjével és szójafehérjével. Az izoláláshoz részleges termális koagulációt (50 °C) és centrifugálást végeztek. A tiszta RuBisCO protein izolátum (RPI) (más néven „fehér fehérje”) kinyeréséhez 15 kg friss cukorrépalevélből indultak ki, mechanikai feltárások, melegítés centrifugálás és szűrési lépések után 1 liter tiszta RPI-t sikerült kinyerniük, melyet fagyasztva szárítás után élelmiszeripari felhasználhatóság, gélképző és emulziós tulajdonság, illetve víztartó képesség szempontjából vizsgáltak. Az RPI emulzió kisebb olaj csepp méretet, nagyobb stabilitást és fehérebb küllemet mutatott, mint az élelmiszeriparban használt gyakori emulzióképző fehérjék. Gélképzéshez több mint 50 %-kal kevesebb fehérje volt szükséges a RPI-ből mint szójafehérjéből vagy tejsavófehérjéből. Ígéretes élelmiszeripari felhasználása mellett a növényi RuBisCO fehérje izolátum előállításának költséghatékonyabbá tétele hiányzik a versenyképes állati fehérjékkel szemben (*Tamayo Tenorio, 2017; Martin et al., 2019*).

A levélfehérje kinyerésre savas vagy lúgos kicsapás is alkalmazható. Közismert, hogy alacsony (4,5 alatti) vagy magas (8,0 feletti) pH-érték esetén a fehérjék pozitív, illetve negatív töltést hordoznak, ami több hidrofób oldallánc felszabadulásához vezet, ami a fehérje oldhatóságának csökkenését okozza. A levélfehérjék savas kicsapását általában sósav hozzáadásával végzik, míg a pH 8,0-8,5-re történő emelésére nátriumhidroxid vagy ammóniaoldatot használnak. A kicsapott fehérjét ezt követően centrifugálással ülepítik az elválasztáshoz. A szójalevél zöldlé 3,7 pH-ra történő savanyításával sikerült a levélfehérjék 95%-át elválasztani (*Betschart & Kinsella, 1973*). A fehérjék izoelektromos pontjukon könnyen kicsapódnak, a RuBisCO számított izoelektromos pontja pH=6,3 (*Nynäs, 2018*), a növényi fehérjék nagy többsége pH=4-6 izoelektromos ponttal rendelkezik. A manióka levél zöldlé fehérjeinek kicsapásához csökkentették a pH-t (pH<5) ahol a fehérjetartalom oldhatósága a legalacsonyabbnak adódott (*Coldebella et al., 2013*).

A mikrohullám használata a termális koagulációhoz újszerű megoldás a levélfehérje-kutatás és -ipar alkalmazásában. Laboratóriumi körülmények között a mikrohullám alkalmazása könnyen elválasztható, nagyméretű aggregátumokat eredményez, ami előnyös a barnalé minősége és ezzel együtt további felhasználása szempontjából is. Félüzemi körülmények között hőcserélő rendszerrel kombináltan alkalmazható az ökonómiai szempontokat is figyelembe véve. A technológiával kapható koagulumok konzisztenciája erősebb, nagyobb méretű aggregátumok szeparációja előnyösebb, hasonlóan a laboratóriumban tapasztaltakkal (*Fári & Domokos-Szabolcsy, 2018*).

Az irányított fermentációval történő kinyerés elvi alapja megegyezik a pH-változás okozta precipitációval. Ekkor jellemzően tejsavbaktérium törzsekkel oltják be a zöldlevet és az inkubáció során termelt tejsav hatására csapódnak ki a növényi fehérjék (*Santamaria-Fernandez et al.*, 2019; *Domokos-Szabolcsy et al.*, 2022). A módszer előnye, hogy kevesebb energiát igényel, mint a termális kicsapás. Ugyanakkor több időt vesz igénybe, eltérő eszközöket igényel, és jellemzően a kicsapódott fehérjék nem képeznek aggregátumokat. Így a koncentrált fehérjék elválasztására előnyösebb a dekanter centrifugálás (*Domokos-Szabolcsy et al.*, 2023).

A legelterjedtebb fehérjekinyerési technikák mellett számos más módszer ismert, melyeknek széles körű elterjedését általában a technológia ára és aktuális kihozatali korlátai hátráltatják. Flokkuláló szerekkel is lehetséges melegítés nélkül elválasztani a levélfehérjéket, mint a lignoszulfonát, a cellulózipar egyik polimer mellékterméke alkalmas a fehérjék flokkulálására a zöldléből (*la Cour et al.*, 2019). A módszer limitáló tényezője a flokkuláló anyag ára és elérhetősége.

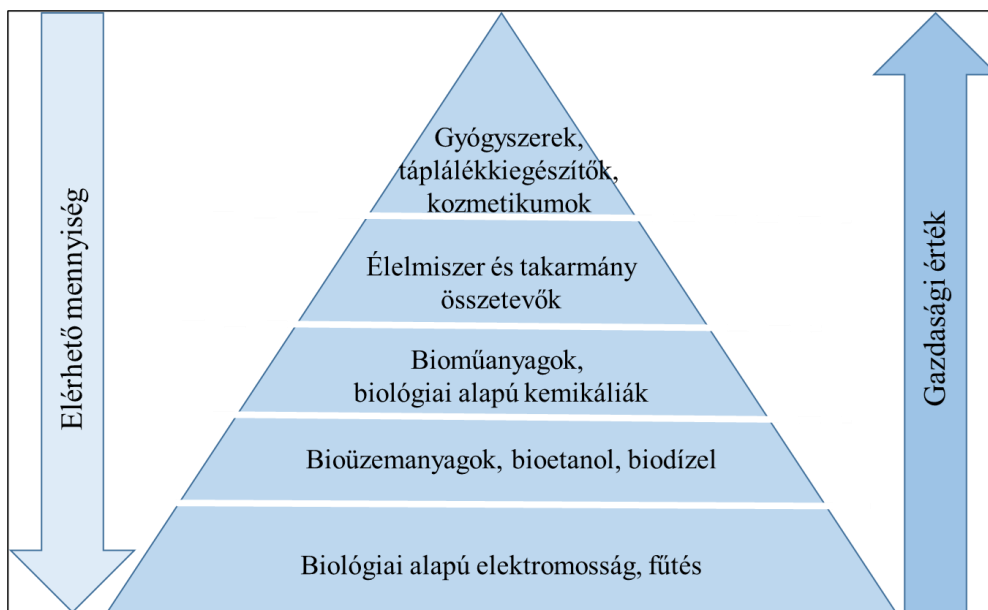
A szuperkritikus szén-dioxid extrakció élelmiszeripari használatát már 1964-ben vizsgálták (*Zosel*, 1964). A technológia fejlődése viszont még nem érte el azt a szintet, hogy széles körökben alkalmazásba vonhatóvá váljon (*Wadehra et al.*, 2018). Az ultraszűrés szintén nem gyakori, de ígéretes módja a levélfehérjék kinyerésének. A kinyerés energia-szükségletét jelentősen csökkentheti a hőközlés helyett szűrőmembránok alkalmazása. Kromus és munkatársai (2004) ultraszűréssel 26-38% fehérjetartalmú LFK-t állítottak elő lucernából, míg a hőkoagulálással nyert LFK fehérjetartalma 40-46% volt.

3.3.6 Zöld biofinomítás illeszkedése a körforgásos gazdálkodás filozófiájába

A biofinomítás technológiai, tudományos megközelítése a biomassza-alapú gazdaságnak, ezzel párhuzamosan a bioökonómia mindezt közgazdaságtani és politikai megközelítésből vizsgálja. A biomassza ipari nyersanyagként való felhasználása egyértelműen meghatározóvá válik a jövő mezőgazdaságában és ipari termelésében (*Fári*, 2018b). Az Európai Unió 2012-ben indult *EU Bioeconomy* stratégiája, a 2019-ben Magyarországon megalapult Magyar Bioeconomy Klaszter a kutatás-fejlesztés, illetve technológia és tudástranszfer nagy volumenű támogatását prognosztizálja a biofinomítás területén. Az Unió Zöld megállapodásában foglalt komplex, fenntartható és klímasemleges célok eléréséhez szervesen hozzájárul a körforgásos gazdálkodás elterjedése a termelésben. A körforgásos gazdálkodás fellendítése érdekében Horizon 2020 programok is nagy számban nyertek támogatásokat (*European Biomass Industry Association*,

2021). A biológiai alapú gazdaság (*biobased economy*) kulcsfontosságú alapja a biofinomítás (Scarlat *et al.*, 2015). A biofinomítók fejlesztésének egyik fő limitálója a biomassza iránti hatalmas kereslet, illetve, hogy a költséghatékonyság eléréséhez minél nagyobb kapacitású megvalósulás szükséges, amelyet erősen befolyásolnak logisztikai tényezők (Popp *et al.*, 2021). Az előállított produktumok értéke is a megvalósulás gazdaságosságát befolyásolja. Az energia egyike a legalacsonyabb értékű terméknek, míg az élelmiszer, kozmetikai és gyógyszeripari alapanyag nagy értéket képviselnek a piacon (4. ábra).

A legújabb kutatások már az élelmiszerfehérje, úgynevezett „fehér fehérje” előállítását vizsgálják a zöld biofinomítással (Nynäs, 2018; Møller *et al.*, 2021). Az Európai Unió Élelmiszerbiztonsági Hatósága 2009-es tudományos állásfoglalása szerint például a lucernából készült levélfehérje-koncentrátum biztonságos, mint élelmiszer (EFSA, 2009). 2017 óta pedig elfogadott élelmiszer a lucernafehérje az Európai Unióban (A Bizottság (EU) 2017/2470 végrehajtási rendelete - az új élelmiszerek uniós jegyzékének az új élelmiszerekről szóló (EU) 2015/2283 európai parlamenti és tanácsi rendelet alapján történő megállapításáról, 2017). Mindemellett a modern növény biotechnológia révén transzgénikus növényekben sikeresen állítanak elő rekombináns fehérjéket, antitesteket, vakcinákat, ipari enzimeket és emlős hormonokat (Daniell *et al.*, 2001; Llop-Tous *et al.*, 2011), melyek nagy értéket képviselő biomasza termékek (4. ábra). 2021-ben transzgénikus dohány növényekben termeltek SARS-CoV-2 S1 antigént, koronavírus tesztek fejlesztése céljából (Pietschmann *et al.*, 2021). Az ehhez hasonló fejlesztések üzemi megvalósulásai a jövőben igénylik a kidolgozott és minél nagyobb kihozatalban történő sikeres levélfehérje kivonást és tisztíthatóságot.



4. ábra: A biológiai alapú gazdaságban termelhető termékek mennyisége és gazdasági értéke (saját szerk. (Manninen, 2017)).

3.4 A szelén általános jellemzői és szerepe az élővilágban

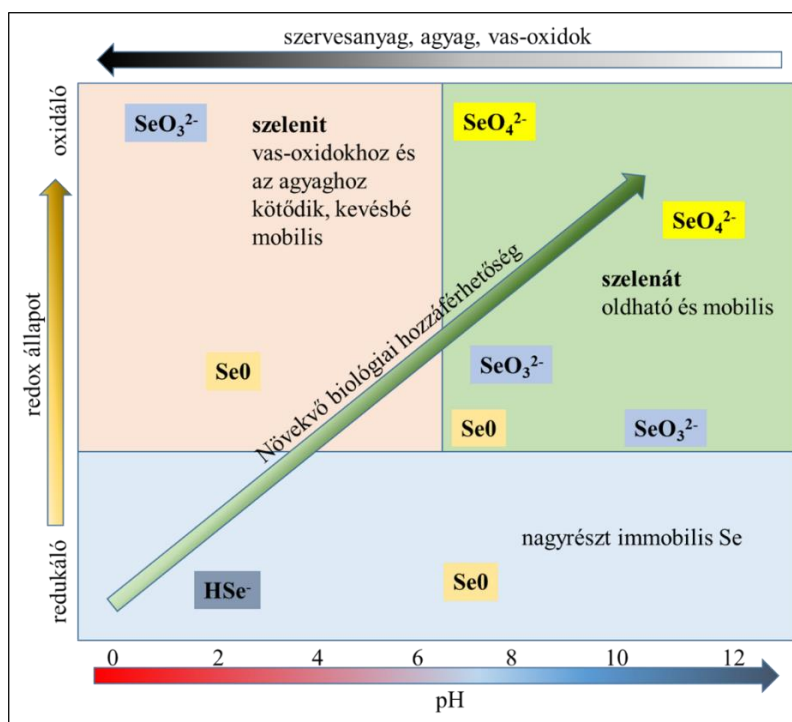
3.4.1 Szelén felfedezése és általános kémiai jellemzői

A szelént Berzelius svéd tudós, a modern kémia fejlődésének kihagyhatatlan alakja fedezte fel 1817-ben (Trofast, 2011). A kénsavgyártás első lépéseként az elemi kén vagy fémszulfidokat oxidálják kén-dioxiddá, Berzelius a folyamat végén a kádakban maradt vörösesbarna üledék azonosítása révén fedezte fel az új elemet, mely a szulfid ásványok szennyeződéséből visszamaradó vörös elemi szelén volt. Nevét a Hold görög istennőjéről, Szelénéről kapta. Felfedezését követően több mint 100 éven át az arzénhoz és tellúrhoz hasonló toxikus elemként tartották számon. A kalkogének közé tartozik, félfémes tulajdonságú félvezető. Külső elektronhéján 6 elektron helyezkedik el, a természetben +6, +4, 0, −2 oxidációs számmal fordul elő.

3.4.2 Szelénformák a természetben és antropogén környezetben

A szelén a földkéregben jellemzően kén tartalmú ásványokban fordul elő. A tisztán szelén tartalmú ásványok, mint az *eucairit* (CuAgSe), a *crooksit* (CuThSe) és a *clausthalit* (PbSe) ritkák a földkéregben ahhoz, hogy a szelén fő forrásaként szolgáljanak (Khamkhash et al., 2017). Ma a legtöbb szelént a rézércek feldolgozásának melléktermékeként nyerik. Az alapkőzet átlagos koncentrációja 50-90 µg/kg, de vulkanikus, üledékes és karbonátos kőzetekben mennyisége több lehet, talajban sokkal szélesebb határok között, 5 és 1200000 µg/kg koncentrációban változik a szelén mennyisége (Winkel et al., 2015). Az 500 µg/kg

szelént tartalmazó talajokat szelénben gazdagnak (angolul *seleniferous*) nevezzük (Dhillon & Dhillon, 2003). A szélsőséges körülményektől eltekintve, a legtöbb pH-n és redox állapotban oxianionként, szelenát (SeO_4^{2-}) és szelenit (SeO_3^{2-}) formában van jelen. Levegőtlen és savas talajokban ismert a szelenid (Se^{2-}) és elemi szelén (Se) jelenléte (5. ábra).



5. ábra: A talajban megtalálható tipikus szelénformák a környezeti tényezők és a biológiai hozzáférhetőség függvényében (saját szerk. Fordyce, 2013 alapján).

A nanorészecskék egyre szélesebb körű elterjedése és alkalmazása a mezőgazdaságban a szelén esetében is új kutatásokat és alkalmazásokat eredményezett a közelmúltban. Az elemi szelén három allotróp módosulása közül (vörös, szürke és fekete) a vörös szelénnek ismert a biológiai aktivitása (Huang *et al.*, 2003). A kénhez hasonlóan (S_8) a vörös allotróp szelénforma (Se_8) is makrociklikus vagy amorf molekulaszervezetű. A vörös szelén a természetben kifejezetten ritka, üledékes kőzetekben fordul elő, előállítására többféle szintézist is alkalmaznak. Több baktériumfaj képes a szelenát és szelenit redukciójával intracelluláris vörös elemi szelénzárványokat létrehozni. A biogén szintézissel változatos méretű és alakú nanorészecskéket lehet előállítani (Prokisch *et al.*, 2009; Sztrik, 2016).

A vegyi szintézis lényege pedig, hogy a szervesetlen szelén sóoldathoz redukáló hatású vegyületeket (pl.: polifenolok, aszkorbinsav) és az aggregációt segítő makromolekulákat (pl.: fehérjék) adnak, melyek felszínén megkezdődik az elemi szelén kiválása. A nanotechnológia fejlődése eredményeképpen biztonságosabb szelén étrendkiegészítők, tablettabevonatok,

rákellenes készítmények és fluoreszcens festékek készültek (*El-Ramady et al.*, 2014). Szelén nanorészecskéket alkalmaznak napelemekben, fotocellákban és szenzorokban. Ezenkívül a szelénvegyületeket széles körben használják üveggyártásban, elektronikai eszközökben, festékekben, gumikban, kerámiákban, műanyagokban és kenőanyagokban. Az iparban a szelén jelentős része (60%) fémötvözetekben és üveggyártásban kerül felhasználásra, de jelentős mennyiség (10%) kerül állati takarmányokba, étrendkiegészítőkbe és műtrágyákba (*Fordyce*, 2013). Globálisan a szelén a szénhez, nitrogénhez, vízhez hasonló körforgásban vesz részt az óceánok, az atmoszféra és a szárazföldi környezet részvételével. Az áramlás mértékére jelentős hatást gyakorol az antropogén tevékenység által felszabadított szelén (becslések szerint 76-88 ezer t/év mennyiséggel), természetes úton az óceánok járulnak hozzá legnagyobb mértékben a körforgáshoz 38,25 ezer t/év mennyiséggel. Az atmoszférikus út a gyorsasága miatt jelentős, a szárazföldi körzés pedig a mezőgazdaság és így az emberi egészség szempontjából fontos. Mindkét útvonalon kb. 15 ezer t/év szelén jut keresztül (*Fordyce*, 2013).

3.4.3 A globalizáció, klímaváltozás és a szelén kapcsolata

A szelén globális eloszlásának vizsgálata bonyolult komplex kutatás mivel változatos formákban van jelen a környezetben. A szelén a növényeken keresztül jut be a táplálékláncba így a takarmányokba és élelmiszerekbe is. A talaj szeléntartalma több tényező hatásának eredményeképpen széles határok között mozog. Általában a száraz és alacsony szervesanyag-tartalmú talajok nagyon keveset vagy egyáltalán nem tartalmaznak szelént. Az intenzív mezőgazdasági termelés olyan mikro- és nyomelemek kimerülését okozza a talajban, mint a vas, jód, cink és szelén (*Welch et al.*, 2013). A mérsékelt klímamodellek előrejelzései alapján 2080-as 2090-es évekre jelentősen csökken a talajok szeléntartalma, kifejezetten a szántóföldeken, mely tovább növeli a szelénhiányos területek arányát (*Jones et al.*, 2017).

Az ipari és mezőgazdasági tevékenység felgyorsította a Se-vegyületek felszabadulását a geológiai forrásokból. A Se-szennyezés okozói a mezőgazdasági szennyvíz, a szennyvíziszap, a széntüzelésű erőművekben keletkező hamu, az olajfinomítók, valamint a foszfátok és fémérccek bányászata (*Sharma et al.*, 2015). Dhillon és Dhillon (2003) szerint az antropogén tevékenységek ugyanannyi szelént juttatnak a talajba mint, amennyi természetes úton történik.

3.4.4 A szelén élettani szerepe

140 évvel felfedezését követően Schwarz és Foltz 1957-ben patkányokon végzett kísérletükkel bizonyították, hogy a szelén megfelelő koncentrációban esszenciális nyomelem az állati szervezet számára (*Schwarz & Foltz*, 1957). Ezt követően számos élőlénycsoportban

bizonyították nélkülözhetetlenségét az *Archeá*któl az állatokig és emberig. A kutatások előrehaladtával egyre pontosabb kép rajzolódott ki az élővilágban betöltött szerepéről, antikarcinogén hatásáról és a szelenoproteinekről, mint a bakteriális glicin-reduktáz és az emlősökben található glutation-peroxidáz. Egyike a legjelentősebb felfedezéseknek a 21-ik fehérjealkotó aminosav, a szelenocisztein (SeCys) 1976-os leírása. A SeCys kotranszlációs módon épül be a fehérjékbe, az UGA stop kodon az mRNS másodlagos szerkezetében lévő hurok, az úgynevezett SECIS (*selenocysteine insertion sequence*) felismerésekor a transzláció befejezése helyett, SeCys épül be a polipeptidláncba (Birringer *et al.*, 2002; Mariotti *et al.*, 2013).

3.4.4.1 Szelenoproteinek

A molekuláris biológia szelenoproteineknek tekint minden fehérjét, melynek legalább egy szelenocisztein maradék található a polipeptidláncában. Ennek a definíciónak megfelelően több mint 50 fehérjecsaládban találunk szelenoproteineket, az *Archea*, *Eubacteria* és *Eukaryota* doménokban (Labunskyy *et al.*, 2014). Érdekes jelenség azonban, hogy míg az állatok országában számos szelenoproteint annotáltak (Castellano *et al.*, 2008), a növények és a gombák országából hiányoznak ezek a fehérjék, szerepüket ciszteintartalmú analógok töltik be (Bela, 2018). Az azonosított szelenoproteincsaládok több mint fele az egysejtű eukariótákban és a gerincesekben is megtalálható, mely ősi eredetükre utal. Bár jelentős különbségek mutatkoznak a fehérjék SeCys-tartalmában a gerincesek között, evolúciós szempontból csökken a szelenoproteinek száma az altörzson belül, mely összefüggésben áll a szárazföldi életmód elterjedésével, mivel lényegesen kisebb az emlősök szelenoproteomja a halak csoportjához képest (Lobanov *et al.*, 2007). A humán genomban 25 szelenoproteint kódoló gén ismert. A szelenoproteinek jelentős része valamilyen oxidoreduktáz-hatással bíró enzim, kevés kivételtől eltekintve aktív centrumjukban helyezkedik el a SeCys-maradék, kulcsfontosságú szerepet töltve be az enzimaktivásban (Reeves & Hoffmann, 2009).

A *szenenofoszfát szintetázok* nélkülözhetetlen enzimek a szelenoproteinek előállításához, mivel szelenidből és ATP-ből képesek aktivált monoszelenofoszfátot előállítani, mely a SeCys szintézis szelén donorja (Veres *et al.*, 1994). A szenenofoszfát szintetázok két eukarióta homológja, melyek megtalálhatóak az emlősökben és az emberben maguk is szelenoproteinek (Xu *et al.*, 2007).

A *glutathion-peroxidázok* a szelenoproteinek legnépesebb csoportja, funkciójukat tekintve szerves hidroxidokat és hidrogén-peroxidot redukálnak alkoholokká és vízzé. Ezáltal védik

a telítetlen zsírsavakat és a sejtmembránok integritását. A növényi glutation-peroxidáz-szerű enzimek aktív centrumjukban ciszteint tartalmaznak SeCys helyett, emiatt aktivitásuk is jelentősen elmarad a szelént tartalmazó enzimekéhez képest (Bela, 2018).

A *thioredoxin-reduktázok* elsődleges feladata a fehérje diszulfid-hidak redukálása a sejtben, aktivitásuk révén fenntartják az intracelluláris redox állapotokat. Nem csak feladatukban hasonlítanak a glutation-peroxidázokhoz, szerkezetükben és aktív centrumukban is sok hasonlóságot mutatnak. Számos izoformájuk ismert, mint a citoszolban vagy mitokondriumban található, az extracelluláris forma immunszabályozó hatással rendelkezik, a herékben kifejeződő változata pedig támogatja a férfi nemzőképességet. A thioredoxin-reduktáz hatásmechanizmusát vizsgáló kutatások árnyalták a szelén általános rákellenes hatásának ismeretét. A svéd Karolinska Intézetben végzett vizsgálatokban a rákos sejtek megemelkedett thioredoxin-reduktáz expresszióját figyelték meg, a gyors metabolizmus és osztódások okozta oxidatív környezet negatív hatásának kivédésére (Arnér & Holmgren, 2006). A jövőbe mutató tumorelles terápiai készítmények a thioredoxin-reduktázszint csökkentésére irányulhatnak a szelén beépülésének gátlása révén (Arnér, 2020).

A *selenoprotein P* az eddig ismert egyetlen olyan eukarióta fehérje, mely több SeCys-maradékot is tartalmaz. A vérplazmában előforduló glikoprotein funkciója nem teljesen ismert, antioxidáns tulajdonságával védi az *endothel* sejteket az érfalakban. Magas szeléntartalma ugyanakkor arra is enged következtetni, hogy szerepet játszik a szelén intercelluláris transzportjában és tárolásában (Mostert, 2000).

Ismert selenoprotein még a *iodothyronine deiodinase*, mely a pajzsmirigyhormonok aktiválásában/ deaktiválásában játszik fontos szerepet. Ezek az enzimek támasztják alá, hogy az alacsony szelénbevitel éppolyan káros és veszélyes az egészségre, mint a túl sok, toxikus mennyiség.

3.4.4.2 Szelénnel összefüggő betegségek

A megfelelő szelénbevitel fontosságát támasztja alá számos tünet, elváltozás és a szelénhiány kapcsolatáról leírt összefüggés, mint csökkent nemzőképesség, fáradékonyság, hajhullás, gyengült immunrendszer, melyek hátterében a nem megfelelő szelénbevitel állhat. A szelénnel szorosan összefüggő rendszerek az immunrendszer, az endokrin és kardiovaszkuláris rendszer. A „nyugati”-étrendet folytató globalizált populációban azonban viszonylag ritka a valódi szelénhiány, a legveszélyeztetettebb csoportok a szelénhiányos területeken élő emberek, illetve egyéb betegségekkel küszködők csoportja, mint például a rendszeres vesedialízisre szoruló

vagy HIV-fertőzéssel együtt élők (*Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds*, 2000). Mindemellett becslések szerint 1 milliárd ember érintett szelénhiányban világszerte (*Jones et al.*, 2017). Az ellátás fontosságát támasztja alá az is, hogy a kielégítő szelénbevitel csökkentheti az emlőrák, a tüdőrák, a nyelvcsőrák, a gyomorrák és a prosztatarák kockázatát (*Cai et al.*, 2016). A szelén pajzsmirigybetegekkel való összefüggései is ismertek (*van Zuuren et al.*, 2014), melyek csökkent hormontermeléssel járnak.

A krónikus és súlyos szelénhiánnyal összefüggésben két endémia ismert, a Keshan-betegség és a Kashin-Beck betegség. A Keshan-betegség tartós szelénhiány és vírusos fertőződés esetében alakul ki, nevét a kínai Hejlungcsiang tartomány Keshan megyéjéről kapta, ahol a betegséget először leírták. A megfelelő kezelés nélküli, kardiomiopátiát okozó betegség hátterében a lokális, szelénben szegény étrend és coxsackie vírusokkal való fertőződés áll. A betegség sikeresen kezelhető szeléntartalmú étrendkiegészítőkkel (*Keshan, Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*, 1979). A Kashin-Beck betegség egyfajta oszteoarthritisz, mely Kína, Tibet, Észak-Korea és Szibéria szelénben szegény területein elterjedt. A betegség kialakulásában több tényező is szerepet játszik, mint a mikotoxinok, és az ivóvíz fulvosavtartalma, azonban a szelénhiány kulcsfontosságú a kialakító körülmények között (*Jirong et al.*, 2012).

A szelénhiány diagnosztizálására a glutation-peroxidáz és szelenoprotein P szintjét vizsgálják a vérben, a hosszútávú szelénellátás vagy -kitettség vizsgálatakor a haj és köröm szeléntartalmát állapítják meg (*EFSA*, 2014).

Mivel kicsi a különbség a napi szelénszükséglet (55 µg/nap) és a szelénmérgezés (400 µg/nap) között, fontos megemlíteni a toxikus szelenózis tüneteit és kockázatát. Az akut és krónikus mérgezés hányinger, hányás, körömelszíneződés, körömvesztés, hajhullás, fáradtság és jellegzetes fokhagymaszagú lehelet tüneteivel járnak.

A szelénben gazdag területek kisebbek és lokalizáltak, mint a megfelelő vagy alacsony szelénellátottságúak, emiatt emberben ritka a természetes forrásból származó szelénmérgezés (*Raisbeck*, 2000). Kína Hupej tartományának egyes részein a talaj 11-27 mg/kg szelént tartalmaz, ahol a XX. században több száz szelénmérgezéssel összefüggő esetet írtak le (*Huang et al.*, 2013). Az akut szelénmérgezések jelentős része ipari tevékenységből és az étrendkiegészítők nem megfelelő használatából adódnak (*MacFarquhar et al.*, 2010).

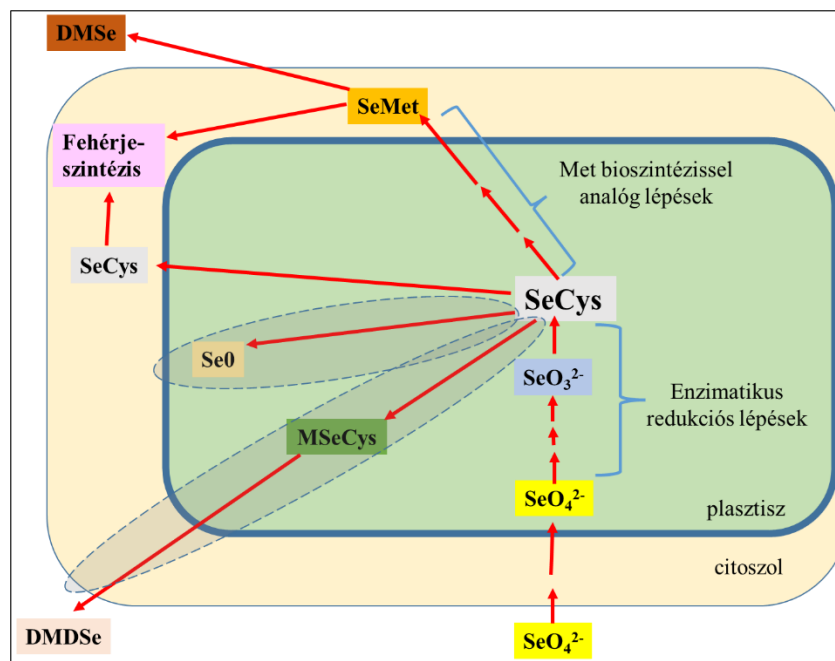
Gazdasági állatok esetében a szelén elengedhetetlen nyomelem a súlygyarapodás és szaporaság, továbbá megfelelő immunválasz és a hasnyálmirigy működés fenntartásában (Kim & Mahan, 2003; Surai & Fisinin, 2016). Baromfi esetében növeli a tojás eltarthatóságát és jótékony hatással van a tollképződésre. Kérődző állatoknál ismert a fehérizom-betegség (*White muscle disease* (WMD)) mely bárányok, borjak ellés utáni elhullását okozza (Muth & Allaway, 1963). A betegség oka a szelén és E-vitamin hiánya a szervezetből. Emiatt állattenyésztésben bevett megelőzése a vemhes állatok ellés előtti szelenit injekciózása (Kósa et al., 2018).

3.4.5 Szelén a növényvilágban

A hajtásos növények 3 csoportba sorolhatók a hajtás szelénakkumulációs képessége szerint:

- a.) hiperakkumulálók (>1000 mg/kg DW),
- b.) akkumulálók (100-1000 mg/kg DW) és
- c.) nem akkumulálók (<100 mg/kg DW) (Dhillon & Dhillon, 2003; Pilon-Smits, 2015).

A talajban előforduló leggyakoribb szelénformák a redox állapotoknak megfelelően a szelenát és a szelenit, melyek jellemzően nem specifikus módon a kénfelvételt szolgáló transzporterek segítségével jutnak a növényekbe (Schiavon et al., 2015). A szelenát jobban felvehető forma, mint a szelenit (Simon et al., 2007). A szulfát asszimilációs útvonalat követve a gyökérben, de leginkább a hajtásban a Se, mint kénanalóg épül be szerves molekulákba, legnagyobb részt SeCys-be és SeMet-ba (6. ábra). Ezek a szelenoaminosavak Cys és Met helyére véletlenszerűen épülnek be, így funkciót veszített, hibás fehérjéket hozva létre, mely a szelén növényekre gyakorolt toxicitásának egyik fő oka. Az ismert szeléntartalmú szekunder metabolitok száma folyamatosan nő a növényvilágban (Németh et al., 2013).



6. ábra: Növényi szelénfiziológia. SeO_4^{2-} : szelenát, SeO_3^{2-} : szelenit, SeCys: szelenocisztein, SeMet: szelenometionin, MSeCys: metil-szeleno-cisztein, DMDS: dimetil-diszelenid, Se0: elemi szelén, DMSe: dimetil-szelenid (saját szerkesztés Terry *et al.*, 2000; Dhillon & Dhillon, 2003; Pilon-Smits, 2015; Hu *et al.*, 2022 alapján).

A legtöbb növény képes a SeMet-t DMSe-dé alakítani, mely volatilis formaként a gázcseré során távozik a szervezetből (Terry *et al.*, 2000). A detoxifikáció másik módja a SeCys elemi Se-né és alaninná való bontása, mely inkább a hiperakkumuláló növényekre jellemző (6. ábra). A kétféle lebontási folyamat enzimmérszlete nem specifikus, a résztvevő fehérjék a kén-metabolizmusban vesznek részt. Az általános, kénanyagcsere mellett bizonyos fajokban ismertek szelénspecifikus útvonalak is. A SeCys metilációja metil-SeCys-né jelentősen képes növelni a szeléntoleranciát, mivel a metil-SeCys (MSeCys) nem tud fehérjébe beépülni. A metilációt végző SeCys metiltranszferáz (SMT) aktivitásának köszönhető megemelt szeléntolerancia a szelén hiperakkumuláló taxonok sajátossága, melyek akár 1,5%-os szelénakkumulációt is képesek elérni száraz tömegre vetítve. Ugyanakkor SMT jelenlétét nagy kén-tartalmú zöldségnövényekben, mint a brokkoli, hagyma és fokhagyma is leírták, melyek akkumulációja nem tekinthető specifikusnak (Pilon-Smits & Quinn, 2010; Domokos-Szabolcsy *et al.*, 2011; Pilon-Smits, 2015). A hiperakkumuláló fajok tipikusan szelénben gazdag talajon fordulnak elő, és legalább százszoros mennyiségben halmoznak fel szerves formában szelént (SeCys és szelenociszteint), szemben a többi fajhoz képest, melyek lényegesen kisebb mennyiségben és szervetlen formában tartalmazzák azt. Hiperakkumulálókra jellemző tulajdonság továbbá, hogy a magas szelénszint nem interferál a kénanyagcsere útvonalaival,

így szelénben gazdag környezetben ezek a fajok jobban növekednek, mint szelén nélkül. A hiperakkumulálókra jellemző volatilizáció nem SeMet-ből hanem metil-szelenociszteín (MSeCys) dimetildiszeleniddé (DMDSe) alakításával zajlik (6. ábra) (Terry *et al.*, 2000; Pilon-Smits, 2015; Hu *et al.*, 2022).

A nem akkumuláló növények esetében a szelén nagy része gyorsan a gyökérből a hajtásba transzlokálódik. Emiatt a szállítószövetek szervesetlen szeléntartalma viszonylag nagy. A szelén a kénhez hasonlóan az öregedő levelekből a fiatalokba és a reproduktív szervekbe (pollen, magház) kerül a vegetációs időszak során. A hiperakkumulálók szövet-, és szerv-specifikus raktározásra képesek, jellemzően a legtöbb szelén a levél epidermisz vakuolumokban, esetleg levélszőrőkben raktározódik. Az *Astragalus bisulcatus* idős, asszimiláló leveleiben a szelenát több mint 90 %-át teszi ki a szelénformáknak, ugyanakkor a fiatal levelekben döntő hányadban a redukált alakok vannak jelen (Pickering *et al.*, 2003). Fontos különbség, hogy a hiperakkumuláló növények szelenát-felvételét a talajoldatból nem befolyásolja a szulfát mennyisége. Szezonalitást tekintve a hiperakkumuláló fajok levelében tavasszal mérhető a legnagyobb szeléntartalom, míg nem akkumuláló esetében nyáron, a kén-tartalommal együtt mérhető a legtöbb szelén.

3.4.5.1 Szelénformák felvétele a növényekben

A kén és a szelén fizikai és kémiai hasonlóságuk miatt felvételük és útvonalaik kapcsolódnak a növényi anyagcserében. A talajoldatból felvett leggyakoribb forma a szelenát (SeVI), de emellett ismert a szelenit Se(IV) és szerves szelén fajták transzportja a gyökér epidermisz sejteken keresztül (Simon *et al.*, 2006, 2007). A szelenát felvételére a szulfáttal megegyezően a szulfát-transzporter fehérjék szolgálnak, ahol elektrokémiai gradienssel szemben, aktív módon, proton kotranszporttal jutnak a rizoszférából a citoplazmába. A szelenát bejutásakor, verseng a szulfát és a foszfát ionokkal, melyek jelenlétükkel csökkentik a szelénfelvétel mértékét.

A szelenit a szelenáttól eltérően passzív diffúzióval jut be a növényi szervezetbe, akkumulációjára pedig a foszfátgátló hatással van (Pilon-Smits & Quinn, 2010). A szelenit a szulfáthoz hasonló módon redukálódik és szerves vegyületekbe épül be. Szelenát és szelenit felvételt vizsgáló izotóp kísérletekkel bizonyították, hogy pár órával a kezelést követően a szelenát döntő részben változatlan formában van jelen a gyökérszövetekben, a szelenit ezzel szemben a vizsgált növényfaj akkumuláló képességétől függően változatos megoszlásban szelenát és szerves szelén-speciesek (pl: MeSeCys és SeMet) formájában volt jelen, viszont kifejezetten alacsony arányban maradt szelenitként (Pilon-Smits, 2015). A talajban

megtalálható szelénformák biológia hozzáférhetősége csökkenő sorrendben $\text{Se(VI)} > \text{SeMet} > \text{SeCys} > \text{Se(IV)} > \text{Se}^0 > \text{Se}^{2-}$ (Neal, 1995; Fordyce, 2013; El-Ramady et al., 2015).

A nanorészecskék és így a nanoszelén növényi sejtbe, illetve a szimplasztba való bejutásáról meggyőző bizonyíték még nem áll rendelkezésre. A sejtfa, mint a legfőbb akadálya a bejutásnak jellemzően 5-20 nm-es pórusokkal rendelkezik, ezzel megsűrve a bejutni képes részecskék méretét. Mindemellett fajoként is jelentős különbségek bizonyulnak a nanorészecskék felvételére. A talajból való felvétel és a sejtekbe jutás bizonyítására még nem ismertek megfelelő kvantitatív módszerek. *In vitro* kutatások során sikerült bizonyítani a pórusokon és szöveti sebzéseken keresztül a szelén nanorészecskék bejutását az apoplasztba és jótékony hatásukat a morfogenezisre (Domokos-Szabolcsy et al., 2012). Összehasonlító vizsgálatok során pedig kimutatták, hogy lényegesen kevesebb szelén épül be a növényi szövetekbe a nanoszelén kezelés hatására, mint szelenát esetében, ezzel együtt a nanoszelén nem okoz olyan toxikus tüneteket, mint a szelenát (Domokos-Szabolcsy et al., 2014). Különböző méretű fémoxid-nanorészecskével sikerült bizonyítani, hogy intra- vagy extracelluláris úton elérve a szállítószöveteket képesek a gyökértől a hajtás irányában transzlokálódni (Huang et al., 2003).

A szervetlen formák mellett ismert a szerves szelénmódosulatok gyökéren keresztül történő felvétele (Abrams et al., 1990). SeMet felvételét figyelték meg hidrokultúrák gabona esetében (Luo et al., 2019), azonban a szerves formák szabad, felvehető állapotban ritkák a természetben, a növények általi felvételük nem jelentős.

3.4.6 A szelén a takarmányozásban és élelmiszeriparban

3.4.6.1 Takarmányok szelénkiegészítése

Klaus Schwarz és Calvin M. Foltz német és amerikai kutatók 1957-ben publikált munkája óta ismert a szelén fontos szerepe az állati és emberi szervezet számára (Schwarz & Foltz, 1957). A két kutató táplálkozásban fontos nyomelemeket keresve élesztővel és cukorral etettek kísérleti patkányokat, melyek máj és izomkárosodás következtében elpusztultak. Amikor az élesztőt egy Amerikából származóra cserélték, az állatok életben maradtak. Hamar kiderült, hogy a szeléntartalomban volt különbség a két élesztő fajta között.

A nem megfelelő szelénellátásnak komoly állategészségügyi és gazdasági következményei lehetnek különösen a stresszes és gyorsan fejlődő haszonállatok esetében (Gulyás, 2014; Juhászné Tóth et al., 2019). Magyarországon a takarmányok szervetlen szelénsókkal (nátrium-szelenit, nátrium-szelenát) történő kiegészítését a 2003 óta hatályos Takarmánykódex

rendeletben szabályozza, a nyomelem szelén megengedett határértéke 0,5 mg/kg takarmánykeverékekben (*FVM rendelet a Magyar Takarmánykódex kötelező előírásairól*, 2003). A rendelet ugyanakkor kitér az ivarzási időszak és a szaporodásra való felkészülés elősegítése érdekében a takarmány szeléntartalmának növelésére. A húsmarháknak például 100 µg/kg, míg a tejelő teheneknek 300 µg/kg (szárazanyagra vetítve) szelén szükséges a normál fejlődéshez (*Mehdi & Dufrasne*, 2016). Mivel a legtöbb országban törvényben szabályozott a takarmányok szeléntartalma, emiatt a kiegészítésre használt forma döntő fontosságú a hasznosulás szempontjából.

A takarmányok szelén kiegészítésére legelőször szervetlen szelénsókat, nátrium-szelenitet és nátrium-szelenátot használtak. Általánosságban a szervetlen formák rosszabb felszívódással és hasznosulással rendelkeznek, mivel még szerves formákká kell alakulniuk. További hátrányuk, hogy túl nagy koncentrációban használva prooxidáns hatással rendelkeznek. Idővel azonban megjelentek a piacon a szerves szelénformákat tartalmazó takarmánykiegészítők, melyek legtöbbször SeMet formában tartalmazzák a szelént.

Élesztőgombákat gyakran használnak különböző ionok megkötésére, a biológiai hozzáférhetőség növelésére. A szelént képesek akár 2000 µg/g koncentrációban felhalmozni, ráadásul döntően szerves formákban (*Egressy-Molnár et al.*, 2016). A fortifikált élesztők a mérgezés elkerülése érdekében szerves formákká alakítják a táptalajból felvett szelént, mindezzel étrend- és takarmánykiegészítőket hozva létre (*Rayman*, 2004; *Kieliszek et al.*, 2015). A szelenizált élesztők *Saccharomyces*, *Candida*, és *Yarrowia spp.* leggyakrabban SeMet-t tartalmaznak, mint szerves szelénformát. Ilyen formában kerülnek alkalmazásra a takarmányozásban. A SeMet, szelenizált élesztő formájában a kérődzők szelénellátására alkalmasabb. A szintetikusan előállított hidrox-szelenometionin (HSeMet) 2013 óta elfogadott alternatív takarmány kiegészítő az Európai Unióban (*EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)*, 2013; *Sun et al.*, 2017). A biokémiai útvonalak folyamatos kutatása és új, hatékonyabb szerves szelén-formák vizsgálata folyamatosan fejlődő terület (*Erdelmeier & Moutet*, 2012; *Shini et al.*, 2015; *Sun et al.*, 2017). A szelenohomolantionin (SeHLan) könnyebben hozzáférhető szelénforrás mint a SeMet, mely általában fehérjékbe épülve van jelen és több metabolikus lépést igényel a hasznosulása (*Shini et al.*, 2015). SeHLan hidrofil tulajdonsága következtében gyorsan szívódik fel a tápcsatornából, takarmányozási szempontból emiatt monogasztrikus állatok számára ajánlott a használata.

3.4.6.2 Szelén az élelmiszerekben, táplálékkiegészítőkben

A nem megfelelő szelénbevitel összefüggésben áll a csökkent oxidáló szabadgyökök elleni védelem, és a különböző típusú daganatok és kardiovaszkuláris megbetegedések megnövekedett kockázatával (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008).

A fehérjékbe épített szerves szelénformák (SeMet, SeCys) a funkcionális élelmiszerek és takarmányok előállítása szempontjából jelentős, mivel a szeléntartalmú fehérjék és peptidek antioxidáns, májvédő és immunerősítő hatásúak (Zhang et al., 2020).

Az emberi szervezet 10-15 mg szelént tartalmaz átlagosan, melynek több mint egyharmada a vázizmokban található. 80 µg/l szelén a vérérumban elegendő a szelenoproteinek szintéziséhez. A toxicitás veszélye miatt egészségügyi szervezetek jellemzően nem tanácsolják a szelénpótlást csak ha 70 µg/l alatti a koncentrációja a vérplazmában (Alcântara et al., 2022). A szelén antioxidánsként a tokoferolokkal (E-vitamin) együtt vesz részt a metabolizmusban (Csapó & Csapóné Kiss, 2004). Átlagos étrend mellett 0,05-0,1 mg szelén jut a szervezetbe naponta, azonban a helyi talaj geológiai adottságai befolyásolják a helyben előállított élelmiszerek szeléntartalmát. A skandináv országokban például szelénrel szükséges dúsítani az élelmiszereket és a termőföldet, a táplálkozással bevitt szelén növelése érdekében. Finnországban az 1980-as évektől kezdődően alkalmaznak nátrium-szelenát kiegészítést a műtrágyákban, mellyel sikeresen megemelték a lakosság szelénbevitelét, a mérések kezdetekor az átlagos vérplazma szelénszintje 0,89 µmol/l volt mely 1,40 µmol/l-re emelkedett a 2010-es évekre (Alfthan et al., 2015). Hasonló problémákból kifolyólag Kínában szelénrel fortifikált hagymát, káposztát és gombát is termesztnek. Mongóliában a hatóságok 2016-ban programot indítottak, amelynek keretében szelénrel dúsított takarmányt adnak a baromfiknak. Az ilyen baromfik által termelt tojás segíthet csökkenteni a hiánytüneteket a lakosság körében. Az európai országokban, különösen az Egyesült Királyságban alacsony a szeléntartalma az élelmiszereknek (Stoffaneller & Morse, 2015). A WHO szerint a férfiak számára napi 40 µg, a nők számára pedig 30 µg szelénmennyiség ajánlott (WHO, 2011). Az Európai Unióban és az amerikai FDA irányelveiben nincs konszenzusos ajánlott napi mennyiség. Egyes források szerint mindkét nem esetében napi 55 µg az ajánlott mennyiség (Stoffaneller & Morse, 2015). Más vizsgálatok szerint viszont naponta 70 µg is szükséges lehet a megfelelő szelén szint fenntartásához (EFSA, 2014). Ugyanakkor napi 400 µg szelén bevitel toxikus a szervezetre és szelenózis betegség kialakulásához vezet, mely májkárosodással jár. Az ivóvíz szeléntartalma még a szelénben gazdag geológiai területeken is 10 µg/l alatti, így az ivóvízzel bevitt szelén

nem játszik fontos szerepet sem a megfelelő szelénbevitel sem toxicitás kialakításában (WHO, 2011).

A szerves szelénmódosulatok felszívódása az élelmiszerekből jónak mondható (kb. 70 - 95%). Ezt azonban befolyásolja a különféle élelmiszerek emészthetősége (Lyons *et al.*, 2007). A szeleno-metionin belép a normális fehérje metabolikus útvonalba, mint metionin antagonista, mely azonban így nem tud SeCys-né alakulni és szelenoproteinekbe épülni. Más megközelítésből azonban a SeMet kevésbé reakcióképes, mint a SeCys így a sejtben biztonságosabb felhalmozódást jelent, mint a megemelkedett SeCys koncentráció. A metabolizmus központi eleme a hidrogén-szelenid, mely magas szintje esetén a metilálódott változataiban volatilizálható és a légzés során távozik a szervezetből, illetve a vesében kiválasztva vizelettel ürül (Daniels, 1996). Általánosságban elmondható, hogy a növényi alapú élelmiszerek jobban hasznosítható formában tartalmazzák a szelént szemben az állati termékekkel, mint a húsfélék és hal, a növények felveszik, és főként a gabonafélékben, SeMet-formába alakítják azt (Tamás, 2016). Az étrend nagymértékben meghatározza milyen forrásból származik a populáció szelénellátása. A legtöbbet fogyasztott szelénforrások a gabonafélék, hús és a hal (Juhászné Tóth & Csapó, 2019). A tojás és tejtermékek bár kielégítő szelénforrásnak minősülnek, számos országban, kultúrában nem fogyasztanak elegendő mennyiséget belőlük a szükséges szelénmennyiség beviteléhez. A zöldségek és gyümölcsök szeléntartalma viszonylag alacsony a többi élelmiszerfajtaéhoz képest, a tengeri hal jó forrásnak minősül. Egy 1987-ben végzett felmérés szerint egy átlagosnak tekintett étrendben a marha-, sertés- és csirkehús, a tojás, és a kenyér együttesen kiteszik a szelénbevitel 50 %-át (Schubert *et al.*, 1987).

Az élelmiszerek és takarmányok szeléntartalma földrajzilag eltérő, mennyiségét erősen befolyásolja a lokális talaj szelénkészlete, például az USA-ban termesztett gabona több mint 2 mg/kg szelént is tartalmazhat száraztömegre vetítve, míg az új-zélandi gabona 0,11 a kínai Sanhszi tartományban termesztett 0,005 mg/kg szelént tartalmazott (Combs & Combs, 1986).

A népesség élelmiszerellátása jelenleg nem szolgáltat elegendő szelént a szervezet egészséges működéséhez. Így feltételezhető, hogy sok ember veszélyeztetett az oxidatív stresszel szemben, amely növeli a különféle krónikus betegségek kockázatát, mint a szív- és tüdőmegbetegedések, illetve a daganatos betegségek. Becslések szerint csak Kínában 400 millió embert érint az alacsony szelénbevitel. Ennek kivédése érdekében biztosítani kell az élelmiszerekkel a napi minimum 30-40 µg szelén bevitelét (Koller & Exon, 1986).

Az állati termékek szelénmennyisége tükrözi a fogyasztott takarmány Se-szintjét, míg a növények Se-tartalmát közvetlenül a talaj szeléntartalma szabja meg. A világ sok régiójában a talaj általában tükrözi az emberi populáció Se-státuszát. Vannak olyan területek, ahol a Se-szintje a talajban nagyon alacsony ($<0,05$ ppm), például Kína, Finnország és Új-Zéland egyes részei. Ezekben a régiókban jól ismertek az állatállomány Se-hiányának okai és az emberi egészségre gyakorolt hatása (Keshan, Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, 1979). Mindazonáltal a nagy Se-koncentrációjú (> 5 ppm) régiók talajaiban nettó többlet található, ahogyan azt Kanadában, Írországból, az USA nyugati részén, valamint Kína, Franciaország, Németország egyes területein megfigyelték. Egyes kutatások arról számoltak be, hogy az USA-ból származó élelmiszerek általában magasabb szelénszinttel rendelkeznek, mint az ausztrál vagy az Egyesült Királyságból és Új-Zélandból származó élelmiszerek (Stoffaneller & Morse, 2015).

Az élelmiszer-fehérjetartalma fontos tényező, amely befolyásolja a Se jelenlétét az ételekben, mivel a kémiai hasonlóságuk miatt a Se helyettesítheti az aminosavak kén-tartalmát: szelenometionin (SeMet), szelenocisztein (SeCys) és szelenocisztationin formájában.

A legtöbb növény nem képes nagy mennyiségű Se felhalmozásra (a koncentráció ritkán haladja meg a $100 \mu\text{g/g}$ -ot, száraz tömegre vetítve). Különböző növényfajok, mint például a fokhagyma (*Allium sativum* L.), az indiai mustár (*Brassica juncea* L.), a repce (*Brassica napus* L.) és néhány gomba ismertén Se-akkumulálók. Képesek nagy mennyiségű Se-t (> 1000 mg Se/kg) felvenni anélkül, hogy az negatívan érintené a termésmennyiséget. Ez elsősorban a SeCys és SeMet intracelluláris Se koncentrációjának csökkenésével magyarázható, amelyek általában beépülnek a fehérjékbe. Megfelelő mennyiségben fogyasztva ezek az élelmiszerek jelentős Se-forrást jelentenek. A paradicsom vagy brazildió (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) a szelénbevitel szempontjából érdekes élelmiszer, a talaj szelén státuszától függően egyetlen magban több szelén lehet, mint a napi szükséglet ($>90 \mu\text{g}$), melyet nagy arányban szerves, SeMet-formában tartalmaz (Alcântara et al., 2022). Mindemellett a brazildióban található szelén döntően SeMet formában van jelen (Dernovics et al., 2007; Hariharan & Dharmaraj, 2020).

3.4.7 A szeléndúsítás (fortification)

A dúsítás/fortifikáció (fortification) célja a mezőgazdasági haszonnövények ehető vagy takarmányként használt szerveiben a biológiailag hozzáférhető mikroelemek koncentrációjának növelése (Csapó & Albert, 2018). A növénynevelés szempontjából a szelekció és a

génszerkesztés eszköztára is azt a célt szolgálja, hogy jobb, kedvezőbb beltartalmi értékű élelmiszereket állítsunk elő (*Schiavon et al.*, 2020). Növénytermesztéstani megközelítésben azonban célzott és precíz mikrotápelemek műtrágyázását jelenti például a dinamikusan fejlődő nanotechnológia eredményeinek használatával (*Shalaby et al.*, 2016). Az agronómiai fortifikálással az alacsony szeléntartalmú területeken termesztett növények szervesen szelénrel dúsíthatók. Más megközelítésből, a dúsítás célja nem csak a takarmány és élelmiszerek mikrotápelem-szintjének növelése, hanem a növényi stressz tolerancia, egészségi állapot fokozása. A szelén és más növényi stressz források, mint bizonyos toxinok, biostimulánsok vagy nem esszenciális elemek, kétfajta dózis-reakciót váltanak ki, alacsony dózisu stimulációt és magas dózisu gátlást. Ez a *hormesis*nek nevezett jelenség megkönnyíti a növények új vagy változó környezetben való akklimatizálódását, és kulcsfontosságú tényező lehet az evolúciós folyamatokban (*Poschenrieder et al.*, 2013). Például a növényfajtól függően az alacsony koncentrációjú szelén fokozza a növény növekedését és mérsékli az abiotikus környezeti tényezők káros hatásait (*Garousi et al.*, 2017; *Zhu et al.*, 2017). Wang és munkatársai (2021) levélpermetezéssel kijutatott szelén hatására a növényi védelmi rendszer felerősödését és növekedett klorofilltartalmat találtak lucernában. Más tanulmány is beszámol az alacsony koncentrációjú szelenit kezelés klorofilltartalom-növelő hatásáról (*Bai et al.*, 2019).

Kultúrnövények szelén fortifikálására több módszer alkalmazható, a leggyakoribbak a levéltrágyaként való permetezés, a vetőmag szeléntartalmú oldatba áztatása és a talaj szelén-trágyázása (*Wang et al.*, 2021). A gyakorlatban sikeresen emelték már a szelénben szegény régiók élelmiszereinek szeléntartalmát ilyen módszerekkel (*Koivistoinen & Huttunen*, 1986). A szelén felvétele, allokációja és eloszlása függ a növényfajtól, az alkalmazott formától (pl.: szelenát, szelenit) és koncentrációjától, a talajtulajdonságoktól, a transzport fehérjéktől és transzlokációs mechanizmusoktól (*Li et al.*, 2008).

A növények szelénfelvétele elsősorban a talajban levő koncentrációtól, illetve fizikai-kémiai formáktól függ. Az alapkőzet típusa, a pH és a redoxpotenciál a talajban, egyes szerves és szervesen vegyületek jelenléte hat a szelén felvehetőségére. Ugyancsak a talajnedvesség és annak sótartalma, talaj-szulfát-koncentráció, növényfajok, talajkezelési gyakorlatok, az elem oxidációs állapota (abszorpció), az öntözővíz jellege és az éghajlati viszonyok mind befolyásolják a hozzáférhetőséget.

Annak ellenére, hogy szűk a határ a szükséges és toxikus szint között, kevés eset ismert mezőgazdasági eredetű (trágyázás, dúsítás következtében) szelénmérgezésről (*Suzuki et al.*, 1959).

Szeléndúsított takarmánynövények (fűfélék, lucerna, szilázs) hatékonyabbnak bizonyulnak a szervesetlen szelénformákkal (általában szelenittel) való takarmánykiegészítésnél. Séboussi és munkatársai (2016) tejelő teheneken végzett kísérletükkel kimutatták a tej és vér szelénszintjének emelkedését szelén fortifikált szilázs takarmányozásakor. Más tanulmányban szelén fortifikált lucernaszénával javítani sikerült szarvasmarha borjak szelénbevitelét, mely pozitív hatással volt az állatok vakcinációra adott immunválaszára, súlygyarapodására és csökkentette az elhullást (*Hall et al.*, 2013).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Kísérleti beállítások

A kísérletek során szelenát (SeVI), szelenit (SeIV) és vörös elemiszelén-szol (Se₀) kezeléseket végeztünk tenyészedenyes és szabadföldi kisparcellás lucernakultúrában. Mindkét beállításhoz a Debreceni Egyetem Bemutatókertjének (koordináták: 47°33'01.5"N 21°36'05.2"E) mészlepedékes csernozjom talaját használtuk. A kísérleti talaj kémiai és fizikai paramétereit a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: A tenyészedenyes és szabadföldi kísérletek során használt mészlepedékes csernozjom talaj néhány fizikai és kémiai tulajdonsága.

Tulajdonság	Érték
Elektromos vezetőképesség (EC _e , dS/m)	0,48 ± 0,01
(vízzel telített talajpép)	
pH (1:2,5 talaj:desztillált víz szuszpenzióban)	7,78 ± 0,03
Telítettség % (ml H ₂ O)/ 100 g talaj)	36,0 ± 1,62
szervesanyagtartalom (g/kg)	18,69 ± 0,14
Teljes makro- és mikroelem tartalom (mg/kg)	
N	0,155 ± 0,008
P	2020 ± 140
K	5860 ± 240
Na	177 ± 21
Ca	17100 ± 500
Mg	5160 ± 120
S	220 ± 5,6
Fe	19500 ± 600
Mn	599 ± 12
Zn	65,6 ± 2,1
B	16,5 ± 1,25
Cu	18,6 ± 2,07
Mo	nd
Ba	115 ± 7,2
Cr	37,9 ± 1,55
Al	18800 ± 500
Co	8,46 ± 0,97
Ni	24,3 ± 1,5
Pb	11,8 ± 0,9
As	3,96 ± 0,15
Se	0,315 ± 0,04
Sr	58,4 ± 1,8
Cd	nd

nd= nem detektált

A kezelésekhez szeléntartalomra vonatkoztatva nátrium-szelenátból (VWR International Kft., USA) és nátrium-szelenitből (VWR International Kft., USA) készítettünk desztillált vízzel törzsoldatokat, melyeket megfelelő koncentrációra hígítva az öntözővízzel juttattunk ki. A kémiai úton szintetizált vörös elemiszelén-szolt, szeléntartalom mérést követően a szükséges koncentrációra hígítottuk. A szintézis körülményeit és a vörös elemiszelén-szol karakterizálását a 4.4. alfejezet tartalmazza. A tenyészedényes és szabadföldi beállításnál alkalmazott koncentrációkat az 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: A tenyészedényes és szabadföldi kísérletekben alkalmazott koncentrációk nátrium-szelenátból (Se(VI), nátrium-szelenitből (Se(IV) és a vörös elemi szelén szolból Se(0).

tenyészedényes kísérlet				
szelénforma	kontroll Ø	nátrium-szelenát Se(VI)	nátrium-szelenit Se(IV)	vörös elemiszelén-szol Se(0)
kijuttatott mennyiség (mg/kg)	0	1 10 50	1 10 50	- 10 50
szabadföldi kísérlet				
szelénforma	kontroll Ø	nátrium-szelenát Se(VI)	nátrium-szelenit Se(IV)	vörös elemiszelén-szol Se(0)
kijuttatott mennyiség (mg/m ²)	0	5 50	5 50	50 100

A növénynevelés során fenológiai és biomassa adatokat rögzítettünk. Mindkét termesztésből származó friss lucernát zöld biofinomítással feldolgoztuk és beltartalmi, analitikai vizsgálatokkal jellemeztük, melyeknek részletes leírását a következő alfejezetek tartalmazzák.

4.1.1 Tenyészedényes lucerna kísérlet, szelénkezelések és a mintavétel (betakarítás) módja

A tenyészedényes lucerna kísérlethez 2018 februárjában gyűjtöttünk feltalajt (0-25 cm) a Debreceni Egyetem Bemutatókertjéből (a kísérleti talaj fizikai, kémiai tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza). A talajt acél növénynevelő asztalokon szétterítve légszárazra szárítottuk, a nagyobb rögöket aprítottuk és átszitáltuk ($\varnothing \leq 4\text{mm}$) a durva mechanikai heterogén anyagok eltávolítása érdekében. A homogenizált talajt zárt, fekete polietilén fóliakonténerekbe töltöttük (2 x 80 x 350 mm-es (9 l)), 8 kg-ot konténerenként. 2018 március 12-én végeztük a magvetést 'Tápiószelei 1' lucerna fajtaival (*Medicago sativa* L. var. 'Tápiószelei 1'), 0,5 g vetőmagot szórtunk minden konténerbe, melyeket a vetést követően annyi csapvízzel öntöztünk meg, hogy megőrizzük a talaj ideális 70:30=víz:levegő térfogatszázalék megoszlását. A növényeket nyitott fóliasátorban neveltük a teljes vegetációs periódus alatt. A szükséges öntözővíz mennyiségét tömegméréssel állapítottuk meg, melyet rendszeresen pótolunk fokozott figyelemmel az

elcsorgás elkerülésére. Az öntözéshez csapvizet használtunk és a talaj víztelítettségét 75% körül tartottuk, talaj-visszaméréssel ellenőrizve.

A magvetést követő 9. héten, 2018.05.17-én egy alkalommal végeztük a szelénkezeléseket. A lucerna növények ekkor fiatal, 5-10 leveles fenológiai állapotban voltak (7. ábra). A kezeléshez 5, 10 és 50 mg/kg talaj koncentrációjúra hígítottuk a törzsoldatokat, 1 liter végtérfogatban, melyet egyenletesen juttattunk ki a kísérleti talaj felszínére, ügyelve annak víztartó képességére (360 ml/kg talaj). A vörös elemi szelénkezelést a 8. ábra szemlélteti. A tenyészedényes kísérletben alkalmazott szelénformákat és töménységüket az 3. táblázat foglalja össze. Az 50 mg/kg Se(VI) kezelés esetén a növények toxikus klorózis tüneteit mutatták (Kolbert *et al.*, 2019) és pár napon belül elpusztultak, így további vizsgálatokat nem végeztünk ezzel a kezeléssel (7. ábra).



7. ábra: Szelénnel kezelt tenyészedényes lucernanövények 5 nappal a talajkezelés után. A szövegbuborékokban a szám a kezelés koncentrációját jelzi mg/kg-ban kifejezve (5,10 és 50). Az Se(0) vörös elemi szelén, az Se(IV) szelenát, az Se(VI) szelenitkezelést jelöl. A kontroll növények nem kaptak szelénkezelést.



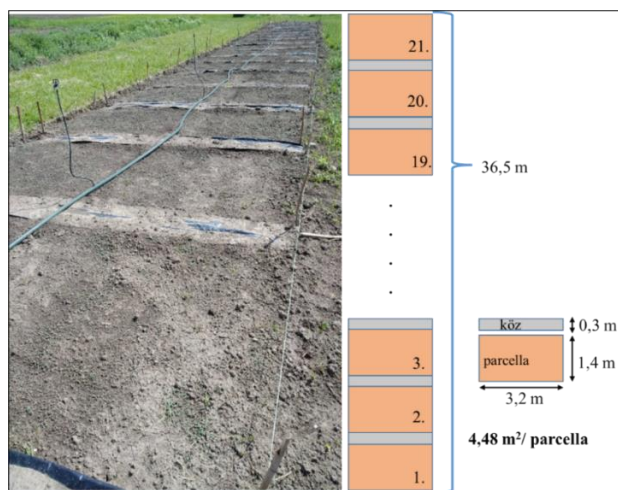
8. ábra: Vörös elemiszelén-szol (Se0) kezelés tenyészedényes lucernanövények talaján 2018. május 17-én.

A kezelést követően, a kísérlet végéig csapvízzel öntöztünk, tápanyag utánpótlást, műtrágyázást nem végeztünk. Az első betakarítást 2018. június 5-6-án, a másodikat július 4-5-én, a harmadikat július 31-én és az utolsó, negyedik betakarítást augusztus 30-án végeztük.

A betakarítások alkalmával morfológiai vizsgálatokat végeztünk, vizsgáltuk a hajtások szárazanyagtartalmát, hosszát és az ízközők számát.

4.1.2 Szabadföldi lucernatermesztés kísérleti beállításai és az alkalmazott szelénkezelések

A tenyészedényes kísérletek tapasztalatainak figyelembevételével 2019-ben kisparcellás lucerna kísérletet állítottunk be, a szeléndúsítás lucerna zöld biofinomításra gyakorolt hatásának feltárására. A szabadföldi kísérletet a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Bemutatókertjében végeztük. A kísérletben a tenyészedényes vizsgálatoknál használt 'Tápiószelei-1' lucerna fajtát használtuk. A kísérleti terület talajtani tulajdonságai megegyeztek a tenyészedényes vizsgálatokhoz használt talajával (2. táblázat). A kísérleti parcellákat 3,2 x 1,4 m területűnek választottuk, a parcellák közötti 30 cm-es elválasztó sávokat fekete fóliával takartuk le (9. ábra). Az egyforma méretű parcellák egy sorban helyezkedtek el, a szelénkezeléseket *random block design* szerint, 3 ismétlésben alkalmaztuk. A talajelőkészítést és magvetést kézzel végeztük. Mikroszórófejes öntözőrendszert telepítettünk a kísérleti területre és az időjárási körülményekhez igazodva hetente 2-3 alkalommal öntöztük a növényállományt. Három betakarítást végeztünk a szelénkezelések után, 2019. július 1-én, július 31-én és augusztus 26-án az újrahajtást figyelembe véve.



9. ábra: Szabadföldi kisparcellás lucerna szelénkezelés kísérleti beállításai 2019-ben.

A zöld lucernát a növénytermesztési gyakorlatnak megfelelően, zöldbimbós-állapotban takarítottuk be. A kézi betakarítás során minden parcelláról összegyűjtöttük és lemértük a friss

zöld biomassza tömegét ± 5 g pontosságú digitális mérlegen (PCE-PB 60N, PCE Kft., Németország), parcellánként 1 kg zöld lucernát pedig műanyag zsákokba szedtünk és a laboratóriumba szállítottuk, ahol megkezdjük a feldolgozását zöld frakcionálással.

A tenyészedényes kísérletben tapasztalt nagy szelén koncentrációk ismeretében a szabadföldi beállításnál kisebb koncentrációkat választottunk az ionos szelén-formák, a (Se(VI) és Se(IV)) esetében. A kezeléseket egy alkalommal végeztük el, amikor a kikelt növények 5-10 leveles fenológiai állapotban voltak. Nátrium-szelenátból és nátrium-szelenitből 5 és 50 mg/m² koncentrációjú kezeléseket végeztünk. A vörös elemiszelén-szolt (Se(0)) 50 és 100 mg/m² koncentrációkban juttattuk ki. A talajkezeléseket kézi permetező segítségével (10. ábra), egyenletesen oszlattuk el a parcellákon, minden kezelésből és kontrollból 3 ismétlést állítottunk be.

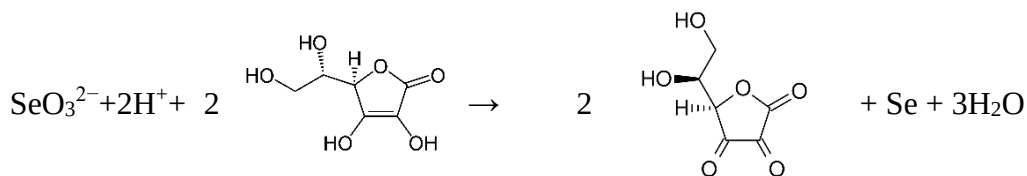


10. ábra: Vörös elemi szelén szol hígítása és kézi permetezőkbe adagolása.

4.4 A vörös elemi szelén-szol előállítása és karakterizálása

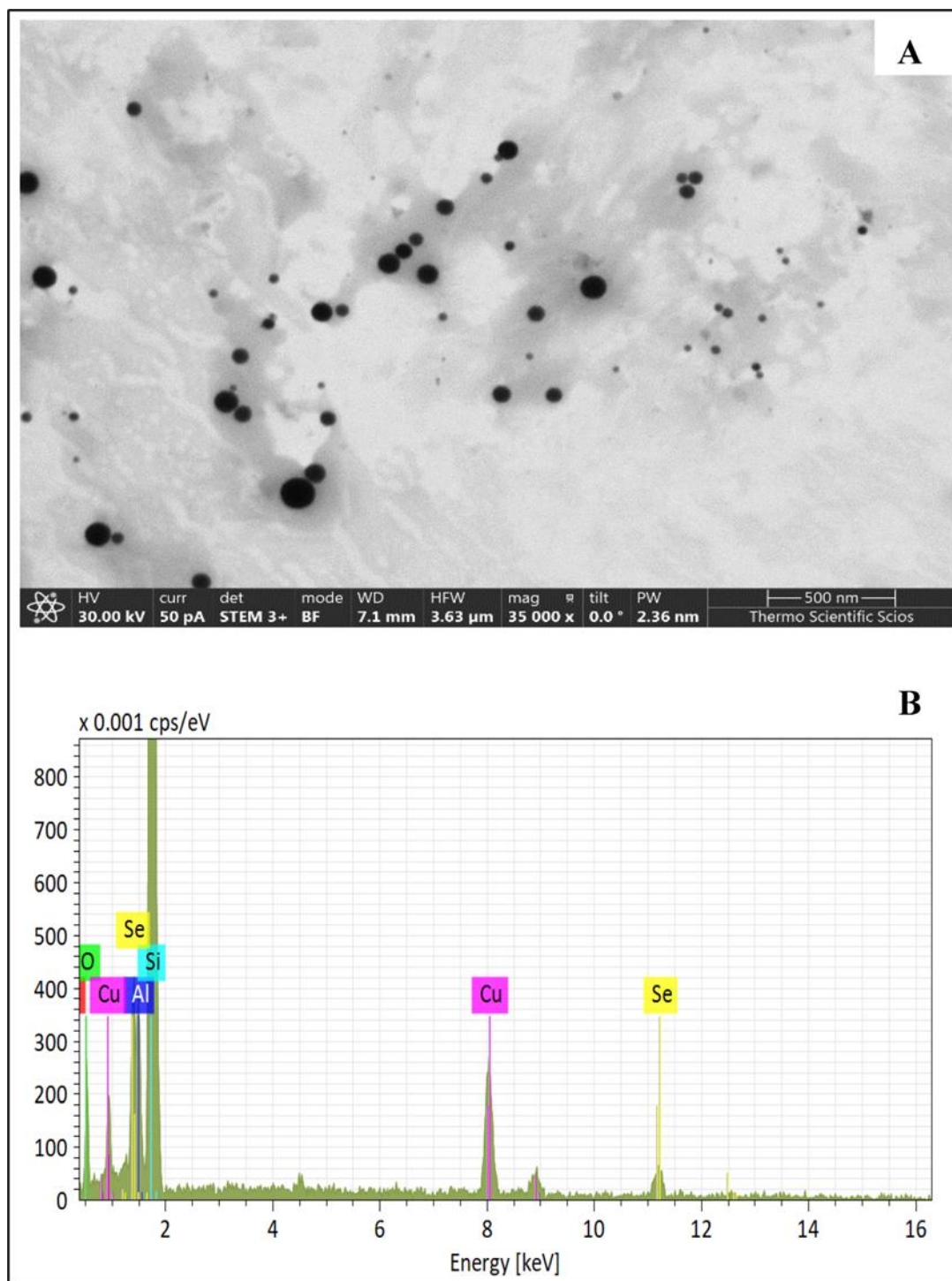
A kísérletes összehasonlításban alkalmazott nanométerű vörös elemi szelénrészecskéket kémiai szintézissel állítottuk elő. 500 ml 12,7 mM-os koncentrációjú nátrium-szelenit oldathoz 250 ml 50 mM-os koncentrációjú L-aszkorbinsavat csepegtettünk intenzív keverés közben, majd 1 g nátrium-dodecil-szulfátot adtunk az oldathoz a képződő vörös elemi szelén aggregálódásának megelőzése érdekében. A reakcióelegyet további 3 órán keresztül kevertettük, míg az oldat színe stabilan vörösre váltott a képződő elemi szelénrészecskék miatt. Ezt követően a keletkező szol térfogatát 1 l-re egészítettük ki Milli-Q vízzel (Millipore Kft., Franciaország) és 10000

RPM-en centrifugáltuk. A pelletben összegyűlt vörös elemi szelénrészecskéket vízben újra szuszpendáltuk és ultrahangos kezeléssel diszpergáltuk (Sonics VCX 750, Sonics & Materials Rt. USA). Az így elkészített szuszpenziós szol szeléntartalmát ICP-OES (Vista-Pro, Varian Rt. USA) segítségével határoztuk meg. A szintézis során lejátszódó reakció:



Az eljárás lényege, hogy az aszkorbinsav dehidroaszkorbinsavvá oxidálódik miközben vörös elemi szelénre (Se) redukálja az oldatban lévő szelenit ionokat (SeO_3^{2-}).

A kémiai szintetizált vörös elemi szelénrészecskék karakterizálására, alak és méret szerinti jellemzésére Thermo Scientific Scios 2 DualBeam pásztázó elektronmikroszkópot (Waltham, MA USA) alkalmaztunk. A készüléket STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) üzemmódban, STEM 3+ transzmissziós detektorral és 30 keV gyorsítófeszültségen használtuk. A mintaelőkészítésben a vörös elemi szelénszolt amorf szénnel bevont rézrácsra ($d=3\text{mm}$) vittük fel. A gömb alakú elemi szelénrészecskék mérettartománya 60-150 nm között változott (11. ábra/A). A részecskék elemi összetételét SEM (Scanning Electron Microscope) technikával, EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) detektorral igazoltuk (11. ábra/B). A szelén mellett található elemek a mintatartóból származtak.



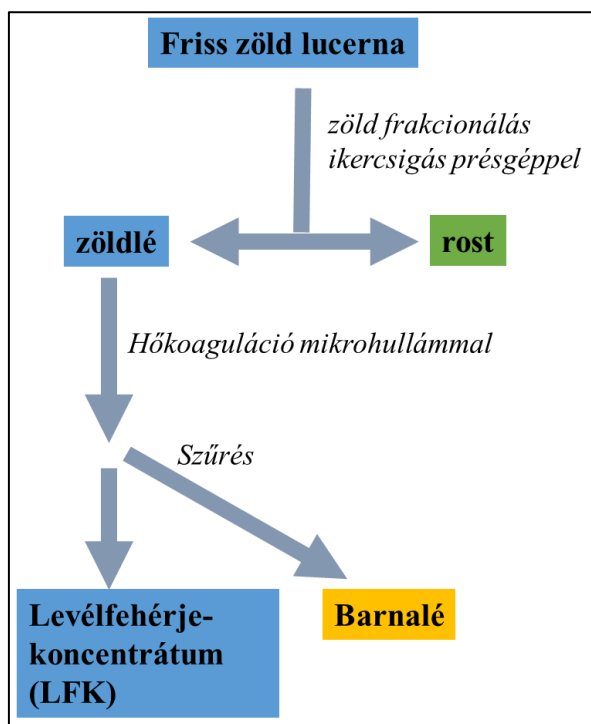
11. ábra: A: kémiai úton szintetizált elemi szelénrészecskék pásztázó elektronmikroszkópos felvétele. B: az elemi szelénrészecskék kémiai összetétele (Kovács et al., 2021a).

4.5 Zöld biomassza betakarítás és feldolgozása a tenyészedényes és kisparcellás kísérletből

A tenyészedényes kísérletből a vegetációs időszak során 4 betakarítást végeztünk hozzávetőlegesen 30 napos eltérésekkel. Az első betakarítást a szelénkezeléstől számított 39. napon végeztük, a termesztési gyakorlatnak megfelelően zöldbimbós-állapotban, a betakarítások alkalmával a teljes leveles szárát levágtuk. A levágott lucernahajtásból tenyészedényenként 10 átlagos egyed levél és szár részekre választottunk szét és úgy értékeltük, a többi (400-600 g) zöld frakcionálással feldolgoztuk.

A kisparcellás kísérletből a lucernabetakarításokat minden mintavétel esetén a reggeli órákban végeztük megakadályozva a napsugárzás és meleg miatti hervadást, illetve kihasználva a reggeli órákban a hajtások megnövekedett turgorát. Kézi betakarítás során a teljes leveles szárát levágtuk, 5-10 cm-es szárrészt hagyva a növények újrarahajtásához. A levágott hajtásokat műanyag zsákokba gyűjtve 10 percen belül a laboratóriumba szállítottuk, ahol a feldolgozásig hűtőszekrényben 4 °C fokon tároltuk. A szabadföldi kísérlet során zöld frakcionáláshoz szelénkezelésenként háromszor 1 kg friss zöld biomasszát mértünk ki ± 1 g pontosságú mérleg segítségével (PCE-PB 60N, PCE Kft., Németország).

A zöld biofinomítás alaplépéseit követve dolgoztuk fel a zöld biomasszát, melynek folyamatát a 12. ábra mutatja.



12. ábra: A zöld biofinomítás folyamatábrája.

A zöld frakcionálás technológiája alapjaiban szabja meg a feldolgozási folyamat végén keletkező termékek minőségi és mennyiségi tulajdonságait. Kísérleteink során a nemzetközi szakirodalomban leírt és széles körben alkalmazott ikercsigás présgépet használtunk. A présgép (Angel Juicer 5500, AngelCo., Dél-Korea) segítségével a teljes leveles szarat kipréseltük és műanyag edényekbe gyűjtöttük a keletkező préslevet (zöldlé) és présmaradványt (rost) (13. ábra). Az *Angel 5500* présgép 82 RPM fordulatszáma túlmelegedés nélkül, kíméletesen és jó hatékonysággal alkalmazható friss zöld biomassza frakcionálására.

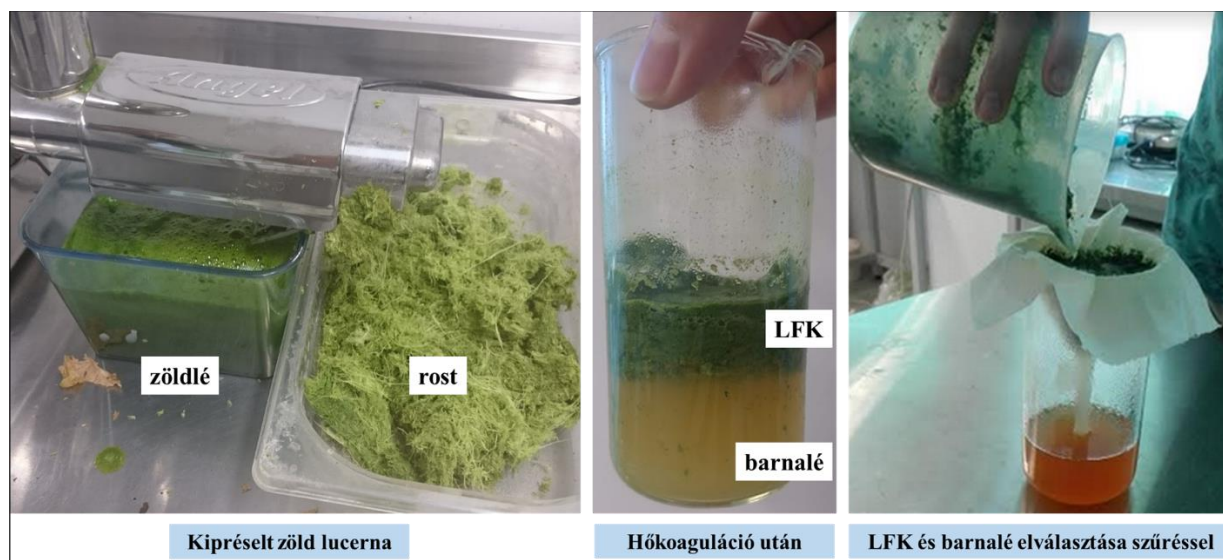


13. ábra: *Angel Juicer 5500*, ikercsigás présgép működés közben. A gép paraméterei: 263 x 488 x 194 mm, 150 W teljesítmény, 42 mm töltőnyílás, 82 fordulat/perc.

A folyamat végén feljegyeztük a két frakció (zöldlé és rost) friss tömegét ± 1 g pontossággal. A rostfrakcióból táramérlegen 100 g-ot műanyag edénybe mértünk, és azonnal $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon lefagyasztottuk. Az 1 kg zöld biomasszából keletkező zöldlében lévő fehérjét szabadalmaztatott mikrohullámú hőközlésen alapuló technikával koaguláltuk, $80\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletet elérve (Fári & Domokos-Szabolcsy, 2018). Digitális hőmérő (TFA 30.1058.02, TFA Kft., Németország) segítségével ellenőriztük a minták hőmérsékletét a kicsapás során, a hőkiegyenlítődés érdekében műanyag keverőbottal óvatosan összekevertük a kicsapódó makrokoagulumokat. A folyamat végére a zöldlé jól látható szerkezeti változáson ment keresztül. A kicsapódott sötétzöld színű levélfehérje koncentrátum (LFK) a sárga színű, átlátszó folyadékban (barnalé) lebeg (14. ábra).

A két frakciót pamutból készült vászonanyagon történő szűréssel választottuk el egymástól (12. és 14. ábra). A mennyiségi adatok feljegyzése után az LFK-t lefagyasztottuk. Mellette azonban natív formában hagyunk kipréselt zöldlevet is az összevethetőség miatt. A feldolgozás során keletkezett zöldlé, rost és LFK frakciókat liofilizálással (Alpha 1-4 LSC basic, Martin Christ

Rt., Németország) szárítottuk és kávédaráló segítségével leporítva homogenizáltuk. Az így készített mintákat simítózáras műanyagzacskókban, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tároltuk a mérésekhez. A barnalé frakciót fagyasztva tároltuk és folyadék formában használtuk a további vizsgálatokhoz.



14. ábra: A zöld biofinomítás folyamata képekben, a folyamat végén keletkező frakciókkal, rost, levélfehérje-koncentrátum (LFK) és barnalé.

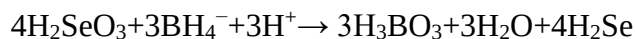
A zöldlé frakciónak meghatároztuk a pH-értékét digitális pH-mérővel (Mettler Toledo S20 Seven Easy, Svájc) és oldott szárazanyag-tartalmát kézi refraktométerrel. A barnalé-frakciót pH- és vízdoldható szárazanyagtartalom-mérést követően lefagyasztottuk.

4.6 Teljes szeléntartalom meghatározás

A komplex növényi minták teljes szeléntartalmának meghatározásához salétromsavas roncsolást végeztünk Sztrik, illetve Kovács és munkatársai (Kovács *et al.*, 2000; Sztrik, 2016) által leírt módszerek kombinációjával.

A roncsolást Velp nyitott roncsolóblokkban (Cole-Parmer BH-250, VELP Kft., Olaszország) végeztük. A liofilizált, porított mintát (200 mg) 3 ml tömény salétromsavban (65 (m/m) % HNO_3) 1 órán keresztül $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon Kjeldahl-csővekben forraltunk. A minták szobahőmérsékletre hűlése után 2 ml hidrogén-peroxidot (35% H_2O_2) adtunk és $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokra melegítettük további 1 órára. Ismét hűlni hagytuk a mintákat majd a szelenát szelenitté redukálása és a salétromsav redukálása érdekében 20 ml 6M HCl-ot adtunk hozzájuk és további 1 órán át $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon forraltuk. Kihűlést követően szűrőpapíron (retenció: $15\text{ }\mu\text{m}$) leszűrtük a roncsolatokat. A mintaelőkészítés végén Milli-Q vízzel 50 ml-re egészítettük ki a minták térfogatát. A savas roncsolatokból határoztuk meg a minták teljes szeléntartalmát.

A szelén fortifikált és frakcionált növényi minták teljes szeléntartalmát hidridgeneráló-atomfluoreszcens spektrométerrel (HG-AFS) állapítottuk meg. A méréshez PSA 10.055 Millenium Excalibur (PS Analytical Ltd., Egyesült Királyság) műszert és PSA M025S022 Millenium szoftvert használtunk. A savas roncsolatok szelenittartalmát nátrium-borohidrid (NaBH_4) segítségével hidrogén szeleniddé (H_2Se) redukáljuk a következő reakció szerint:



A szelénessav (H_2SeO_3) hidrogén-szeleniddé (H_2Se) redukálásához 0,1 M-os NaOH és 1,4 (m/V) % nátrium-borohidrid (mindig frissen készített) oldatát használtuk. A keletkező H_2Se gázt argon vivőgáz folyamatos, 15 l/perc sebességű áramoltatásával öblítettük ki a gáz folyadék elválasztóedényből. A feleslegben maradt borohidrid ionokból (BH_4^-) savas közegben hidrogéngáz (H_2) keletkezik. Egy higroszkópos szárítómembránon (*Perma Pure*) áthaladva kiszűrtük a vízgőzt a gázelegyből, majd ezt követően az argon-hidrogén diffúziós lángban elégve atomizálódik a minta szeléntartalma (*Irizarry et al.*, 2001). Az üregkatód lámpából érkező, lángra fókuszált, monokromatikus fény gerjeszti a szelént, mely fluoreszcens fényt bocsájt ki. A lámpa fényére merőlegesen elhelyezett szűrő 200 ± 10 nm tartományú, mely lefedi a gerjesztett szelén 3 legfontosabb fluoreszcens sávját (196,02; 203,98 és 206,28 nm), ezen keresztül jutnak a fotonok a fotoelektron-sokszorozó detektorba. A mérésekhez nátrium-szelenitből 20, 100 és 200 $\mu\text{g/l}$ koncentrációjú kalibrációs standardokat készítettünk, és a mintákat három ismétlésben mértük le.

4.7 Szelénspeciáció mérések

A szelénfortifikált lucernafrakciók speciáció-analitikai vizsgálataihoz vizes és enzimes kivonatokat készítettünk Dernovics és munkatársai szerint (2002). A vizsgálatokat azokból a lucernalevél-, -szár-, LFK-, rost- és barnalé-mintákból végeztük, melyek a legnagyobb szeléndózsist kapták a három szelénformából, a 10Se(VI), 50Se(IV) és az 50Se(0) kezeléseket. A liofilizált és porított mintákból 0,200 g-ot 15 ml-es Falcon csövekbe mértünk és 9 ml Milli-Q vizet adtunk hozzá. Barnalé minták esetében 1 ml mintához 9 ml vizet adtunk. A csöveket 10 percig ultrahangos vízfürdőbe helyeztük szobahőmérsékleten. A kivonatokat az ultrahangos feltárás után 9000 g-n 10 percig centrifugáltuk, és a felülúszókat új Falcon csövekbe gyűjtöttük, ezeket a mintákat vizes kivonatokként használtuk tovább. Dithiotreitol (DTT) adtunk a vizes kivonatokhoz úgy, hogy a DTT végkoncentrációja 0,01%-os legyen. A DTT redukáló tulajdonsága védi a szerves és szervetlen szelénformákat az oxidációtól. A centrifugálás után maradt pelletből készítettük az enzimes kivonatokat. Ennek során 40 mg Protease XIV enzimet

(Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) 9 ml 100 mM-os TRIS (pH=8) pufferben oldottunk fel mintánként. Az így előkészített mintákat 37 °C fokos vízfürdőben egy éjszakán át horizontális rázatás mellett inkubáltuk. Másnap reggel ellenőriztük a minták pH-ját és szükséges esetben 0,1 M-os HCl vagy 0,1 M-os KOH segítségével pH=8-ra állítottuk vissza. Minden mintához újabb adag 40 mg Protease XIV enzimet adtunk 1 ml TRIS pufferben (pH=8) oldva, majd további 6 órán át inkubáltuk 37 °C-on rázatva. Az enzimes feltárás végén 9000 g fordulaton 10 percig centrifugáltuk a mintákat és a felülúszókat tiszta Falcon csövekbe gyűjtöttük. Az enzimes kivonatokhoz is DTT-t adtunk 0,01%-os végkoncentrációban. Az enzimes feltárás sikerességét SELM-1 szelénfortifikált élesztő (National Research Council of Canada (NRC - CNRC), Kanada) CRM tanúsított referenciaanyag vizsgálatával állapítottuk meg. A referenciaanyagot a mintákkal párhuzamosan enzimesen tártuk fel és mértük. A vizes és enzimes kivonatok is –80 °C-on tároltuk a speciáció mérésekig. A mérés előtt a kivonatok 0,22 µm pórusméretű PTFE egyszer használatos fecskendőszűrőn szűrtük át, majd injektáltuk.

A szelén *species*-ek elválasztását és mérését anion cserélő, kapcsolt kromatográfiás rendszerben végeztük. Nagynyomású folyadék kromatográf-induktív csatolású plazma tömegspektrométer rendszerben (HPLC-ICP-MS) egy Rheodyne kézi injektorral felszerelt Thermo Spectra System P4000 HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kapcsolódott egy Thermo Scientific X-Series II ICP-MS tömegspektrométerhez, mellyel a 78 és 80 tömegszámú szelén izotópokat detektáltuk. A másodlagos fragmentáció érdekében H₂:He =7%:93% arányú ütköztető gázt használtunk 6 ml/perc áramlással. A kromatográfiás elválasztást egy Hamilton PRP-X100 SAX (250 mm × 4.1 mm × 10 µm; Hamilton, Reno, NV) kolonnán végeztük 1,9 ml/perc áramlási sebességgel és gradiens elúcióval. Az alkalmazott gradiens profilt a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Gradiens elúció a szelén-speciáció mérések során

Idő (perc)	Mozgó fázis	
	A: 10 mM ammónium-acetát	B: 300 mM ammónium-acetát
0-8,5	15%	85%
8,5-8,6	100%	0%
8,6-11,5	100%	0%

4.8 Nyersfehérje-meghatározás

A szeléndúsított lucernaminták nyersfehérje-tartalmát Kjeldahl-módszerrel határoztuk meg. A mérések akkreditált körülmények között MSZ EN ISO 5983-2:2009 számú szabvány szerint történtek. Kjeldahl roncsolócsövekbe 1 g liofilizált, porított szilárd mintát vagy annak megfelelő mennyiségű folyékony barnalevet mértünk, melyhez 15 ml tömény kénsavat adtunk. Tecator Digestion blokkroncsolóban 420 °C fokon 1,5 órán keresztül történt a minták roncsolása. A reakció végére a minták teljes nitrogéntartalma ammónium-szulfáttá alakult. Az ammóniát 33%-os NaOH-dal és melegítéssel szabadítják fel és ismert koncentrációjú bórsavban nyeletik el. A feleslegben maradt bórsav mennyiségét sav-bázis titrálással határozzák meg. Így a titrálás során a fogyás és kénsav, bórsav mennyiségének ismerete alapján kiszámítható a nitrogén mennyisége a mintában. A nyersfehérje-tartalmat egy előzetesen megállapított konverziós faktorról való szorzással kapjuk a nitrogén tartalomból, a következő egyenlet alapján:

$$\text{Nyersfehérje-tartalom (\%)} = \text{N tartalom (\%)} \times 5,6$$

4.9 Aminosavösszetétel-meghatározás

A fehérjealkotó aminosavak mérése az MSZ EN ISO 13903:2005 számú szabvány szerint történt. A mintaelőkészítés során savas közegben hidrolizáljuk a minta fehérjetartalmát. Ehhez 25 mg nitrogéntartalomnak megfelelő mennyiségű mintát mérünk a hidrolizáló edénybe. A mintához 6 M HCl-t adunk, inert N₂ gázzal átöblítjük az edény belsejét és légmentesen lezárjuk. 24 órán keresztül 110±1 °C hőmérsékleten szárítószekrényben hidrolizáljuk a mintákat. A hidrolízis végén leszűrjük és vákuumdesztilláló készülékkel eltávolítjuk a feleslegben maradt savat, közben bidesztillált vízzel mossuk, a folyamat végére szirupszerű állagúvá válik a minta. A mintákat műanyag centrifugacsövekbe mossuk és citrát pufferben feloldjuk (pH=2).

Az aminosavak elválasztásához INGOS AAA500 (Ingos Rt., Csehország) aminosav-analizátort használtunk. Az ioncserés kromatográfia során pH-gradienst alkalmaztunk, a komponenseket kolonna utáni származékképzéssel tettük detektálhatóvá. A ninhidrinnel képzett színes terméket 440/570 nm-en mértük.

4.10 Összes fenoloskomponens-tartalom és fitonutriensek kvalitatív, kvantitatív meghatározása

4.10.1 Összes fenoloskomponens-tartalom meghatározás

Az összes fenolos komponensek meghatározását Folin–Ciocâlțu-módszer szerint spektrofotometriásan határoztuk meg (Singleton & Rossi, 1965). A meghatározás alapja, hogy a foszfomolibdén savban levő sárga színű Mo(VI) ionok az antioxidánsok hatására kék színű

Mo(V)-té redukálódnak. A szárított porított mintákból metanolos vizes kivonatokat készítettünk, 20 mg szilárd mintához 1,5 ml 70 (V/V) %-os metanolt adtunk, és 30 percre ultrahangos vízfürdőbe helyeztük. Az így készített kivonatokat centrifugálással ülepítettük és a felülúszót, kivonatot használtuk a mérések során.

A reakcióelegyet félkémcsőben állítottuk össze, melyhez 1250 µl Folin–Ciocalteu reagenst (törzsoldatból 10-szeresére hígított), 200 µl 70 (V/V) %-os metanolt, 50 µl kivonatot és 1000 µl Na₂CO₃ oldatot (15 (m/V)%) használtunk. Az oldatok összemérését követően 5 percre 50 °C fokos vízfürdőbe helyeztük a kémcsöveket. A minták abszorbanciáját 760 nm-en mértük spektrofotométerrel. A módszerhez galluszsav-standardot használtunk és az eredményeket galluszsavegyenértékben (GAE) állapítottuk meg. A minták összes fenolos komponenstartalmát mg GAE/g szárazanyagra vonatkoztatott mértékegységben értékeltük.

4.10.2 Fitonutriensek kvalitatív és kvantitatív meghatározása

A fitonutriens-komponensek vizsgálatához vizes, metanolos kivonatokat készítettünk (víz:metanol=30:70) a lifolizált, porított mintákból és a folyadék barnalevekből. 1 g mintát 100 ml metanolos vízben extraháltunk, a keveréket 150 fordulat/perc fordulattal orbitális rázóasztalon kevertettük sötétben, 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A kivonatokat fecskendőszűrővel (PTFE, 0,22 µm) leszűrtük és -20 °C fokon tároltuk a mérésekig.

A vizsgálatokat UHPLC-ESI-MS analitikai rendszeren végeztük. A kromatográfiás elválasztáshoz egy Dionex Ultimate 3000RS UHPLC-t (Thermo Fisher Scientific Ltd., USA) használtunk, Thermo Accucore C18 analitikai oszloppal (2,1 mm × 100 mm, 2,6 µm részecskeméret). Az elválasztás során gradiens elúciót végeztünk metanol és víz eluensekkel, 0,2 ml/perc áramlási sebesség mellett. A kromatográfiás rendszer egy *electrospray* ionizációval ellátott *Thermo Q Exactive Orbitrap* hibrid tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific Ltd., USA) volt összekapcsolva. Az ismeretlen minták extraktumait pozitív és negatív ionizációs üzemmódban elemeztük. A retenciós idő és fragmentációs mintázat alapján Thermo Trace Finder 2.1 szoftver segítségével elemeztük és azonosítottuk a komponenseket. A találatok megerősítése érdekében az eredményeket saját gyűjtésű és online adatbázisokkal is összevetettük. A mennyiségi meghatározásokhoz külső kalibrációt végeztünk. A kromatogramokat manuálisan a Thermo Xcalibur 4.0 szoftver segítségével értékeltük ki.

A kvantitatív meghatározásokhoz apigenin (≥ 95,0%), apigenin-7-O-glükuronid (elsődleges referencia standard), luteolin (≥ 98%), kvercetin (≥ 95,0%), izokvercitrin (analitikai standard), naringenin (≥ 95,0%), likviritigenin (≥ 97%), medikagénsav (*Phyproof* referenciaanyag)

vegyületeket szereztünk be a kvalitatív elválasztás eredményeinek ismeretében. Minden standardot a Sigma-Aldrich (Darmstadt, Németország) cégtől szereztünk be.

4.11 Statisztikai értékelés és ábravizualizáció

Az adatelemzést a Microsoft Excel 2016 és az IBM SPSS 25.0 szoftverekkel (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) végeztem. Kéttényezős varianciaanalízissel vizsgáltam a szelénkezelések és a betakarítások közötti különbségeket. Az átlagok vizsgálata post-hoc teszttel (Tukey-teszt) történt, a szignifikáns különbségeket a $p < 0,05$ szinten fogadtam el. Az adatokat átlag $\pm$ szórás formájában ábrázoltam. Diagramok és táblázatok szerkesztéséhez Microsoft 365 Excel szoftvert használtam. A Sankey-diagramok (energiafolyam-diagram) szerkesztéséhez nyitott forráskódú, online SankeyMATIC programot (készítő: Steve Bogart) használtam.

5. EREDMÉNYEK

A különböző mérések kiértékelésében először mindig a tenyészedenyes kísérlet eredményeit mutatom be, ezt követően pedig a szabadföldi kísérlet eredményeit ismertetem.

5.1 Szeléndúsított tenyészedenyes lucernanövények jellemzése

A 2018-ban végzett tenyészedenyes lucerna kísérletben a szelénkezelést követően 4 alkalommal takarítottuk be, a friss zöld biomasszákat és zöld frakcionálással feldolgoztuk. Az első betakarítás június elején történt, zöldbimbós-állapotban. A további betakarítások pedig 4 hetente, az újrachajtás ütemének függvényében végeztük. Mind a 4 betakarítás alkalmával morfológiai és mennyiségi méréseket is végeztünk a betakarított hajtásokon.

A kontroll, kezelést nem kapott növények átlagosan 510 ± 111 g friss biomasszákat teremtek a négy betakarítás során. A legtöbb biomasszákat mindig a kontroll tenyészedenyekből tudtuk begyűjteni. A legkevesebb, 196 ± 19 g zöld biomassza az 50Se(IV) kezelt növényekből származott a 4 betakarítás során. A betakarításokat összehasonlítva, a legkevesebb biomassza, 299 ± 69 g az első mintavételkor, a legtöbb, 445 ± 140 g a harmadik mintavételkor volt betakarítható. A 10Se(IV), 10, 50(SeVI); 10, 50 Se₀ kezelések biomasszája fele, kétharmada a kontroll növényeknek.

Szelenátforma esetében az 50 mg/kg Se annyira toxikus volt, hogy a növények a kezelést követő néhány napon belül elpusztultak. A 10 mg/kg Se(VI) is negatívan befolyásolta a növények fejlődését. Az 1. és 2. betakarítás alkalmával szignifikánsan alacsonyabb hajtáshosszt ($29,8 \pm 3,5$ és $29,8 \pm 5,0$ cm) mértünk. A 3. és 4. betakarításkor viszont már kevésbé érvényesült a 10 mg/kg Se(VI) kezelés negatív hatása a hajtáshosszra (5. táblázat). A csökkenő szelénakkumulációjával együtt a negyedik betakarításra a hajtáshossz átlaga nem különbözött szignifikánsan ($39,5 \pm 6,1^{abc}$). Az 1 mg/kg Se(VI)-kezelés serkentő hatását tapasztaltuk, a kontrollhoz hasonló, vagy annál szignifikánsan nagyobb növekedést értek el a regenerálódó hajtások a négy betakarítást figyelembe véve (5. táblázat).

A kezeléseket figyelmen kívül hagyva, a betakarítások átlagát tekintve, az első betakarítás alkalmával mértük a legrövidebb hajtáshossz értékeket (átlagosan 35,5 cm), ezt követően pedig növekedett a hajtások hossza, a harmadik betakarításnál 48,2 cm-es magasságot értek el a növények.

A kijuttatott koncentráció függvényében az exogén szelénkezelés szignifikáns hatást gyakorolt a lucernanövények hajtáshosszára, ahogy ezt korábbi tanulmányok alkalmával is megfigyelték (Mikkeisen *et al.*, 1987; Motesharezadeh *et al.*, 2020).

5. táblázat: A tenyészedényes kísérletben mért hajtások hossza (cm) és száraz tömege (g növény⁻¹) a különböző koncentrációjú szelénformákkal való kezelés után, a négy vizsgált betakarításból, az adatok átlagértékek (átlag± szórás (n= 10). Oszlopokon belül, betakarításonként a különböző betűkkel jelölt átlagok között szignifikáns különbség mutatható ki ($p \leq 0,05$). (Kovács *et al.*, 2021a)

Betakarítás	Hajtáshossz (cm)			
	1.	2.	3.	4.
Kontroll	38,9±4,8 ^a	32,2±3,2 ^{cd}	41,4±5,2 ^b	45,9±6,4 ^a
1Se(VI)	39,0±7,0 ^a	47,6±5,5 ^a	51,5±9,4 ^{ab}	44,5±5,3 ^{ab}
10Se(VI)	29,8±3,5 ^b	29,8±5,0 ^d	45,8±5,2 ^b	39,5±6,1 ^{abc}
1Se(IV)	34,9±5,4 ^{ab}	40,3±5,9 ^{ab}	48,6±4,5 ^{ab}	39,5±4,9 ^{abc}
10Se(IV)	38,7±6,0 ^a	40,1±4,4 ^b	58,4±7,2 ^a	41,5±4,9 ^{abc}
50Se(IV)	33,1±4,1 ^{ab}	35,5±7,1 ^{bcd}	48,1±5,7 ^{ab}	35,4±3,9 ^c
10Se(0)	34,2±2,9 ^{ab}	37,6±5,2 ^{bc}	50,1±8,9 ^{ab}	36,6±4,4 ^{bc}
50Se(0)	35,2±4,1 ^{ab}	40,9±5,3 ^{ab}	41,3±5,3 ^b	39,0±9,6 ^{abc}
Betakarítás	Hajtás száraz tömeg (g növény ⁻¹)			
	1.	2.	3.	4.
Kontroll	0,66±0,26 ^a	0,35±0,10 ^b	0,90±0,46 ^{ab}	0,74±0,22 ^a
1Se(VI)	0,40±0,17 ^{ab}	1,05±0,46 ^a	0,88±0,30 ^{ab}	0,65±0,24 ^{ab}
10Se(VI)	0,27±0,11 ^b	0,38±0,13 ^b	0,65±0,25 ^b	0,40±0,09 ^{bc}
1Se(IV)	0,55±0,25 ^{ab}	0,68±0,36 ^b	0,98±0,31 ^{ab}	0,61±0,19 ^{ab}
10Se(IV)	0,61±0,31 ^a	0,59±0,23 ^b	1,26±0,50 ^a	0,49±0,15 ^{abc}
50Se(IV)	0,39±0,16 ^{ab}	0,38±0,21 ^b	0,69±0,29 ^b	0,27±0,10 ^c
10Se(0)	0,45±0,14 ^{ab}	0,44±0,18 ^b	0,73±0,27 ^b	0,44±0,17 ^{bc}
50Se(0)	0,49±0,25 ^{ab}	0,60±0,21 ^b	0,77±0,30 ^b	0,57±0,24 ^{ab}

A szelenit (Se(IV)) esetében viszont a 10 mg/kg koncentrációjú kezelés esetén magasabbak voltak a növények, mint az 1 és 50 mg/kg koncentrációknál. Bai és munkatársai (2019) tenyészedényes kísérletük alapján megállapították, hogy a 10 mg/kg koncentrációjú talajkezelés szelenit formával optimális, és nem csökkenti a vizsgált lucerna fajta hozamát. A talajból felvett szelenát viszont már 25-30 mg/kg-ban a hajtásokba épülve 10 %-os hozamkiesést eredményezett (Mikkelsen *et al.*, 1989).

Mindhárom alkalmazott szelénformát összehasonlítva, a 4 betakarítás átlagában az 1 mg/kg Se(VI), 10 mg/kg Se(IV) és 50 mg/kg Se(0) kezelések esetén mértük a leghosszabb hajtásokat. A betakarításokat egymással összehasonlítva a 3. és 4. betakarításkor találtuk a legnagyobb hajtáshosszt, a legrövidebb hajtásokat pedig az első betakarítás alkalmával. A szelénfelvétel dinamikája figyelhető meg a betakarításokat egymás után vizsgálva, kimondottan a nagy koncentrációjú kezeléseknél. Azonban ennek a tendenciának a magyarázatára nem csak a szelénkezelés szolgálhat, mivel első éves, magvetésből származó növényekkel végeztük a kísérletet, és az évelő lucerna növények áttelelő, masszív gyökérzete a szezon végére alakult ki. A szántóföldi termesztés során a második évtől éri el a tavaszi vetésű lucerna a maximális biomassa mennyiséget (*Késmárki, 2007*).

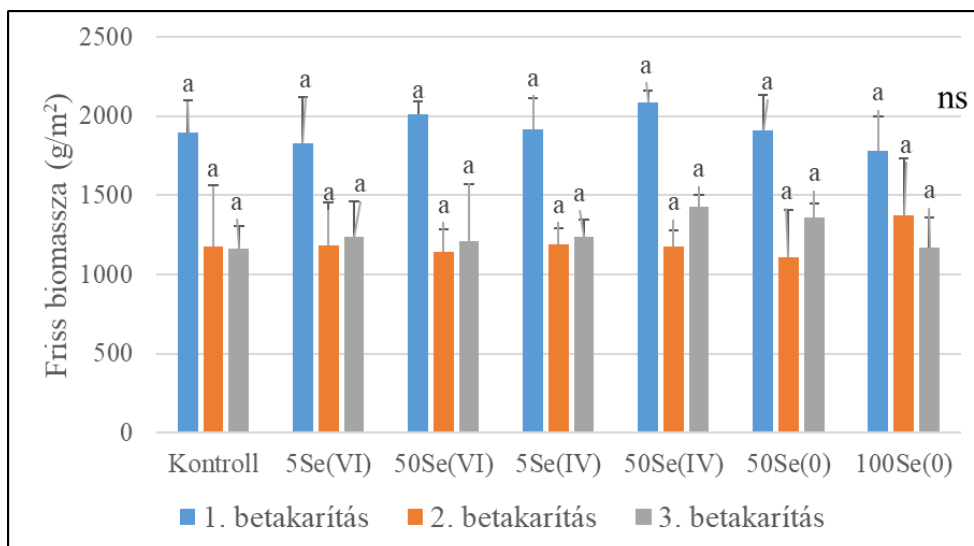
Az ízközök száma az első két betakarítás alkalmával 7 és 8 között változott átlagosan. A legkevesebb, 6 ízközt a második betakarítás 50Se(IV) kezelt növényeken találtunk. A harmadik és negyedik betakarításkor az ízközök száma átlagosan 9 és 10 volt. A negyedik betakarításkor elért leghosszabb hajtáshossz értékek mellett a növények nem rendelkeztek több ízközzel. A friss hajtások szárazanyagtartalma 20,8 – 33,9 (m/m)% tartományban változott a betakarítások során, összefüggésben a szelénkezelés stresszhatása alatt álló növény fiziológiai állapotával, ahogy ezt több korábbi tanulmány is megállapította (*Mikkeisen et al., 1987; Bai et al., 2019; Motesharezadeh et al., 2020*). A hajtás száraz tömeg mérések során hasonló tendenciákat találtunk, mint a hajtáshossz eredmények esetében. A nagy koncentrációjú kezelések, 10 mg/kg Se(VI), 50 mg/kg Se(IV) eredményezték a legkisebb száraz tömeg értékeket. A kontroll növények csak az első betakarítás alkalmával mutattak nagyobb száraz tömeget, mint az alacsony koncentrációjú (1 mg/kg és 10 mg/kg) szelénrel kezelték. Az 1 mg/kg Se(VI), 10 mg/kg Se(IV) és 10 mg/kg vörös elemi szelén Se(0) esetén a hajtások relatív száraz tömege többnek mutatkozott. Például a 2. betakarításkor a hajtás száraz tömeg 1,05 g növény⁻¹ volt az 1Se(VI) kezelés esetén, és 0,4 g növény⁻¹-re csökkent, amikor a Se(VI) koncentráció 10 mg/kg-ra nőtt (5. táblázat). Hasonlóképpen, a 10Se(IV) kevésbé volt hatással a hajtások száraz tömegére, mint az 50 mg/kg koncentráció, 10Se(IV) esetében 0,61±31^a, 50Se(IV) alkalmazásakor pedig 0,39±0,16^{ab} g növény⁻¹. A Se két ionos formájával (Se(VI) és Se(IV)) ellentétben a vörös elemi szelén (Se(0)) ellentétes hatást gyakorolt a hajtás száraz tömegére, mivel 50 mg/kg kezelésnél nagyobb száraz tömegeket kaptunk, mint 10 mg/kg-nál, jellemzően 0,1-0,7 %-kal. A betakarítások közül a 3. betakarítás mutatta a legnagyobb hajtás száraz tömeget, amelyet a 2. betakarítás követett (5. táblázat).

Bai és munkatársai (2019) talajkezeléssel végzett lucernakísérletükben 20, 50 és 100 mg/kg koncentrációban alkalmazott szelenit esetében statisztikailag kimutathatóan csökkent a növények szárazanyag-tartalma, viszont kis mennyiségben (1 mg/kg) kijuttatva enyhén növekedett a hajtások szárazanyag-tartalma.

5.2 Szabadföldi lucernakísérlet betakarítható biomassza eredményei

Kisparcellás szabadföldi szeléndúsítás kísérletben a három vizsgált szelénformát két eltérő koncentrációban vizsgáltuk, vagyis a szelenitet 5 és 50 g/m² a szelenátot szintén 5 és 50 g/m² a vörös elemi szelént pedig 50 és 100 mg/m²-ben alkalmaztuk. Az egy négyzetméterről betakarítható friss biomassza mennyiségét a 15. ábra szemlélteti. A kezelések utáni első betakarítás alkalmával takarítottuk be a legtöbb biomasszát, a betakarítás átlaga 1,9 kg/m² volt. Ezt követően a második 1,2 kg/m²; a harmadik 1,3 kg/m² betakarítható friss lucerna biomasszát eredményezett.

A szelénkezeléseket betakarításon belül vizsgálva, átlagosan az alacsony koncentrációjú szelenit és szelenát (5Se(IV) és 5Se(VI)) kezelés a kontroll lucernához hasonló biomassza eredményeket ért el, mind a három vizsgált betakarítás alkalmával. Nagyobb koncentrációban (50 mg/m²) azonban a kezelt növényeknél a kontrollnál több friss biomasszát lehetett betakarítani négyzetméterenként mindkét ionos forma esetében. Ez a pozitív különbség az első betakarítás alkalmával bizonyult a legnagyobbnak, a kontroll érték 1899 g/m², az 50Se(IV) 2015 g/m², az 50Se(VI) pedig 2086 g/m². A vörös elemi szelénkezelés (Se(0)) esetében 100 mg/m² csökkentette a betakarítható biomassza mennyiségét az első betakarítás alkalmával, 1,78 kg/m² értékkel a legalacsonyabb a betakarításon belül. A következő 2 betakarítás alkalmával a kontrollhoz hasonló, a szórásokat figyelembe véve, érdemben nem különböző értékeket mutatott (1,1-1,3 kg/m²).

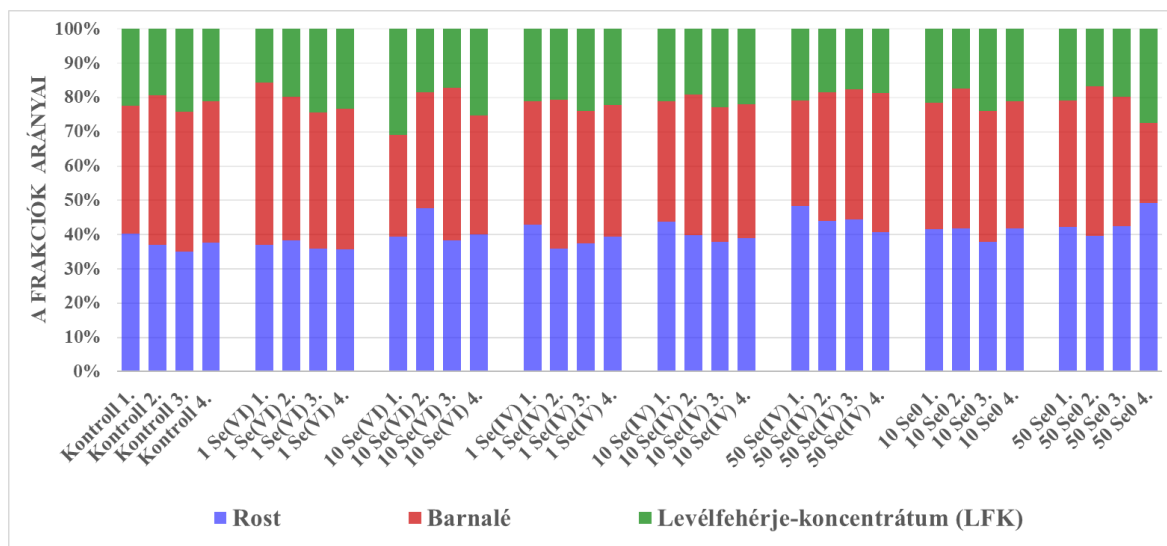


15. ábra: Parcellákról betakarítható friss zöld biomassza mennyisége g/m²-ben kifejezve, három egymást követő betakarítás alkalmával. Átlagértékek (n=3), a kezelések között nincs kimutatható szignifikáns különbség a betakarításon belül (ns= nem szignifikáns).

5.3 Szelénkezelt-lucernafrakcionálás eredményei

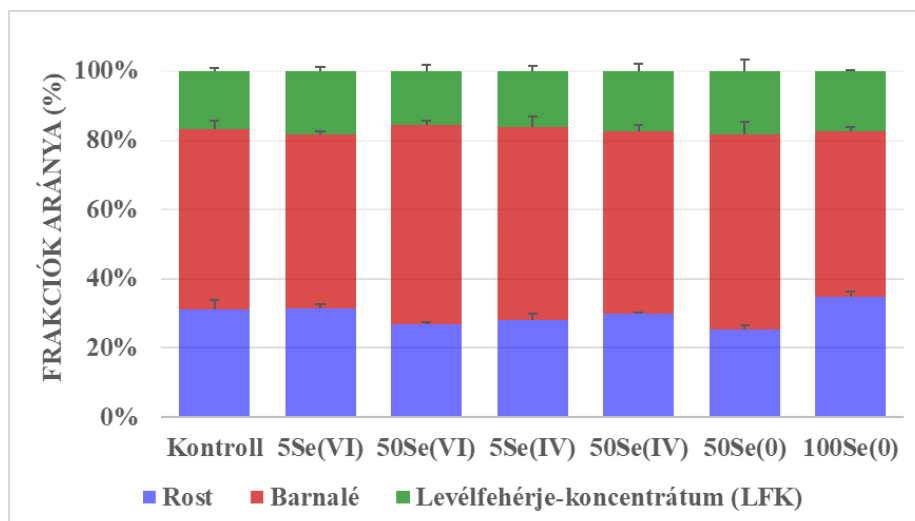
A zöld frakcionálás kulcsfontosságú lépése a zöld biofinomítók rentábilis működésének. A feldolgozás során kapott frakciók felhasználását szem előtt tartva szükséges megválasztani, fejleszteni az eszközöket. Állattenyésztési ágazatot is működtető, decentralizált mezőgazdasági vállalkozást figyelembe véve a nedves frakcionálás során kapott rostot szárítva, közvetlenül hasznosítják takarmány rostkiegészítésre. Ez esetben az egycsigás prés kielégítő, mert ugyan kevesebb zöldlékihozatalra képes, de magasabb fehérjetartalmú rost kapható. Laboratóriumi körülmények között mi ikeresigás présgépet használtunk mind a tenyészedényes, mind a kisparcellás kísérletből származó lucerna frakcionálására.

A tenyészedényes lucerna esetében a több koncentrációban és formában végzett szelénkezelés nem befolyásolta a rost- és zöldléfrakciók kihozatali arányát. A továbbiakban a zöldlében lévő fehérjék mikrohullámú koagulálását követően elválasztott LFK- és barnalé-frakciók aránya sem változott tendenciózusan a szelénkezelések hatására (16. ábra). Átlagosan 40±3,6% rost, 38±4,7% barnalé és 20±3,2% LFK kihozatalt értünk el a 4 vizsgált betakarításban (16. ábra). Ezek az arányok összhangban vannak korábban, több ismétlésben végzett frakcionálási adatokkal (Domokos-Szabolcsy et al., 2020; Kaszás et al., 2020a; Kaszás et al., 2020b; Hansen et al., 2022).



16. ábra: Tenyészedényes szeléndúsítás kísérletből származó zöld lucerna frakcióinak megoszlása a 4 vizsgált betakarítás során (Kovács *et al.*, 2021a).

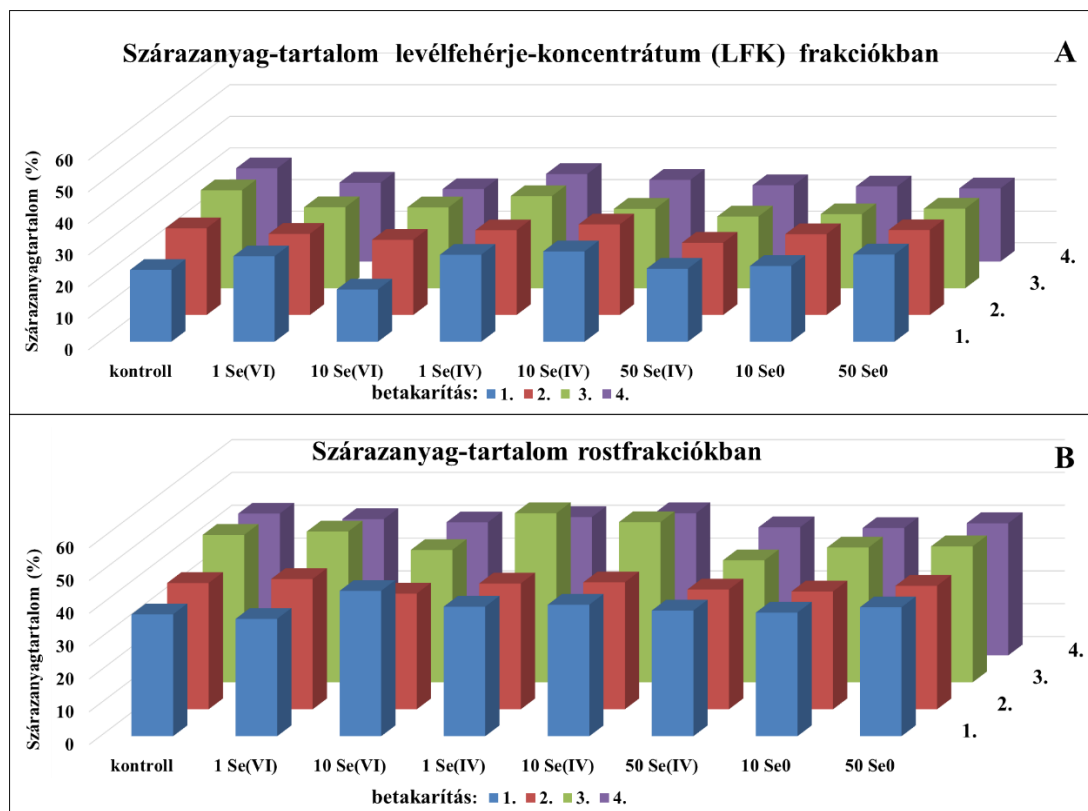
A szabadföldi, kisparcellás kísérletből származó lucernafrakciók egymáshoz viszonyított arányát a 17. ábra szemlélteti. Nem tudtunk összefüggést kimutatni a szelénkezelés és a frakciók mennyisége között, még a nagy koncentrációjú kezelések (50, 100 mg/m²) esetében sem. A kapott eredmények azonban összhangban vannak korábbi, jelen munkán kívüli, szabadföldi lucerna-fajtaösszehasonlító kísérlet feldolgozási adataival (Kovács *et al.*, 2022), vagyis a présrost 30 %-ban, az LFK 17%, a barnalé pedig 50 %-ban keletkezik a folyamat végére. A tenyészedényes kísérletben azonban a présrost 40%-os részt ért el, szemben a szabadföldi kísérletben tapasztalt 30%-kal. Akkumulált veszteségnek tekintjük a kevesebb, mint 1%-os hiányt, mely a szakaszos feldolgozás következtében adódott, a különböző dózisú kezelések feldolgozása között szétszereltük és megtisztítottuk az ikercsigás présgépet, melyben valamennyi minta mindig visszamaradt az előző feldolgozásból.



17. ábra: Szabadföldi lucerna kísérletből származó frakciók százalékos megoszlása a szelénkezelést követő első betakarításakor (Debrecen, 2019 július 1.).

5.4 Szárazanyagtartalom-eredmények a tenyészedényes lucernakísérletben

Tenyészedényes kísérletben nevelt lucernából előállított LFK szárazanyag-tartalma a négy betakarítás során 16,5-31% között változott, átlagosan 25,4% volt. Az 1Se(IV) és 50Se(0) kezelések esetében a kontrollhoz hasonló szárazanyag-tartalmat mértünk (18. ábra). Az ionos Se-formák koncentrációjának növelése azonban jelentősen csökkentette az LFK szárazanyag-tartalmát, arányokat tekintve a 10Se(VI) kezelés LFK szárazanyag-tartalma 80%-a volt a kontrollnak, az 50Se(IV) pedig 83%-a. Ezt a megfigyelést erősítik a nyersfehérje-tartalom eredmények is. Mivel az LFK-t a növényi citoplazmafehérjék és a szárazanyag heterodiszperz rendszerének tekintjük (a vízben oldott egyszerű cukrok és vegyületeken kívül) a legnagyobb szeléndózisú kezeléseknél csökkent a legnagyobb mértékben a szárazanyag-tartalom. Az arányokat tekintve a nyersfehérje-tartalom a 10 Se(VI) kezelt LFK esetében a kontroll érték 79%-a, 50 Se(IV) esetében pedig 82%-a.



18. ábra: Az LFK- és rostfrakciók szárazanyag-tartalom eredményei (%) a tenyészedényes kísérletben nevelt lucerna növényekből (Kovács et al., 2021a).

A rost szárazanyag-tartalma 35,2-51,5 % közötti a kezelt és a kontroll lucernafrakcióban (18. ábra). A szelénkezeléstől függetlenül a 3. betakarításkor a kezelések (kivéve a 10Se(VI) és az 50Se(IV)) rostfrakciójában az átlagnál nagyobb szárazanyag-tartalmat mértünk. Ez összefüggésben áll a 3. betakarításkor kapott legnagyobb biomasszahozamokkal (átlagosan 445 ± 140 g friss betakarított hajtás). Az összefüggés az idősebb koronarügyek hatékonyabb biomassza-termelésével magyarázható.

5.5 Szárazanyag-tartalom-eredmények a szabadföldi lucernakísérletben

A szabadföldi kísérlet során a rost- és LFK-minták esetében is kisebb az értékek terjedelme a tenyészedényes kísérlethez viszonyítva, mely az alacsonyabb dózisú szelén kezelések hatásának tudható be. A rost 41-50% szárazanyag-tartalommal rendelkezett, az LFK pedig 23-27% volt. A szelénkezeléseknek nincs egyértelmű negatív hatása a rost és LFK szárazanyag-tartalmára a szabadföldi körülmények között. A betakarításokat egymással összevetve az első mintavételkor átlagosan nagyobb volt a lucernarost és LFK szárazanyag-tartalma, mint a következő 2 betakarítás alkalmával (6. táblázat).

6. táblázat: Szárazanyag-tartalom eredmények a szabadföldi lucerna kísérletből, szárazanyag-százalékban kifejezve (sza %), a kezelések és a három vizsgált betakarítás átlaga (n=3).

LFK	Betakarítás		
	1.	2.	3.
Kontroll	26,1±1,0	25,0±1,0	25,2±0,4
5Se(VI)	26,1±2,6	25,3±0,6	24,8±0,6
50Se(VI)	26,4±2,8	23,6±0,9	25,1±0,5
5Se(IV)	26,3±0,9	24,4±0,4	26,5±1,3
50Se(IV)	27,2±0,4	25,5±1,8	24,0±2,1
50Se(0)	24,4±1,3	25,1±1,2	23,0±2,5
100Se(0)	27,3±1,0	24,8±2,0	25,5±1,6
rost			
Kontroll	48,3±0,5	42,3±1,7	42,4±0,4
5Se(VI)	48,7±1,7	41,1±1,2	42,5±4,5
50Se(VI)	47,8±1,5	42,6±0,5	42,4±1,2
5Se(IV)	48,6±0,6	42,3±0,7	41,9±1,5
50Se(IV)	49,2±0,6	42,1±1,1	41,0±0,6
50Se(0)	47,9±0,8	41,5±1,5	42,3±1,9
100Se(0)	50,5±0,4	42,3±1,1	41,8±0,8

Minden esetben, a kontrollnál is az első betakarítás adta a legnagyobb szárazanyag-tartalmat, ami a későbbiekben csökkenést mutatott. A 2. és 3. betakarításkor közel azonos eredményeket kaptunk.

5.6 Lucernaeredetű frakciók pH-és Brix-értékei

A pH-érték a zöldlé esetében 6, barnalében pedig 5,8 volt átlagosan, a tenyészedényes kísérletben. Az átlagértékek alacsony szórásai (7. táblázat) arra engednek következtetni, hogy a köztestermék, zöldlé és a barnalé pH-jára nem gyakorolt hatást sem a szelénkezelés, sem a betakarítás ideje.

A lucerna zöldlé, mint köztestermék és a lucerna-barnalé vízben oldható szárazanyag-tartalmát Brix-fokban (°Bx) határoztuk meg. A zöldlé Brix-értéke minden kezelésnél következetesen magasabb volt, átlagosan 12,2±1,4 °Bx, mint a barnalének, amelynek átlaga 10,8±1,5 °Bx volt. A két frakció vízben oldódó szárazanyag-tartalma azonban erősen átfed, a zöldlé 10-14,8 °Bx, a barnalé 8-14,6 °Bx között változott. Ezeknek a folyadékoknak a vízzoldható szárazanyag-tartalmára és pH-értékére a feldolgozott növényfaj gyakorol nagyobb hatást (*Kaszás et al.*, 2020a; *Domokos-Szabolcsy et al.*, 2022).

7. táblázat: Tenyészedényes kísérletből származó zöldlé- és barnalé-minták pH- és Brix-értékei a négy betakarítás átlagában (átlag± szórás, n=4).

	pH-érték		Brix-érték (°Bx)	
	zöldlé	barnalé	zöldlé	barnalé
Kontroll	5,9±0,02	5,9±0,4	12,3±1,54	10,8±1,28
1Se(VI)	5,9±0,05	5,7±0,07	11,3±0,85	9,9±1,20
10Se(VI)	6,0±0,04	5,7±0,05	11,4±1,52	10,6±1,88
1Se(IV)	6,0±0,06	5,8±0,09	12,7±1,44	11,1±1,40
10Se(IV)	6,0±0,10	5,7±0,09	13,4±0,96	11,6±1,33
50Se(IV)	6,0±0,04	5,7±0,13	11,4±1,21	9,9±1,54
10Se(0)	6,0±0,01	5,8±0,05	11,8±1,06	10,1±0,71
50Se(0)	6,0±0,04	5,8±0,07	13,1±1,89	12,1±1,75

A szabadföldi kísérletből származó zöldlé és barnalé pH- illetve Brix-értékeit a 8. táblázat tartalmazza. A szelénkezelések és betakarítási időpontok tekintetében itt sem találtunk következetes különbségeket. A tenyészedényes kísérletben mért értékekhez hasonlítva a pH-értékek a zöldlé esetében nem térnek el, átlagosan pH= 5,9 értéket kaptunk. A barnalevek esetében viszont 3-4 tizeddel kisebb, pH=5,5 volt a mért adat.

A Brix-fok vizsgálatok kisebb értékeket kaptunk a szabadföldi kísérletben, mint a tenyészedényes során. Megfigyeléseink szerint a vízzeloldható szárazanyag-tartalom értékekre az alkalmazott feldolgozástechnológia gyakorol hatást, az eltérés magyarázatára szolgálhat, hogy a tenyészedényes kísérletben 500-600 g friss növényt tudtunk feldolgozni, összehasonlítva a szabadföldi termesztéssel, ahol háromszor 1 kg zöld biomasszát frakcionáltunk. Ezek a különbségek eltéréseket okoztak a préselés és szűrési eljárások során.

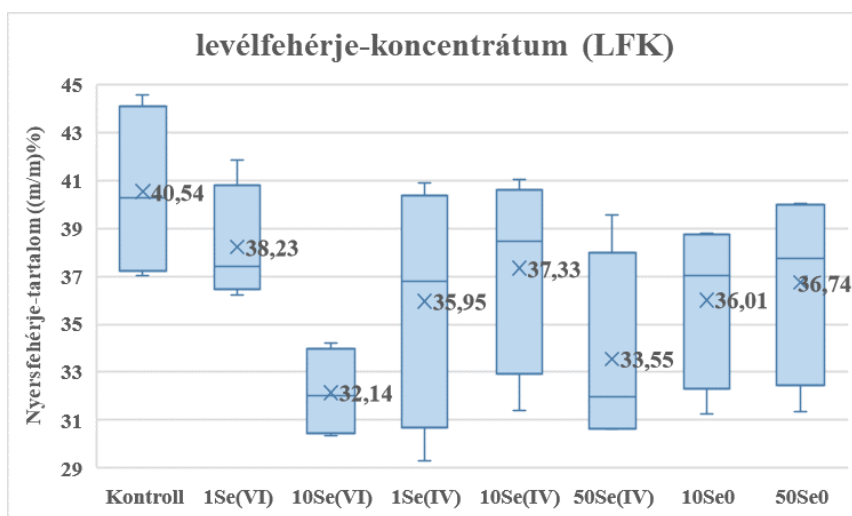
8. táblázat: Szabadföldi lucerna kísérletből származó zöldlé- és barnalé-minták pH-, és Brix-értékei, a három egymást követő betakarítás átlagában (átlagos értékek± szórás, n=9).

	pH-érték		Brix-érték (°Bx)	
	zöldlé	barnalé	zöldlé	barnalé
Kontroll	5,9±0,05	5,5±0,06	10,4±1,20	8,0±0,44
5Se(VI)	5,9±0,08	5,5±0,11	10,6±1,58	8,0±0,80
50Se(VI)	5,9±0,08	5,5±0,08	9,2±0,72	7,6±0,55
5Se(IV)	5,9±0,08	5,5±0,02	9,4±0,93	7,6±0,37
50Se(IV)	5,9±0,09	5,5±0,08	9,0±1,22	7,5±0,94
50Se(0)	5,9±0,10	5,5±0,08	8,9±1,02	7,2±0,87
100Se(0)	5,9±0,11	5,5±0,08	10,4±1,24	7,8±1,25

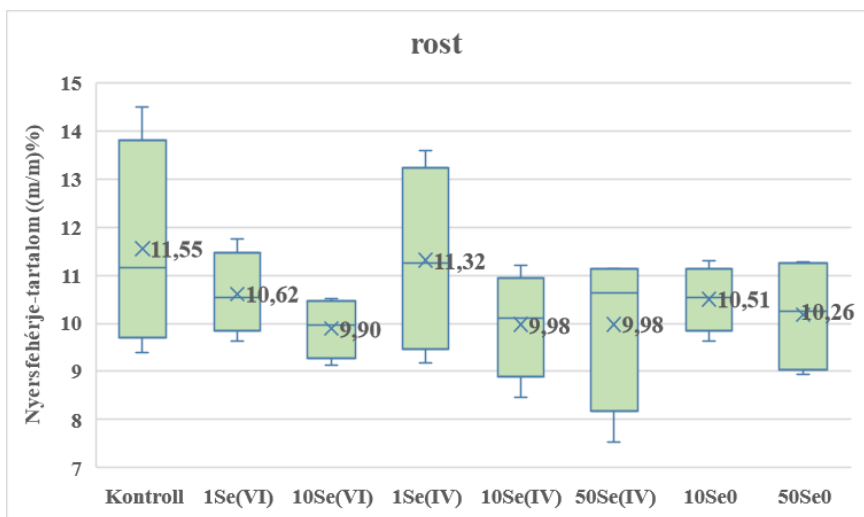
5.7 Nyersfehérje-tartalom és aminosav-összetétel szeléndúsított lucernafrakciókban

5.7.1 Nyersfehérje-tartalom eredmények a tenyészedényes kísérletből

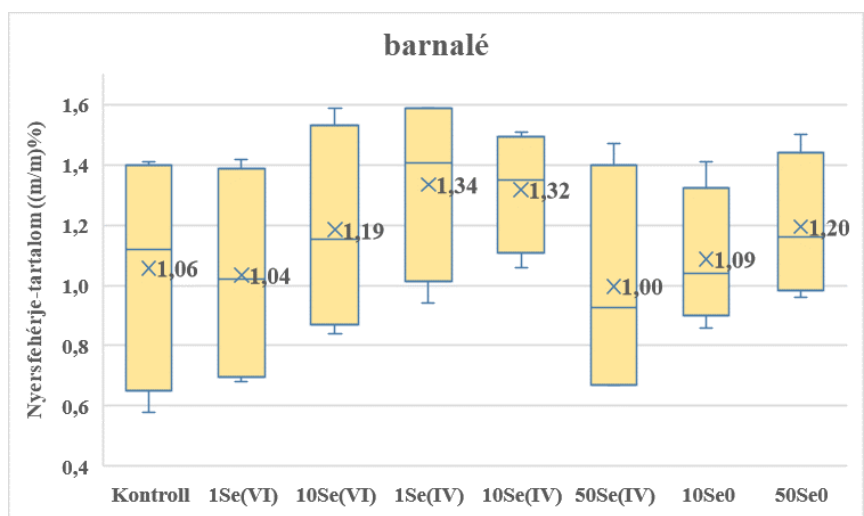
A Kjeldhal-szerinti nyersfehérje-tartalom eredmények szignifikánsan eltértek a szelénkezelés, betakarítás és vizsgált lucernafrakció függvényében a tenyészedényes kísérlet során. A feldolgozott három frakciót jellemezve, a levélfehérje-koncentrátum (LFK) frakciók nyersfehérje-tartalma volt a legnagyobb ($36,3 \pm 4,1$ m/m%), ezt követték a rostfrakciók ($10,5 \pm 1,4$ m/m%) és a barnalé ($1,1 \pm 0,3$ m/m%), figyelembe véve a négy betakarítás összesített értékeit (19., 20., 21. ábra).



19. ábra: Tenyészedényes lucernakísérletből származó LFK-minták nyersfehérje-tartalma, a négy betakarítás dobozdiagramon ábrázolva. A dobozok az értékek interkvartilis terjedelmét szemléltetik, a vonal a medián, az 'x' és az ábrán szereplő szám az átlagértéket jelzi. A felső és alsó bajusz végpontja a maximum és minimum értékeket mutatja. Az értékek 29-45 %-ig terjedő skálán szerepelnek.



20. ábra: Tenyészedényes lucernakísérletből származó rostminták nyersfehérje-tartalma, a négy betakarítás dobozdiagramon ábrázolva. A dobozok az értékek interkvartilis terjedelmét szemléltetik, a vonal a medián, az 'x' és az ábrán szereplő szám az átlagértéket jelzi. A felső és alsó bajusz végpontja a maximum és minimum értékeket mutatja. Az értékek 7-15 %-ig terjedő skálán szerepelnek.



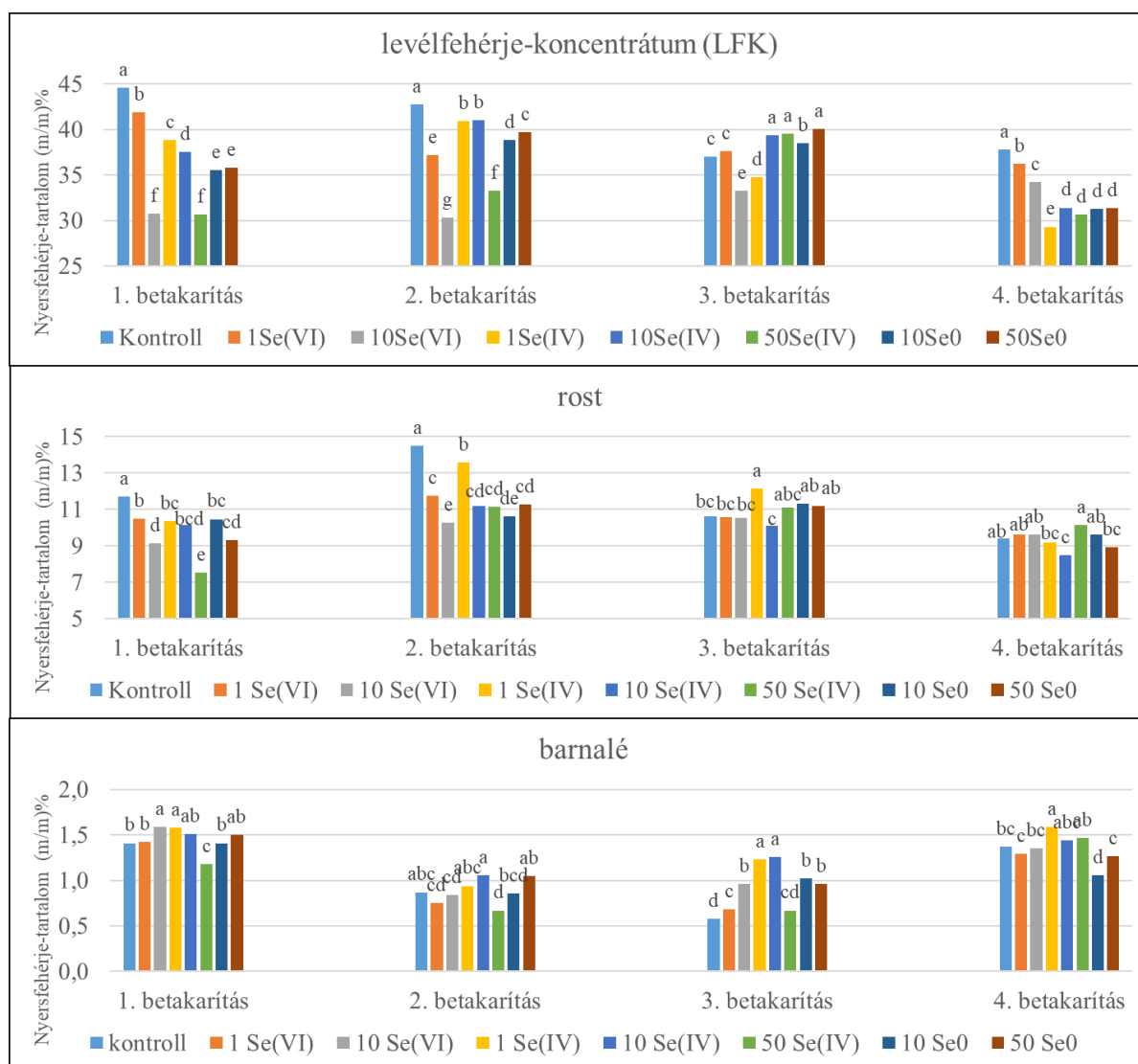
21. ábra: Tenyészedényes lucernakísérletből származó barnalé-minták nyersfehérje-tartalma, a négy betakarítás dobozdiagramon ábrázolva. A dobozok az értékek interkvartilis terjedelmét szemléltetik, a vonal a medián, az 'x' és az ábrán szereplő szám az átlagértéket jelzi. A felső és alsó bajusz végpontja a maximum és minimum értékeket mutatja. Az értékek 0,4-1,6 %-ig terjedő skálán szerepelnek.

A levélfehérje-koncentrátum (LFK) nyersfehérje-tartalma 29-45 (m/m)% között változott (19. ábra). Betakarításonként összehasonlítva a legalacsonyabb értékeket a 4. betakarításkor (2018. augusztus 30.) mértük, a betakarítás átlaga $32,8 \pm 3\%$, a legtöbb nyersfehérje a 2. betakarítás

alkalmával volt mérhető majdnem minden kezelésnél (átlagosan $38 \pm 4,2\%$). A kezelések tekintetében amint a 19. ábrán látható, a harmadik betakarítás kivételével a legnagyobb nyersfehérje-tartalmat a kontroll LFK-ban mértük. Az ionos formák, vagyis a 10Se(VI) és 50Se(IV) magas koncentrációi az LFK nyersfehérje-tartalmának csökkenését okozták, mely a toxikus szelénszint egyik jellemzője (Kolbert *et al.*, 2019). Mindazonáltal a 3. és 4. betakarítás során ezek a kezelések nagyobb nyersfehérje-tartalmat mutattak az LFK-ban, mint az 1. és 2. betakarítás során. Kis koncentrációban viszont az ionos formák nem befolyásolták az LFK nyersfehérje-tartalmát figyelembe véve az 1., 2. és 3. betakarításokat.

A préselt rost fehérjetartalma hasonló tendenciát mutatott, mint az LFK. A legkisebb értékek a negyedik betakarításkor 8,47 és 10,16 (m/m)% voltak (20. ábra). A kontroll kezelés (0Se) mutatta a legnagyobb nyersfehérje-tartalmat az első két betakarítás során. A legnagyobb nyersfehérje-tartalmat a 3. és 4. betakarítás során a 10Se(IV) és az 50Se0 kezeléseknél mértük. A Se(VI) és a Se(IV) kezelések koncentrációjának növelése csökkentette a rost nyersfehérje-tartalmát a négy betakarításon belül. A vörös elemi szelén kezelés (Se0) nagy koncentrációban (50mg/kg) csökkentette a rost fehérjetartalmát. Azonban az elemi szelén kezelés mellett az 1-3. betakarítás között a rost fehérjetartalma növekvő tendenciát mutatott.

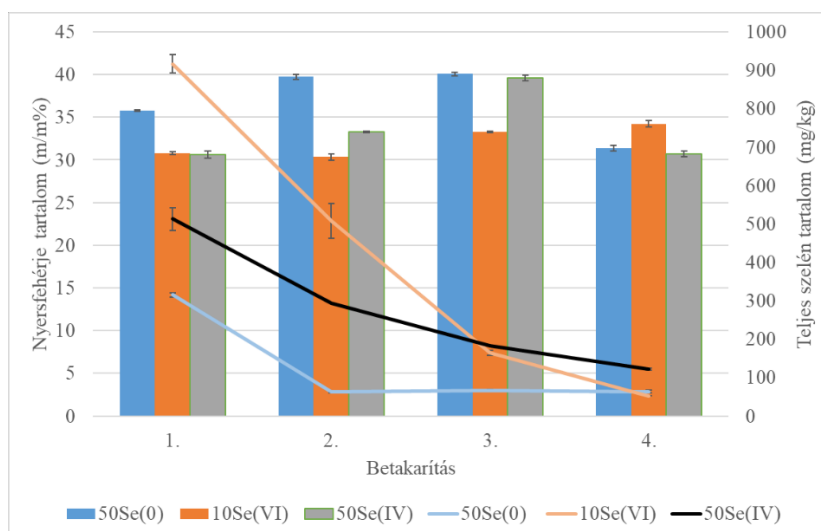
A barnalé nitrogéntartalma 0,58 és 1,59 (m/m)% között változott (21. ábra). Az LFK- és a rost-frakciókkal összehasonlítva a barnalé kis szórása következtében, nem olyan erősen kimutatható a szelénkezeléssel összefüggő tendencia. A szelénkezelés függvényében a fehérjetartalomban nem olyan különbözők a rost- és barnalé minták egymástól, mint az LFK-k (22. ábra). A barnalé nyersfehérje-tartalma eltérő eredményt mutatott a szelenizálásra és a betakarítási időre, annak ellenére, hogy az LFK- és rostfrakciókhoz képest a legkisebb volt. Az 1. és 4. betakarítás nagyobb nyersfehérje-tartalmat mutatott, mint a 2. és 3. betakarítás. A szelénrel kezelt növényeknél nagyobb volt a barnalé nyersfehérje-tartalma, mint a kontroll. Továbbá az ionos Se-formák (Se(VI) és Se(IV)) és a vörös Se0 koncentrációjának növelése a négy betakarítási időpontban nagyobb nyersfehérje-tartalmat eredményezett, kivéve az 50Se(IV) kezelést, amely az 1. és 4. betakarításkor kisebb értéket mutatott. Az 1 Se(IV) és 10Se(IV) kezelések mutatták a legnagyobb barnalé nyersfehérje-tartalmat, függetlenül a betakarítási időpontoktól. A barnalé esetében továbbá érdemes kiemelni, hogy a mért értékek a szűrővel elválasztott frakcióban lévő oligopeptidekből, szabad aminosavakból, biogén aminokból származnak. Kevés valódi fehérje sávot lehetett kimutatni a barnaléból SDS-PAGE módszerrel (nem közölt adat).



22. ábra: Tenyészedényes kísérlet levélfehérje-koncentráció (LFK), rost és barnalé frakcióinak nyersfehérje-tartalom eredményei a négy egymást követő betakarítás alkalmával. Az átlag értékek (n=3) közötti statisztikailag szignifikáns különbséget az oszlopok fölé írt eltérő betűk jelzik ($p \leq 0,05$). A diagramok skálája eltérő!

A levélfehérje-koncentráció (LFK) ebben a kísérletben, mint a zöld biofinomítással nyerhető, közvetlenül hasznosítható főterméke, potenciális takarmányfehérje-forrásként szerepel. A szelénkezelés egyik célja az LFK szeléndúsítása, a kedvező fehérjetartalom megtartása mellett. Ennek vizsgálata érdekében, összevetve a nyersfehérje adatokat a szelén-tartalommal, az LFK minták fehérje- és szeléntartalma között negatív összefüggés áll fenn. A 10Se(VI), 50Se(IV) kezelésekben a szeléntartalom volt a legnagyobb (500-900 mg/kg az első betakarításkor), a fehérjetartalom pedig a legkisebb ezekben a mintákban az első betakarításkor (23. ábra). Később, a 3. betakarításkor a szeléntartalom csökkenése és a fehérjetartalom növekedése volt megfigyelhető. Mivel a rost- és a barnalé-minták fehérjetartalma viszonylag alacsony, ez a

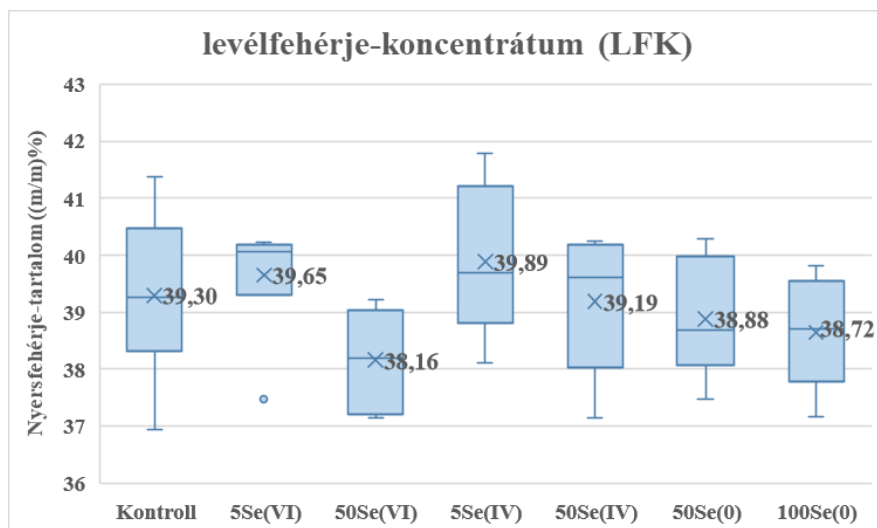
tendencia nem mutatható ki. A szelenát, mint könnyebben felvehető forma már kisebb koncentrációban is képes toxikus szintet elérni az élő szervezetekben. Ennek következtében a szelenát okozta erős oxidatív stressz vezethetett a csökkent fehérjetartalomhoz a vizsgált mintákban.



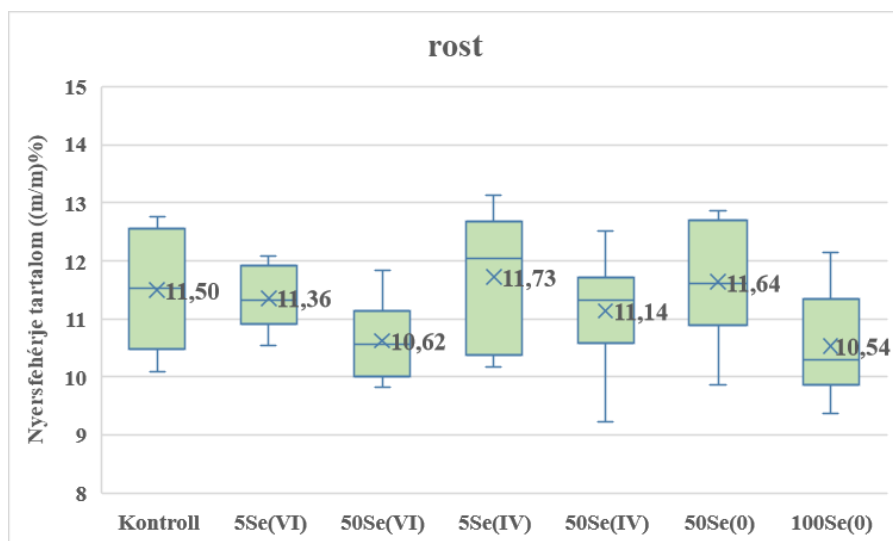
23. ábra: A levélfehérje-koncentráció (LFK) nyersfehérje-tartalom és teljes szeléntartalom összefüggések a négy betakarítás során, csak a legnagyobb koncentrációjú, 50 mg/kg Se(0), 10 mg/kg szelenát és 50 mg/kg szelenit kezelések esetében. A tenyészedényes kísérletben alkalmazott nagy koncentrációjú ionos szelénformák negatív hatást gyakoroltak a lucernafrakciók, kifejezetten az LFK nyersfehérje-tartalmára.

5.7.2 A szabadföldi kísérlet nyersfehérje-tartalom eredményei

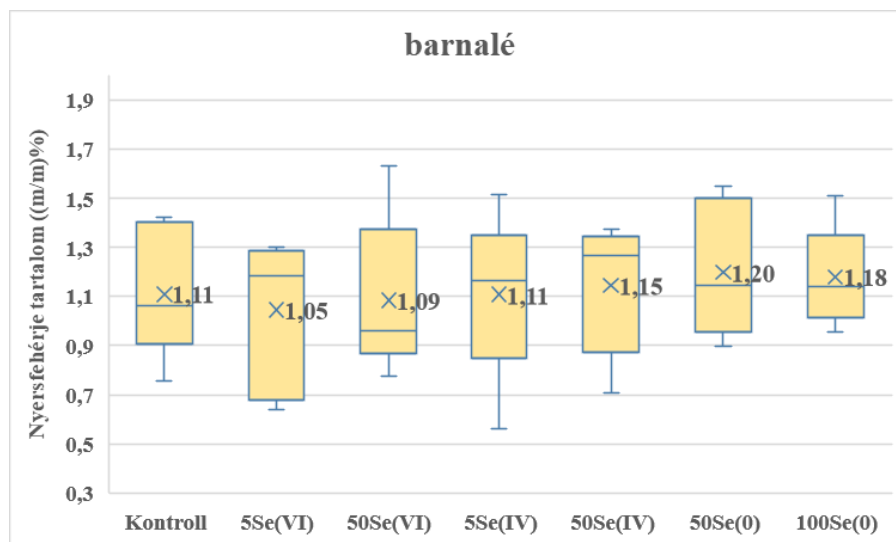
A szabadföldi szelénkezeléses lucernakísérletben három egymást követő betakarítást végeztünk a szelénkezelések után. A feldolgozást követő frakciók nyersfehérje eredményét a 24., 25., és 26. ábra szemlélteti. A frakciók átlagos értékeit figyelembe véve a szabadföldi és a tenyészedényes kísérletben hasonló eredményeket kaptunk. Vagyis az LFK nyersfehérje-tartalma a legnagyobb, szabadföldi kísérletben 38-39 %. A tenyészedényes kísérletben alkalmazott, nagyobb koncentrációjú szelénkezelések szelén-felhalmozódását és negatív hatásait figyelembe véve szabadföldi körülmények között kisebb dózisokat alkalmaztunk. Ezzel összefüggően nem tapasztaltunk olyan mértékű különbséget a fehérjetartalom-változásban a kezelések között. Ezzel együtt az élő lucerna erős főgyökerei szabadföldi kísérlet során korlát nélkül növekedhettek a talajban a növényi növekedés polaritásának megfelelően, a felszínre juttatott szelén talajba szivárgásának sebességénél gyorsabban. Az LFK minták dobozábráján (24. ábra) látható, hogy az 50 mg/m² koncentrációjú szelenát kezelés csökkentette legjobban a nyersfehérje-tartalmat a többi kezeléshez képest.



24. ábra: Szabadföldi lucernakísérletből származó LFK-minták nyersfehérje-tartalma, a három betakarítás dobozdiagramon ábrázolva. A dobozok az értékek interkvartilis terjedelmét szemléltetik, a vonal a medián, az 'x' és az ábrán szereplő szám az átlagértéket jelzi. A felső és alsó bajusz végpontja a maximum és minimum értékeket mutatja. A kék pont kiugró értéket jelöl. Az értékek 36-43 %-ig terjedő skálán szerepelnek.



25. ábra: Szabadföldi lucernakísérletből származó rostminták nyersfehérje-tartalma, a három betakarítás dobozdiagramon ábrázolva. A dobozok az értékek interkvartilis terjedelmét szemléltetik, a vonal a medián, az 'x' és az ábrán szereplő szám az átlagértéket jelzi. A felső és alsó bajusz végpontja a maximum és minimum értékeket mutatja. Az értékek 8-15 %-ig terjedő skálán szerepelnek.



26. ábra: Szabadföldi lucernakísérletből származó barnalé-minták nyersfehérje-tartalma, a három betakarítás dobozdiagramon ábrázolva. A dobozok az értékek interkvartilis terjedelmét szemléltetik, a vonal a medián, az 'x' és az ábrán szereplő szám az átlagértéket jelzi. A felső és alsó bajusz végpontja a maximum és minimum értékeket mutatja. Az értékek 0,3-1,9 %-ig terjedő skálán szerepelnek.

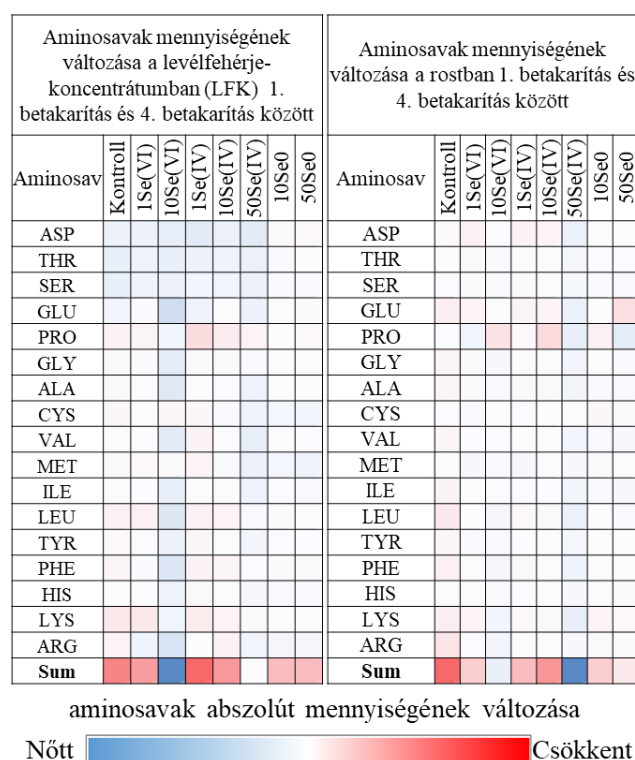
A szabadföldi rost- és barnalé-minták nyersfehérje-tartalom eredményeit a 25. és 26. ábra foglalja össze. A szelén kezelések a szabadföldi termesztésből származó rost- és barnalé-frakciók nyersfehérje-tartalmára nem gyakoroltak kimutatható negatív hatást. A barnalé a szakirodalomban használt szakkifejezés a fehérje mentesített növényi folyadékra (angolul *brown juice*, de használatban van a *phytoserum* és *plant whey* kifejezés is). Az ipari feldolgozás technológiai következményéből tartalmazhat kis mennyiségben fehérjét. A tenyészedényes és szabadföldi kísérletben is 1-1,5 % nyersfehérje-tartalmat mértünk a barnalé mintákban. Hasonló, zöld biofinomítás témájú kísérleteinkben azonban szabadaminosav-tartalom mérésével és akrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) támasztottuk alá, hogy a barnalében jellemzően nincsenek valódi fehérjék, inkább oligopeptidek és szabad-aminosavak találhatók (Kovács *et al.*, 2021b; Domokos-Szabolcsy *et al.*, 2022).

A rost minták 10-11 %-os nyersfehérje-tartalma kérődző állatok takarmányozására elegendőnek bizonyul, ahol kifejezetten előnyös az alacsony fehérje- és magas élelmirost-tartalom (Schmidt, 1993).

5.7.3 Proteinogén aminosavak kvantitatív értékelése

Az aminosavak mennyiségi változásait csak a tenyészedényes kísérletből származó lucerna-frakciókból vizsgáltuk. A proteinogén aminosavak mennyiségét az 1. és 4. betakarítás LFK- és

rostfrakciókból határoztuk meg. A két betakarítás között találtuk a legmarkánsabb különbségeket a többi mért paraméter esetén (szeléntartalom, nyersfehérje-tartalom). Összességében az LFK-frakció mindkét mintavétel esetében magasabb aminosav-összetételt mutatott, mint a rost. Limitáló aminosavakból, mint a lizin és a metionin 9,06 illetve 1,61 % volt fehérjére vonatkoztatva az LFK mintákban. Az aminosavak abszolút mennyiségei a kontroll LFK-ban összhangban vannak az irodalomban található értékekkel (*Hojilla-Evangelista et al.*, 2017). A beépült szelén mennyisége és a fehérjetartalom közötti tendenciák az aminosav eredményeknél is megfigyelhetők voltak. A mért aminosavak összegét tekintve a nagy koncentrációjú ionos formákkal kezelt növények mutatták a legalacsonyabb aminosav-tartalmat az első betakarításkor, a 10Se(VI)-kezelt LFK esetében az aminosavak a kontroll érték 50-70%-át érték el. Ez összefügg a magas szeléntartalommal és az alacsony nyersfehérje-értékkel, mert a negyedik betakarításra, amikor a szeléntartalom csökkent a vizsgált mintákban, az aminosav-tartalom a kontroll mintákhoz hasonló volt. A kisebb koncentrációjú ionos formákkal és a vörös elemi szelénrel kezelt növények frakciói a kontrollhoz hasonló aminosav-tartalommal rendelkeztek. A rostminták aminosav összetételére kevésbé volt hatással a szelénkezelés, mint az LFK esetében.



27. ábra: Az első és utolsó, 4. betakarítás során mért aminosavak relatív mennyisége levélféherje-koncentrátum (LFK)- és rostmintákban. A kék szín abszolút mennyiségben mért növekedést, a piros csökkenést jelent az utolsó betakarításkor az elsőhöz mérten.

A két vizsgált betakarítás relatív változását a 27. ábra mutatja. A piros szín csökkenést jelent az adott aminosav abszolút mért mennyiségében, az első betakarítást a negyedikhez hasonlítva, a szín intenzitása pedig a csökkenés mértékét mutatja. Kék szín jelzi azt, ahol a mért aminosav-tartalom növekedett az első betakarításról a negyedik betakarításra. Ezek alapján megállapítható, hogy a két vizsgált mintavétel között bár jelentős, gyakran szignifikáns változások történtek a szeléntartalom és nyersfehérje-mennyiségben az aminosavak mennyisége nem változott vagy gyengén csökkent, mind a kis koncentrációjú kezelés és a kontroll minták esetében is. Az aminosavak összegét tekintve a csökkenés mértéke is felerősödik. Jól kivehető azonban hogy a 10Se(VI) és az 50Se(IV) kezeléseknél nőtt az aminosavak mennyisége a 4. betakarításra a rost- és LFK-mintákban. A 10Se(VI) kezelés esetén az LFK-ban, 50Se(IV) kezelés esetén pedig a rost mintában volt nagyobb az aminosavak növekedése. Az 1. és 2. számú melléklet tartalmazza az LFK- és rostminták aminosav-összetételét mintára vonatkoztatva az 1. és 4. betakarítás alkalmával.

Guo és Wu (1998) nem találtak összefüggést a szeléntartalom és a kén-tartalmú aminosavak mennyisége között, amikor egy szeléntoleráns *Melilotus* fajt vizsgáltak. Eredményeikben a szelenometionin (SeMet) adódott a legnagyobb mennyiségben előforduló szelén-aminosavnak, illetve megállapították, hogy a szabad formában jelen lévő SeMet mennyisége jelentős. Vizsgálatinkban azonban a SeMet mennyisége az enzimatikusan hidrolizált mintákban volt magasabb, ami arra enged következtetni, hogy a SeMet szabad forma helyett fehérjékbe épül be (5.8.2 fejezet, 10. és 11. táblázat). Továbbá a SeMet mennyisége a Met-tartalom 2-5%-a a nagy Se-akkumulációjú LFK-mintákban (10Se(VI): SeMet- 247 mg/kg, Met 9000 mg/kg és 50Se(IV): SeMet 158 mg/kg, Met 2900 mg/kg az 1. betakarításkor).

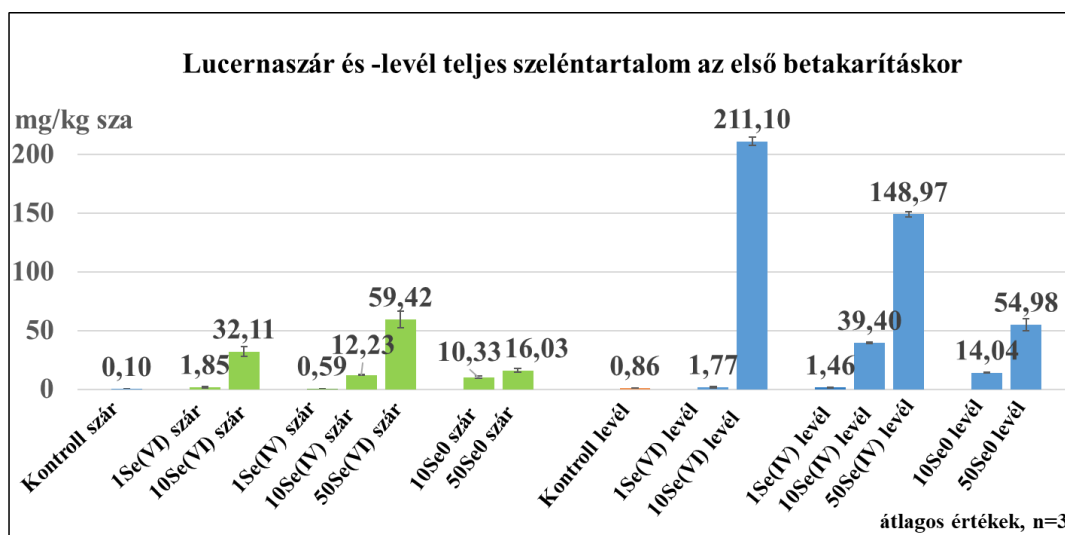
5.8 Szeléntartalom és szelénspeciáció-mérések eredményei

5.8.1 Teljes szeléntartalom-eredmények a tenyészedényes kísérletben

A zöld biofinomítás során keletkező frakciók, levélfehérje-koncentrátum (LFK), rost és barnalé szeléntartalmát mind a négy betakarítás alkalmával meghatároztuk. Emellett a zöld frakcionálás alapanyagául szolgáló friss hajtások szeléntartalmát is megmértük levelekre és szárra bontva. A szelénkezelést egyszer végeztük, a magvetést követően, így a növények a talajból vették fel a kijuttatott különböző szelénformákat a vizsgált vegetációs periódus alatt. A négy egymást követő betakarítás eredményei a 3 vizsgált szelénforma (Se(VI), Se(IV), Se0) felvételének dinamikáját mutatja.

5.8.1.1 A lucernaszár és -levélminták teljes szeléntartalom-eredményei tenyészedényes kísérletben

A növények földfeletti vegetatív szerveit vizsgálva a levelek tendenciózusan több szelént akkumuláltak minden szelénforma és koncentráció esetében, mint a szárak. Mivel a szintézisek helyszíne a levelekben található, így a fehérjetartalommal korrelálva a szelén is a levelekben dúsul fel (28. ábra). Ugyanakkor Bai és munkatársai (2019) tanulmányukban megállapítják, hogy a talajból a hajtásokba jutó szelén 65-70%-a a gyökerekben felhalmozódó mennyiségnek. Az első betakarítás 10 mg/kg szelenát (Se(VI)) kezelés esetében 6,5-szer több szelén volt a levelekben ($211,1 \pm 3,5$ mg/kg) mint a szárakban ($32,1 \pm 4,1$ mg/kg). Az 50 mg/kg szelenit (Se(IV)) kezelés esetében is nagy a szeléntartalom mindkét frakcióban (levelekben $148,9 \pm 2,4$, szárban $59,4 \pm 7,2$ mg/kg), de itt csak 2,5-szeres a különbség közöttük (28. ábra).

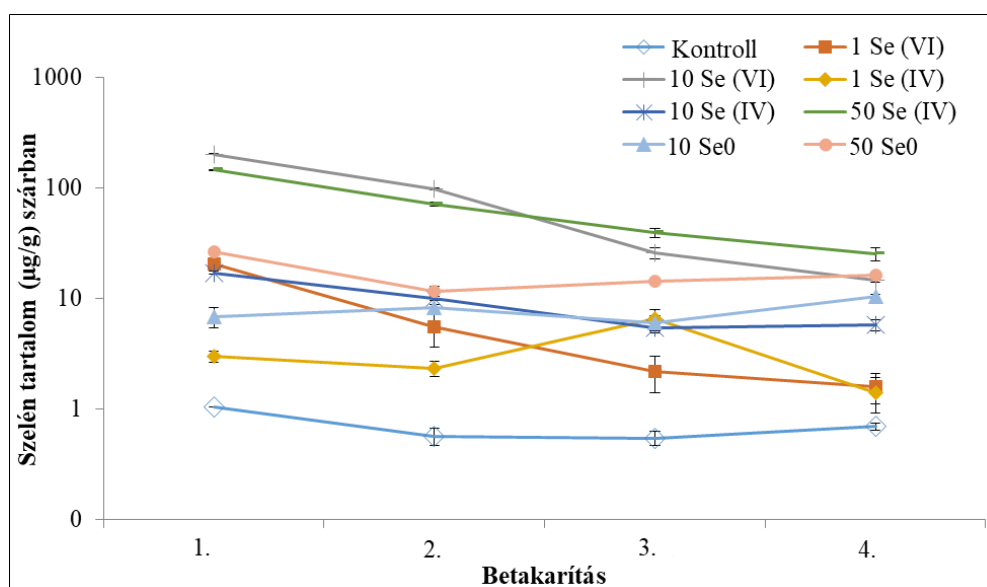


28. ábra: Tenyészedényes kísérletből származó lucernalevél és -szár minták teljes szeléntartalma az első betakarítás alkalmával, 20 nappal a szelénkezelés után.

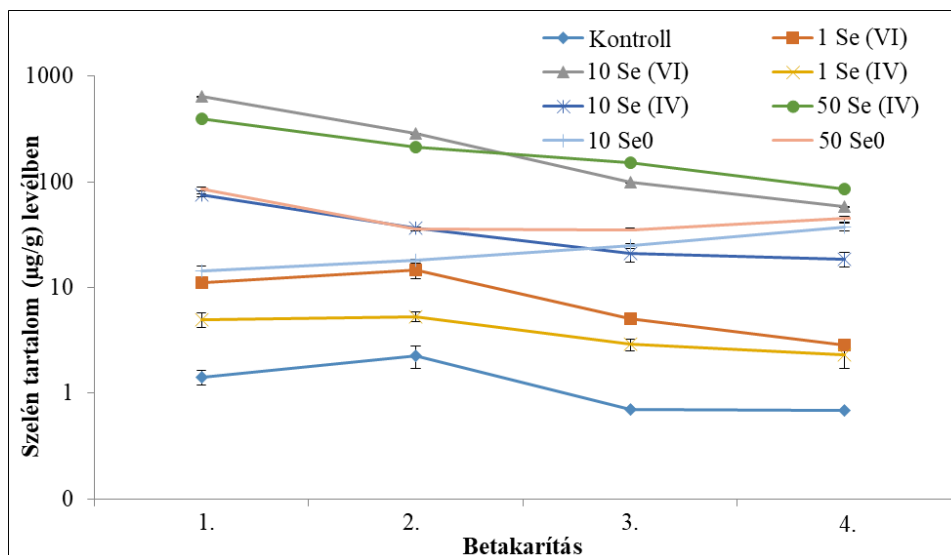
Az USDA rendszerezése szerint a lucerna fakultatív szelénakkumuláló növény, mivel képes 50 ppm-nél nagyobb koncentrációban szelént felhalmozni a hajtásokban száraz tömegre vetítve (USDA ARS, 2018). Ezt alátámasztják a 10Se(VI) és 50Se(IV) kezelések esetében tapasztalt nagy értékek ($211,1$ és $148,9$ mg/kg levélben). Hasonló tenyészedényes kísérletben 100 mg/kg koncentrációban kijuttatott szelenit mellett is csak 18 mg/kg koncentrációt találtak a lucernahajtásokban (Bai et al., 2019). A különbség oka lehet, hogy az említett vizsgálatban 1/3 rész homokot használtak a kísérleti talajjal keverve, mely befolyásolta a felvett szelén mennyiségét. Emellett a talaj mésztartalma is befolyásolja a szelénfelvétel hatékonyságát (Moteszareh et al., 2020). A vörös elemi szelénrel (10Se0, 50Se0) kezelt növények

esetében jellemzően kisebb koncentrációkat tudunk mérni. Az egymás utáni betakarítások eredményeiben megfigyelhető a szelénfelvétel dinamikája az alkalmazott formák esetén.

Levelekben és szárban is a 10 mg/kg Se(VI) kezelés eredményezte a legtöbb szeléntartalmat az első és második betakarításkor, a nagy dózisu szelenit (50Se(IV)) kezelés viszont a harmadik, negyedik betakarításkor érte el a legmagasabb értékeket a betakarításokon belül (29. és 30. ábra). Viszont a két ionos formát vizsgálva, a kezeléseken belül, az eltelt idővel folyamatosan csökken a szeléntartalom a 4 betakarítás végére. Az vörös Se0 alkalmazása kisebb Se-felvételt mutatott a Se(VI) és Se(IV) ionos formákhoz képest. Azonban az összes Se-tartalom változásában a négy betakarítás között kisebb ingadozást észleltünk. A 10 mg/kg Se0 kezelés esetén a szeléntartalom nőtt a levelekben az első betakarítástól ($14,3 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$) a negyedik betakarításig ($37,5 \pm 6,8 \mu\text{g/g}$). Ezzel szemben az 50 mg/kg Se0 kezelés esetén első betakarítástól a harmadikig csökkent, majd a negyedik betakarításra újra nőtt a levelek szeléntartalma (29. ábra). Ugyanakkor az 50Se(0) kezelésnél megfigyelt változások nem olyan markánsak, mint a 10 Se(0) kezelésnél, mivel az 50Se(0) kezelés négy betakarításának szórása 7,6, a 10Se(0) esetében pedig 15,7. Wang és munkatársai (2021) 300 mg/kg koncentrációban alkalmaztak levélpermetezést nátrium-szelenittel, három egymást követő kezelés után 40-45 mg/kg szeléntartalmat találtak a lucernalevelekben. A talajkezeléssel kijuttatott szelén esetében hasonló értékeket értünk el az 50Se0 ($39,4\text{-}54,9 \text{ mg/kg}$) és 10Se(IV) ($17,3\text{-}38,4 \text{ mg/kg}$) kezeléseknél (30. ábra).



29. ábra: Tenyészedényes kísérletből származó szelénkezelt lucernaszár szeléntartalma, a négy egymást követő betakarítás során (Kovács et al., 2021a).



30. ábra: Tenyészedényes kísérletből származó szelénkezelt lucernalevelek szeléntartalma, a négy egymást követő betakarítás során (Kovács *et al.*, 2021).

5.8.1.2 Zöld frakciók teljes szeléntartalom-eredményei a tenyészedényes kísérletben

A feldolgozott lucernafrakciók szeléntartalmát összehasonlítva legnagyobb értékek az LFK-frakciókban voltak mérhetők, ezt követte a rost- és a barnalé-frakció (9. táblázat). A rost szeléntartalma hozzávetőlegesen a negyede az LFK-ban mért koncentrációnak minden betakarításnál. A barnalevek szeléntartalma 0,33-120,5 mg/l a kezelés és betakarítások függvényében, általában tizede az azonos feldolgozásból származó LFK-nak.

9. táblázat: A zöld frakcionálással keletkező szeléndúsított lucernatermékek teljes szeléntartalma. Az egy betakarításon és mintatípuson belül különböző betűkkel felső indexált értékek között szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbség mutatható ki (Tukey-teszt alapján).

Teljes szeléntartalom				
Levélfehérje-koncentráció (LFK)				[$\mu\text{g/g}$]
Betakarítás	1.	2.	3.	4.
0Se	0.7 $\pm$ 0.04 ^g	1.1 $\pm$ 0.13 ^h	0.8 $\pm$ 0.02 ^g	0.7 $\pm$ 0.01 ^h
1Se(VI)	93.0 $\pm$ 1.95 ^d	46.7 $\pm$ 0.45 ^e	11.4 $\pm$ 0.18 ^f	6.6 $\pm$ 0.01 ^g
10Se(VI)	916.7 $\pm$ 24.66 ^a	507.4 $\pm$ 31.79 ^a	165.1 $\pm$ 6.66 ^b	52.7 $\pm$ 0.41 ^c
1Se(IV)	18.6 $\pm$ 0.33 ^f	12.6 $\pm$ 0.79 ^g	4.0 $\pm$ 0.05 ^g	9.3 $\pm$ 0.18 ^f
10Se(IV)	92.3 $\pm$ 3.58 ^d	64.9 $\pm$ 0.20 ^c	29.0 $\pm$ 0.04 ^e	34.4 $\pm$ 0.40 ^e
50Se(IV)	512.7 $\pm$ 29.06 ^b	294.1 $\pm$ 0.36 ^b	183.3 $\pm$ 0.06 ^a	122.1 $\pm$ 2.46 ^a
10Se0	38.8 $\pm$ 0.34 ^e	29.1 $\pm$ 0.45 ^f	44.7 $\pm$ 0.98 ^d	36.6 $\pm$ 0.16 ^d
50Se0	126.3 $\pm$ 5.26 ^c	62.1 $\pm$ 1.67 ^d	66.6 $\pm$ 2.20 ^c	63.8 $\pm$ 3.20 ^b
Rost				[$\mu\text{g/g}$]
Betakarítás	1.	2.	3.	4.
0Se	0.9 $\pm$ 0.04 ^h	1.0 $\pm$ 0.27 ^h	0.9 $\pm$ 0.10 ^h	0.8 $\pm$ 0.03 ^h
1Se(VI)	41.6 $\pm$ 4.55 ^d	8.7 $\pm$ 0.01 ^e	5.2 $\pm$ 0.55 ^f	2.0 $\pm$ 0.37 ^g
10Se(VI)	343.4 $\pm$ 4.80 ^a	147.1 $\pm$ 0.43 ^a	37.8 $\pm$ 0.07 ^b	13.7 $\pm$ 0.02 ^c
1Se(IV)	7.2 $\pm$ 0.13 ^g	3.3 $\pm$ 0.19 ^g	1.7 $\pm$ 0.05 ^g	3.2 $\pm$ 0.09 ^f
10Se(IV)	52.7 $\pm$ 1.69 ^c	14.0 $\pm$ 0.21 ^d	13.3 $\pm$ 0.29 ^d	7.9 $\pm$ 0.02 ^e
50Se(IV)	171.0 $\pm$ 1.86 ^b	89.4 $\pm$ 0.59 ^b	45.1 $\pm$ 0.05 ^a	32.3 $\pm$ 0.27 ^a
10Se0	10.6 $\pm$ 0.18 ^f	7.8 $\pm$ 0.04 ^f	10.5 $\pm$ 0.95 ^e	11.5 $\pm$ 0.03 ^d
50Se0	34.4 $\pm$ 0.14 ^e	19.4 $\pm$ 0.19 ^c	17.0 $\pm$ 0.15 ^c	20.3 $\pm$ 2.44 ^b
Barnalé				[$\mu\text{g/ml}$]
Betakarítás	1.	2.	3.	4.
0Se	0.2 $\pm$ 0.01 ^e	0.2 $\pm$ 0.02 ^h	0.1 $\pm$ 0.00 ^g	0.1 $\pm$ 0.01 ^g
1Se(VI)	17.8 $\pm$ 0.02 ^c	2.6 $\pm$ 0.02 ^e	0.6 $\pm$ 0.00 ^f	0.3 $\pm$ 0.07 ^g
10Se(VI)	120.5 $\pm$ 7.95 ^a	62.0 $\pm$ 0.07 ^a	10.6 $\pm$ 0.31 ^b	3.9 $\pm$ 0.04 ^c
1Se(IV)	2.1 $\pm$ 0.01 ^d	0.9 $\pm$ 0.06 ^g	0.5 $\pm$ 0.23 ^f	0.7 $\pm$ 0.02 ^f
10Se(IV)	18.3 $\pm$ 0.13 ^c	7.2 $\pm$ 0.05 ^c	1.6 $\pm$ 0.03 ^e	2.2 $\pm$ 0.25 ^e
50Se(IV)	78.5 $\pm$ 1.29 ^b	34.2 $\pm$ 0.23 ^b	11.6 $\pm$ 0.03 ^a	9.1 $\pm$ 0.04 ^a
10Se0	2.7 $\pm$ 0.01 ^d	2.1 $\pm$ 0.02 ^f	3.1 $\pm$ 0.00 ^d	2.5 $\pm$ 0.25 ^d
50Se0	17.7 $\pm$ 0.23 ^c	6.6 $\pm$ 0.05 ^d	3.8 $\pm$ 0.02 ^e	4.9 $\pm$ 0.30 ^b
Átlag értékek $\pm$ szórás (n=3)				

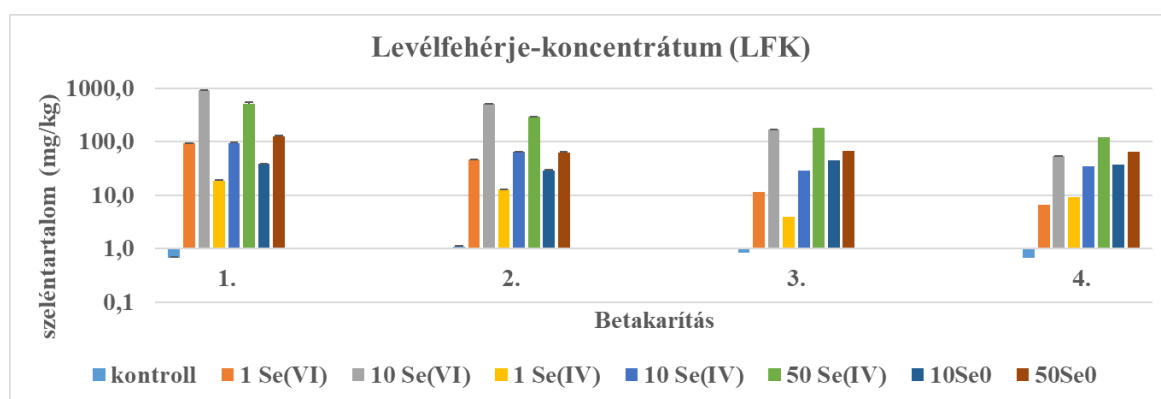
A kijuttatott kémiai forma erősen befolyásolta a frakciókba épült szelén mennyiségét. Az első betakarításkor 10Se(VI) kezelés esetén 916,6 mg/kg volt az LFK szeléntartalma (a legnagyobb érték LFK-ban), ugyanakkor 10 mg/kg koncentrációban kezelve szelenittel (10Se(IV)) csak 92,3 mg/kg, vörös elemi szelénnel (10 mg/l Se0) 38,7 mg/kg szeléntartalma volt az LFK-nak (9. táblázat). Ismert, hogy a szelenát mobilis, gyorsabban felvehető, mint a szelenit (Mikkeisen *et al.*, 1987), mivel gyökéren keresztül a legkönnyebben hozzáférhető forma, emiatt nagy

koncentrációban hamar toxikus szintet ér el a növényben, (White, 2016). Ez abiotikus stresszválasszal és csökkent fehérjetartalommal jár. Az egymást követő 4 betakarítás során az LFK-k szeléntartalma a nagy koncentrációjú ionos formák (10Se(VI), 50Se(IV)) esetén nagymértékben csökkent. A talajból kimerülve a szelénfelhalmozódás a vegetációs időszak során újra sarjadó leveles szár eredetű LFK-frakcióban kisebb mértékű. A legnagyobb, mintegy 17-ed részre történő csökkenést a 10Se(VI) kezelés esetén találtuk: 919,9 mg/kg az első betakarításkor, 507,4 mg/kg a második, 165,1 mg/kg a harmadik és 52,7 mg/kg az utolsó negyedik betakarításkor (9. táblázat). Ennek oka a szelén ionos formáinak nagyfokú mobilitása a talajban, így a kezelést követő első betakarításkor nagy mennyiségű, akár toxikus szintű szelén került a talajból az asszimiláló szervekbe (levelek, szárak), és a későbbi csökkenés a talaj szeléntartalmának kimerüléséből adódik.

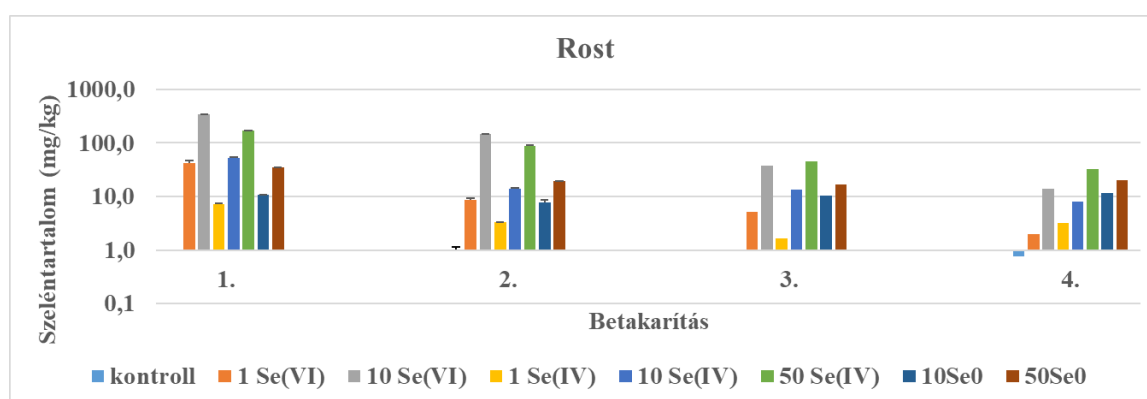
Ezzel szemben a vörös Se₀ alkalmazása, függetlenül az alkalmazott koncentrációjától, jelentősen kisebb mértékű csökkenést mutatott az LFK szelén felhalmozódásában az 1. és 2. betakarítást összevetve. Ezt követően pedig még növekedést is realizáltunk a 3., 4. betakarítás során pl: 50Se₀ kezelés LFK-ban a 2. betakarítástól 62,1; 66,6; 63,8 mg/kg értékeket mértünk (9. táblázat). Hasonló tendenciát tapasztaltunk a rost- és barnaléfrakciók esetében is. A kísérletben használt vörös elemiszelén-szolban lévő részecskék mérettartománya 60-150 nm közötti, már a nanorészecske tartomány határát át is lépi. A naonrészecskék (1-100 nm) képesek bejutni a gyökérbe, a szöveti struktúrákon való keresztüljutásuk viszont passzív módon nehézkes. Emellett az elemi szelén ionos és szerves formákká alakulása sem elhanyagolható a talaj mikrobiológiai aktivitása révén, ezek a könnyebben felvehető formák (szelenát, szelenometionin) folyamatos felszabadulása az elemi szelén részecskékből okozhatta a lucernafrakciók stabil és tartós szelénszintjét (Sztrik, 2016).

A két vizsgált ionos forma (szelenát és szelenit) biológiai hozzáférhetősége nem egyforma. Azonos koncentrációban alkalmazva a szelenátot (Se(VI)) nagyobb mennyiségben vették fel a növények, mint a szelenitet (Se(IV)). Ez a különbség minden vizsgált frakciónál és az első három betakarításkor megfigyelhető. A különbségek a frakciók szeléntartalmával (különösen a rost és a barnalé esetében) és az alkalmazott koncentrációval (1 vagy 10 mg/kg) csökkennek (31., 32., 33. ábra). A 4. betakarításra a felvett szelénmennyiség tendenciája minden frakcióban megfordult az 1 mg/kg -os kezelés esetén, a szelenittel kezelt minták magasabb szeléntartalmat értek el, mint a szelenáttal kezelték. Ez azzal magyarázható, hogy a szelenit átalakulhat szelenáttá, amely egy oxidáltabb stabilabb forma, a talajviszonyoktól függően (Shahid et al., 2018).

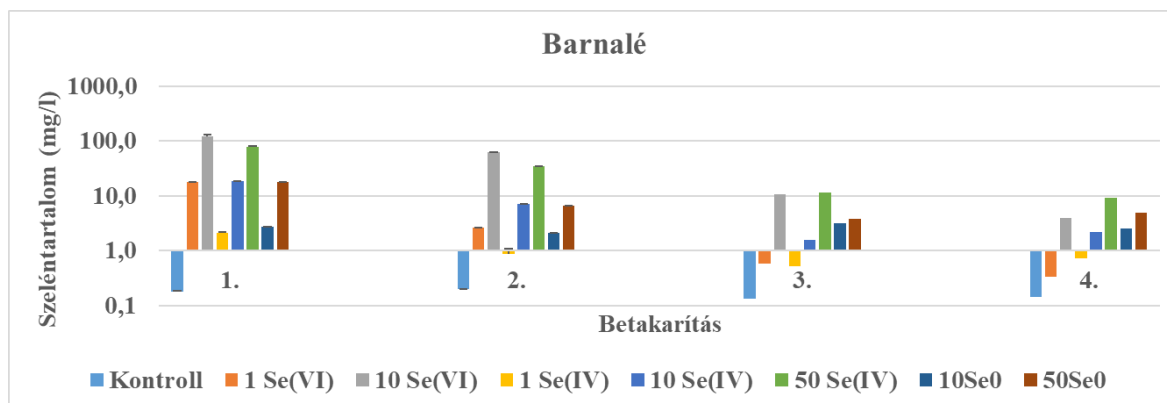
Az alkalmazott szelénkoncentráció dózishatása mind a rost-, mind a barnalé-mintákban hasonló mintázatot követ, mint az LFK esetében (31., 32., 33. ábra). A legnagyobb szeléntartalmat a 10 mg/kg szelenát (10Se(VI)) kezeléssel kaptuk, míg a legkisebb értékeket az 1 mg/kg szelenit (1Se(IV)) formával, néhány kivételtől eltekintve. Az alkalmazott formák és koncentrációk szintén szignifikánsan befolyásolták a minták szeléntartalmát. Az 1Se(IV)-kezelés statisztikailag nem különbözött a kontroll mintáktól (minden frakcióban), csak kis változások voltak a koncentrációban a betakarítások során. Ez az alkalmazott alacsony koncentráció és a szelenit növények számára alacsonyabb hozzáférhetőségének eredménye. A magas koncentrációjú (50 mg/kg) vagy mobilisabb formájú (szelenát) kezeléseknél azonban az LFK, a rost és a barnalé teljes szeléntartalma a betakarítások alatt széles skálán mozog (31., 32., 33. ábra).



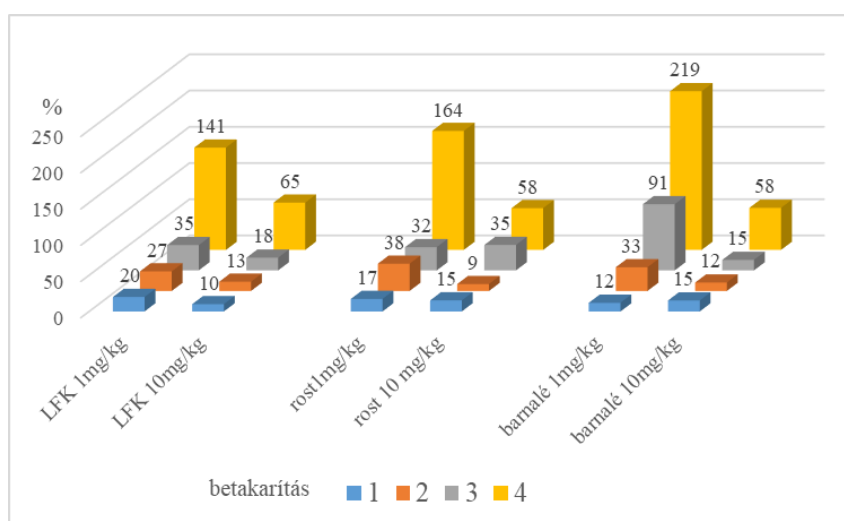
31. ábra: Tenyészedényes kísérletből származó LFK-minták teljes szeléntartalma (mg/kg szá) a négy egymást követő betakarítás alkalmával, logaritmikus skálán ábrázolva.



32. ábra: Tenyészedényes kísérletből származó rostminták teljes szeléntartalma (mg/kg szá) a négy egymást követő betakarítás alkalmával, logaritmikus skálán ábrázolva.



33. ábra: Tenyészedényes kísérletből származó barnalé-minták teljes szeléntartalma (mg/l) a négy egymást követő betakarítás alkalmával, logaritmikus skálán ábrázolva.

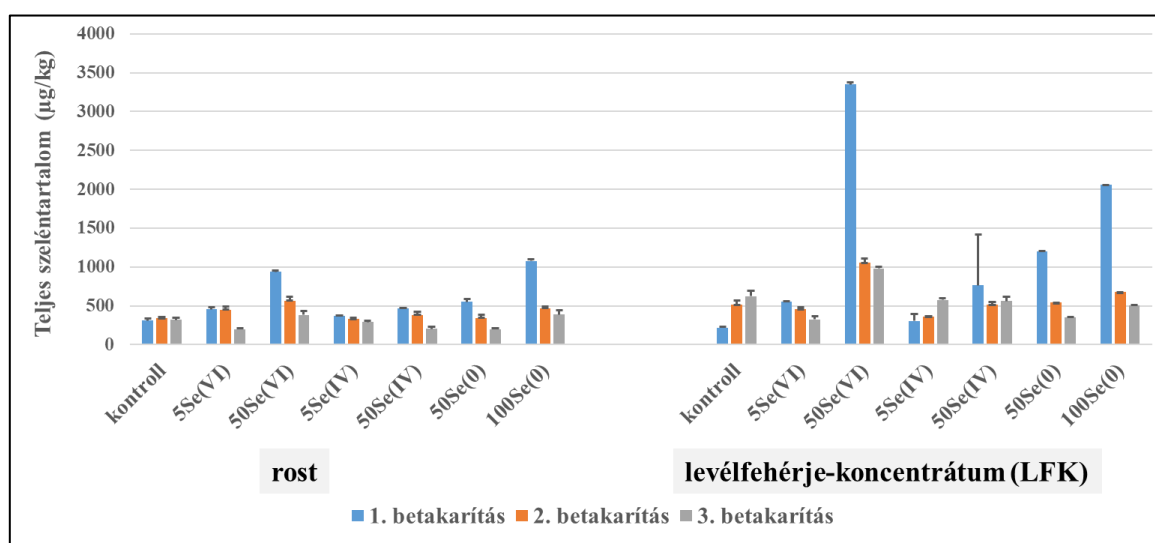


34. ábra: A szelenát (Se(VI)) és szelenit (Se(IV)) kezelések után felvett teljes szeléntartalom arányai százalékban kifejezve. A szelenát/szelenit felvétel aránya a két azonos kijuttatott koncentrációban (1mg/kg és 10 mg/kg) és minden frakcióban, a négy egymást követő betakarítás szerint.

A 34. ábra a kísérletben vizsgált ionos formák felvételének és beépülésének különbségeit mutatja. Ugyanabban a koncentrációban kijuttatva a szelenit (Se(IV)) csak 10-30 %-át éri el a felvett szelenátnak (Se(VI)) az első 3 betakarítás során. Azonban ez a relatív érték növekvő tendenciát mutat a kezeléstől eltelt idő függvényében, mivel a negyedik betakarításra akár 1,4-2,9 szerese is lehet a szelenit felvétele a szelenátnak. Azonban abszolút értékeket tekintve ezek már kisebb koncentrációk, mint az első betakarítás idején. A szelenátot gyorsan felvették a lucerna növények, ezzel együtt viszont relatíve gyorsabban ki is merült a talajból, mint a szelenit.

5.8.1.3 A szabadföldi lucerna kísérlet során nyert rost, levélfehérje-koncentrátum (LFK), és barnalé teljes szeléntartalma

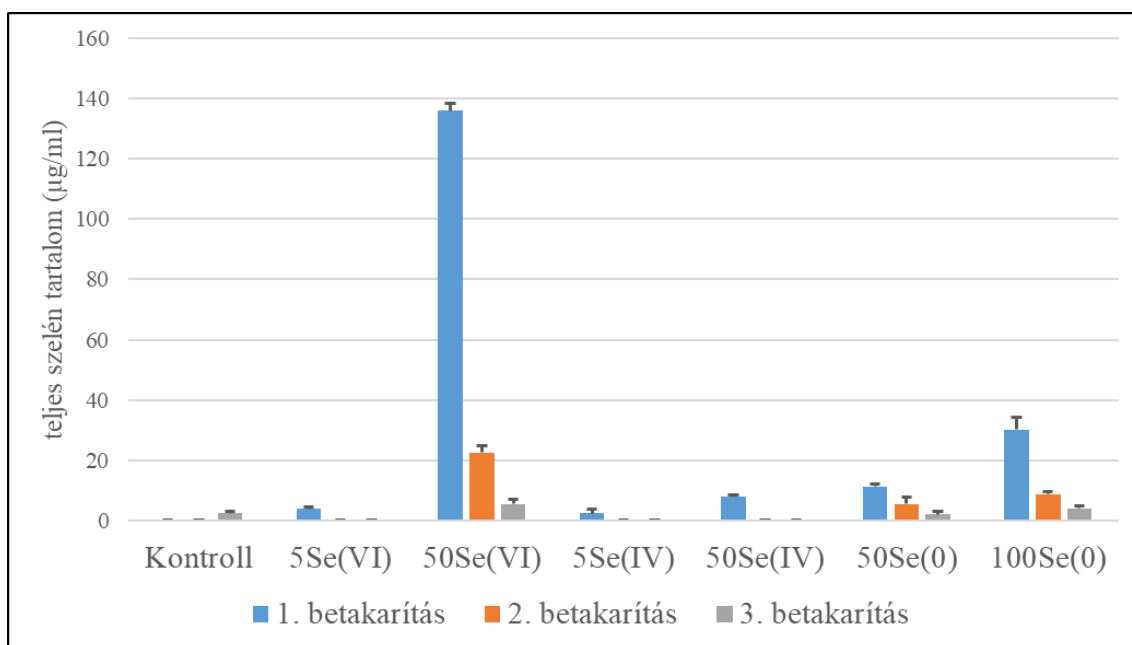
A tenyészedényes kísérletben alkalmazott szelén dózisok mellett kapott nagy teljes szeléntartalom koncentrációk figyelembevételével, szabadföldi körülmények között kisebb dózisokat alkalmaztunk, a lucerna agronómiai szelénmegerősítés módszerének optimalizálásához. Az alacsonyabb dózisok miatt a beépült szelén mennyisége is $\mu\text{g/kg}$, azaz ppb-ben kifejezhető mennyiségű szemben a zártedényes-kísérletnél tapasztalt mg/kg dimenziójú eredményekkel (35. ábra). A korábbi fejezetekben bemutatott biomasszahozam és a nyersfehérje-eredmények arra mutattak, hogy ezek az alkalmazott kezelések nem okoztak gátló hatást, stresszt a növényeknek vagy toxikus felhalmozódást.



35. ábra: Szabadföldi lucernakísérlet rost- és LFK-mintáinak teljes szeléntartalom eredményei három egymást követő betakarítás alapján.

A lucernafrakciók szelén felhalmozódása hasonló tendenciát mutat, mint ahogyan a tenyészedényes kísérletben is tapasztaltuk a frakciók között, vagyis a barnalébe került a legkevesebb, melyet a rost követ, az LFK pedig a legtöbb szelént tartalmazza (35. és 36. ábra). Az 28. ábra szemlélteti a rost- és LFK-minták teljes szeléntartalmát. A három egymást követő betakarítás során látható tendencia, vagyis a kezeléstől eltelt idővel arányosan csökken a felvett és beépült szelén mennyisége nyomon követhető az elért értékekben, ugyanakkor kiugró változásokat a legtöbb kezelésnél nem tapasztaltunk. Kivétel ez alól az $50 \text{ mg/m}^2 \text{ Se(VI)}$ és a $100 \text{ mg/m}^2 \text{ Se(0)}$ kezelés, rost és LFK esetében is ezeknél a mintáknál kaptuk a legnagyobb szeléntartalom eredményeket az első betakarításkor. Az LFK esetében ezek az értékek jelentősen kiugrónak bizonyultak, az 50Se(VI) kezelésnél $3349 \pm 7,1 \mu\text{g/kg}$, a 100Se(0) esetén pedig $2054 \pm 16,25 \mu\text{g/kg}$ (35. ábra). Barnalé esetében is ezen két kezelés első betakarításból

származó mintáinál találtuk a legnagyobb értékeket, bár a szabadföldi kísérletből származó barnalevek szeléntartalma viszonylag alacsony volt (29. ábra). Az 50Se(VI) magas értékei az első betakarítás alkalmával a tenyészedényes kísérletnél megfigyelt hasonló trendekkel magyarázhatók.



36. ábra: Szabadföldi, szeléndúsított lucernabarnalé teljes szeléntartalom eredménye a három egymást követő betakarítás során.

A vörös elemi szelénkezelés esetében, mindkét alkalmazott koncentrációnál jelentős csökkenés figyelhető meg az LFK-mintáknál, az első betakarításról a másodikra. Ezek számszerűen az 50Se(0) kezelésnél 1200-ról 540 µg/kg-ra, 100Se(0)-nál pedig 2054-ről 680 µg/kg-ra történő csökkenést jelentettek. Ez a szelénkezelés utáni markáns csökkenés a kémiai szintézissel előállított elemi szelén szol előállítás technikai nehézségeiből adódhatott. Feltételezhetően jelentősebb mennyiségben maradhatott ionos formájú szelén a kijuttatott oldatban, mely könnyű mobilizálhatósága révén hamar bekerült a növényi szövetekbe. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a második és harmadik betakarítás szeléntartalom eredményeit vizsgálva a vörös elemi szelénrel kezelt minták között már kisebb a különbség (36. ábra).

5.8.2 Szelénspeciáció mérés eredmények

Korlátozott lehetőségeinkre tekintettel szelénmódosulat-analitikai vizsgálatokat csak a tenyészedényes kísérletből származó lucernafrakciókból végeztünk, mindhárom alkalmazott szelénforma esetén a nagyobb koncentrációkat figyelembe véve.

A növényi megerősítésnél (*fortification*) nemcsak az a fontos, hogy mennyi szelént képes a növény felvenni és akkumulálni a szerveiben, hanem hogy milyen mértékben képes azt átalakítani szerves formákba, hiszen ezek humán- és állategészségügyi szempontból előnyösebbek.

Emiatt vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy milyen formában alakítja át a lucerna a talajból gyökereken keresztül felvett szelént, továbbá gyakorol-e hatást a beépült szelénspeciesek megoszlására a felvett forma? A zöld biofinomítás (frakcionálás) során lehetséges-e bizonyos szerves formákat (pl.: SeMet) feldúsítani egyes frakciókban?

A módosulatanalitikai méréseket az 1., 2. és 4. betakarítás mintáiból végeztük. A vizsgálatokhoz külső kalibrációs módszert használtunk és a mintákkal párhuzamosan SELM-1, szelénrel dúsított élesztő referencia mintát is vizsgáltunk. A SELM-1 esetében a szelenometionin (SeMet) visszanyerhetőségének mennyisége 80,4%, ezzel az értékkel korrigáltuk a vizsgálatkor kapott eredményeket. A mintákból kétféle kivonatot készítettünk, a vizes kivonatban a szerves és vízben jól oldódó szelénformákat találtuk nagyobb mennyiségben. Az enzim hidrolízis során proteázzal inkubáltuk a vizes kivonat lecentrifugált üledékét, ezekben a mintákban a fehérjékbe épült szelenaminosavakat kerestük.

5.8.2.1 A lucernalevél és szár szelénspeciáció-eredményei

Ahogy a szeléntartalomnál megfigyelhető volt, a speciáció vizsgálat alkalmával is a levelekben mértünk nagyobb értékeket a szárakhoz képest (10. táblázat). Általános tendencia, hogy a vizes kivonatokban a szerves szelén volt a domináns, bár a vizes kivonatokban is találtunk SeMet-t, a döntő mennyisége csak az enzim feltárás után volt mérhető. Nagymértékű szelén-tartalom csökkenést találtunk az első betakarítás és az utolsó betakarítás között, kifejezetten a 10Se(VI) kezelés esetében a teljes szeléntartalom eredményeivel korrelálva. Szár esetében 79,5 mg/kg-ról 4,3 mg/kg-ra, levélmintában pedig 901 mg/kg-ról 10,7 mg/kg-ra csökkent a szeléntartalom a vizes kivonatokban. Érdekes eredmény, hogy még az 50 mg/kg Se(IV) koncentrációban kijuttatott szelén esetében sem tudtuk a szelén kimutatni a vizsgált mintákból. A kijuttatott formától függetlenül a gyökereken keresztül felvett szelén a hajtásokba érve már döntő részben szelénátformában volt jelen. Az 50 mg/l SeO vörös elemi szelénrel kezelt növények *speciesei* nem mutattak olyan drasztikus változást, mint az ionos kezelések (Se(VI) és Se(IV)).

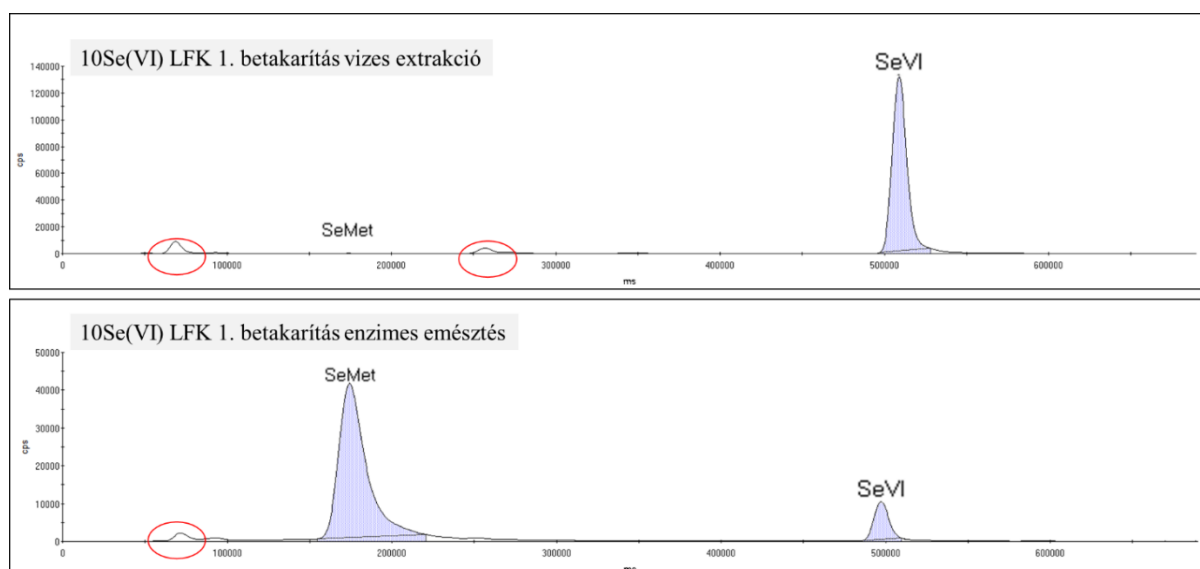
10. táblázat: Módosulatanalitikai vizsgálatok eredményei. A lucernaszárból és -levélből készült vizes és enzimes kivonatok SeMet- és Se(VI)-tartalma (Kovács *et al.*, 2021a).

Szelenometionin- (SeMet) és szelenát-tartalom (Se(VI)) lucernaszárban és -levélben													
Vizes kivonat												[mg/kg]	
szár						levél							
SeMet			Se (VI)			SeMet			Se (VI)				
Betakarítás	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	Betakarítás
10Se(VI)	2,2	0,9	0,5	79,5	32,3	4,3	8,2	1,5	1,2	901	141	10,7	10Se(VI)
50Se(IV)	1,7	1,4	1,1	89	22,4	5,2	2,3	1,9	4,2	336	65,8	20,5	50Se(IV)
50Se0	0,6	0,3	0,5	6,5	0,7	2,7	1,8	0,6	1,4	51,7	3,9	1,5	50Se0
Enzimes kivonat												[mg/kg]	
szár						levél							
SeMet			Se (VI)			SeMet			Se (VI)				
Betakarítás	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	Betakarítás
10Se(VI)	18,1	14,3	4,8	8,1	6	0,8	71,4	41	24,8	86,8	18,1	2,6	10Se(VI)
50Se(IV)	17,7	12,3	8,5	13	5,2	0,8	56,9	34,9	22,4	30,8	12,9	2,9	50Se(IV)
50Se0	7,1	4,1	11,9	1,1	*nd	nd	20,2	13,1	7,6	5,4	0,6	nd	50Se0

*nem detektált (>LOD)

5.8.2.2 A zöld frakcionált levélfehérje-koncentrátum (LFK), rost és barnalé szelénspeciáció-eredményei

A két legnagyobb mennyiségben talált szelénforma a szervetlen szelenát (SeO_4^{2-}) és a szerves szelenometionin (SeMet) volt minden vizsgált frakcióban (LFK, rost, barnalé) és kivonatban (vizes és enzimes kivonatok). Ez a két forma a leggyakoribb szelén *species* a nem-szelénakkumuláló növényekben, mint a rizs, burgonya, lencse és gabonafélék (Hart *et al.*, 2011; Hariharan & Dharmaraj, 2020). Az elválasztás során találtunk még kisebb csúcsokat, melyeket standardok hiányában nem tudtunk beazonosítani (37. ábra). Ezeknek a minor komponenseknek pontos beazonosítása még folyamatban lévő kutatás tárgyát képezi. Az előzetes eredmények arra mutatnak, hogy közöttük szelenocukrok és szeleno-homocisztein származékok is jelen voltak a lucernamintákban (nem közölt adatok). A lucernához hasonlóan *Faboidae* alcsaládba tartozó veteménybab (*Phaseolus vulgaris* L.) szelénspeciáció vizsgálatok a SeMet és szelenát mellett előforduló minor komponenseket kitisztították és LC-ESI-MS vizsgálattal azonosították a Se-metilszelenocisztein és γ -glutamil-Se-metilszelenocisztein komponenseket (Shao *et al.*, 2014). Feltételezhető, hogy ez a két minor komponens található meg a lucernafrakciók mintáiban is (37. ábra).



37. ábra: A 10Se(VI) kezelés 1. betakarítás LFK-mintájának két kromatogramja. Az első a vizes extrakció, a második az enzimes feltárás eredménye a SeMet és Se(VI) csúcsokkal.

Piros karikák jelzik az azonosítatlan, minor szelén-species-eket.

A SeMet mennyisége 0-246 mg/kg között változott az LFK-ban (11. táblázat). A szelenát legnagyobb mennyiségben az első betakarítás 10Se(VI) kezelt LFK-mintában volt, 451 mg/kg száraztömegre vetítve. A szervetlen szelenátforma mennyisége minden vizsgált mintatípus esetén (LFK, rost, barnalé) követte azt a tendenciát, mely a teljes szeléntartalomnál megfigyelhető.

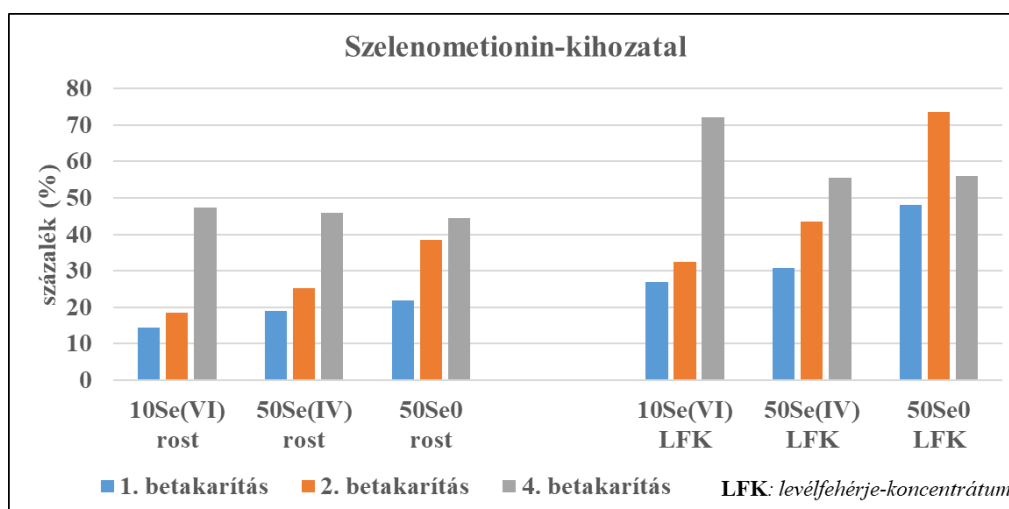
11. táblázat: Módosulatanalitikai vizsgálatok eredményei. Az LFK-, rost- és barnalé-mintákból készült vizes és enzimes kivonatok SeMet- és szelenát-tartalma (Kovács et al., 2023).

<i>Szelenometionin- (SeMet) és szelenát-tartalom Se(VI) levélfehérje-koncentrátum- (LFK), rost- és barnalé-mintákban</i>																			
Betakarítás	LFK [mg/kg]						Rost [mg/kg]						Barnalé [µg/ml]						Betakarítás
	SeMet			Se(VI)			SeMet			Se(VI)			SeMet			Se(VI)			
	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	1.	2.	4.	
Vizes kivonat																			
10Se(VI)	1	nd*	nd	451	181	12	1,9	0,6	nd	237	68	2,6	0,3	0,1	0	111	52	2,5	10Se(VI)
50Se(IV)	nd	nd	nd	241	71	16	0,7	0,7	nd	98	34	3,6	0,1	0	0,2	74	16	5,5	50Se(IV)
50Se0	nd	nd	nd	41	3,9	6,2	nd	nd	nd	17	2,1	1,4	0,1	0	0	12	3,5	2,5	50Se0
Enzimes kivonat																			
10Se(VI)	246	164	38	30	14	0,7	48	27	6,5	29	13	nd	0,1	0,1	nd	3,5	0,7	0,1	10Se(VI)
50Se(IV)	158	128	68	13	4,6	1,9	32	22	15	18	6,9	1,2	0,1	0	0,1	2,4	0,5	0,2	50Se(IV)
50Se0	61	46	36	4,5	nd	nd	7,5	7,4	9	1,6	nd	nd	nd	nd	0,1	0,2	0,3	0,5	50Se0

* nem detektált (<LOD)

A SeMet aránya fontos információ, mivel a dúsítással (*fortification*) célunk, hogy szervesszelénben-gazdag, hozzáadott értékű termékjelölteket tudjunk előállítani lucernából. A

SeMet mennyisége az enzimatikusan feltárt mintákban minden vizsgált esetben több, mely arra utal, hogy a szerves SeMet-forma proteinekbe beépülve található a lucerna-frakciókban. A nagy fehérjetartalmú LFK és kisebb rostminták SeMet-tartalmát vizsgálva fordított arányt találtunk a SeMet megoszlásában. Bár a 4. betakarításra a teljes szeléntartalom, és a szelenátforma mennyisége is lecsökkent a vizsgált mintákban, különösen az ionos formájú kezeléseknél (10Se(VI), 50Se(IV)), ugyanakkor a SeMet aránya növekedést mutatott. Az első betakarításkor a minta szeléntartalmának 18%-a volt SeMet a rostban és 35%-a az LFK-ban. A negyedik betakarításkor ez 45%-ra emelkedett a rostban és 60-70%-ra az LFK-ban (38. ábra).



38. ábra: SeMet-kihozatal a teljes szeléntartalom százalékában. A két, szelén- és SeMet-tartalom szempontjából releváns rost- és LFK-frakciókban az első, második és negyedik betakarítás során.

Az USA Mezőgazdasági Minisztérium (*United States Department of Agriculture (USDA)*) csoportosítása szerint a lucerna fakultatív szelénakkumuláló kultúrnövény, vagyis képes 50 mg/kg koncentrációban feldúsítani a szelént szöveteiben (*USDA ARS, 2018*). A 10Se(VI) és 50Se(IV) kezelések mintáinak szeléntartalma jóval magasabb, mint 50 mg/kg az első betakarítás idején. Ez, illetve a csökkent nyersfehérje- és alacsony biomassza-mennyiség együttesen magyarázhatja az alacsony SeMet-arányt az első betakarításkor. A kísérlet végén (4. betakarítás) ugyanakkor szignifikánsan növekedett ezen minták nyersfehérje-tartalma továbbá nőtt a SeMet mennyisége a szeléntartalmon belül (11. táblázat). A SeMet biológiai hozzáférhetősége és hasznosulása jobb, mint az inorganikus formáké, ebből kifolyólag előnyösebb a dúsított lucernában és frakcióiban emelni a SeMet arányát a szeléntartalmon belül. Eredményeink arra is rámutatnak, hogy nagy dózisu kezeléssel nem növelhető arányosan a

beépült SeMet mennyisége, ahogy az az első és negyedik betakarítás összehasonlításából látható.

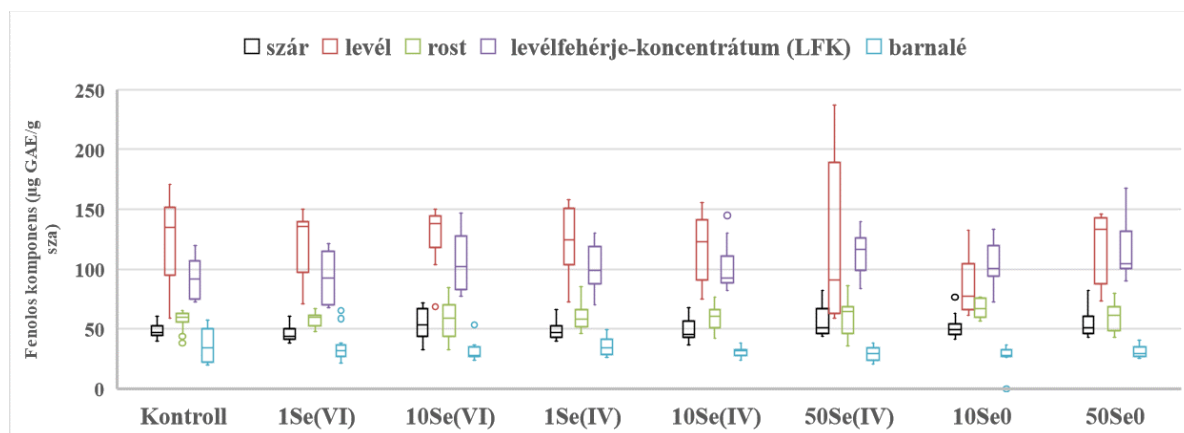
Az 50Se0 kezelés teljes szeléntartalom eredményeit tekintve kisebb ingadozást mutató szeléntartalmat sikerült elérni a 4 betakarítás alatt, mint az ionos formákkal való kezelés esetén. Habár a SeMet mennyisége (36-61 mg/kg az LFK-ban) és a szeléntartalom kisebb értékeket mutatott, a növénytermesztés szempontjából az állandó minőségű és mennyiségű biomassza stabil szeléntartalommal előnyösebb tulajdonság, kifejezetten egy olyan többször betakarított évelő kultúra esetén, mint a lucerna.

Hu és munkatársai (2022) megfigyelték a lucernalevelekre kijuttatott szelenit szállítószöveketbe való bejutását, beépülését szerves SeMet-formává, illetve a volatilis DMSe kiválasztását a gázcsereenyílásokon. Ebben a kísérletben a talajból felvett szelén hosszútávú beépülését vizsgáltuk, és a leggyakoribb formák a szelenát és a SeMet voltak. A kísérleti beállítások nem tették lehetővé a gáz fázisú szelénformák mérését a talaj-növény rendszerben, azonban az illékony formák képződését meg tudjuk erősíteni, mivel a DMSe, DMDSe és más gáznemű formák jellegzetes szaga érezhető volt a növénytermesztés során. Terry és munkatársai (2000) munkájukban a szervetlen szelenát, szelenit és szerves SeMet, SeCys felvételét vizsgálták hidrokultúrák termesztésben mustárnövénnel. Eredményeik szerint a felvett SeMet-t ötször nagyobb mértékben alakította DMSe-dé a növény, mint a szelenát és szelenit esetében. A talajmikroorganizmusok tevékenysége révén jelentős az elemi szelén, szelenát és szelenit volatilis, metilált formákká alakulása, kifejezetten nagy szervesanyag-tartalom mellett (Doran & Alexander, 1977; Eswayah et al., 2016). Sztrik (2016) elemi nanoszelénnel végzett kísérletében 8 héttel a kezelés után a talajhoz adott szelén mennyiségének 80 %-a volt már csak visszamérhető, a többi volatilis formában elpárolgott a talaj mikrobiológiai aktivitásának következtében.

5.9 Fitonutriensek és fenolos komponensek szeléndúsított lucerna-frakciókban

A tenyészedényes kísérlet szár-, levél-, LFK-, rost- és barnalé-mintáiból fitokémiai méréseket végeztünk. A fenolos komponensek analízisét Folin-Ciocalteu-módszer alapján spektrofotometriásan határoztuk meg. A kapott eredmények alapján nem tudtunk különbségeket vagy tendenciát kimutatni a szelénkezelések hatására, továbbá a betakarítási időpontokat mintatípuson belül vizsgálva sem sikerült jellegzetes eltéréseket feltárni. A 39. ábra foglalja össze a fenolos komponens mérések eredményét minden kezelés és minden betakarítás esetén. A lucernaszárban (51 µg GAE/g) és -levélben (118 µg GAE/g) jellemzően nagyobb volt

az összes fenolos komponensek mennyisége, mint a frakcionált termékekben. Az LFK átlagosan 130 μg GAE/g, a rost 59 μg GAE/g, a barnalé pedig 32 μg GAE/ml fenolos komponenst tartalmazott.



39. ábra: Lucernaszár, -levél és zöld biomasszafrakciók (rost, LFK, barnalé) vízzeloldható összes fenolos komponens tartalma a 4 vizsgált betakarítás során, dobozábrán szemléltetve. A dobozok az értékek interkvartilis terjedelmét mutatják, a vonal a mediánt jelzi. A felső és alsó bajusz végpontja a maximum és minimum értékeket mutatja.

A karikák kiugró értékeket jelölnek.

Irodalmi források szerint a lucerna LFK fenolos komponens tartalma 37 mg GAE/g (Karimi et al., 2013; Rafińska et al., 2017), mely nagyobb érték azonban eltérő kivonással (80% metanol) elért eredmény.

5.9.1 Kvalitatív vizsgálatok, a lucernafrakciók fitonutriens-profiljának megállapítása

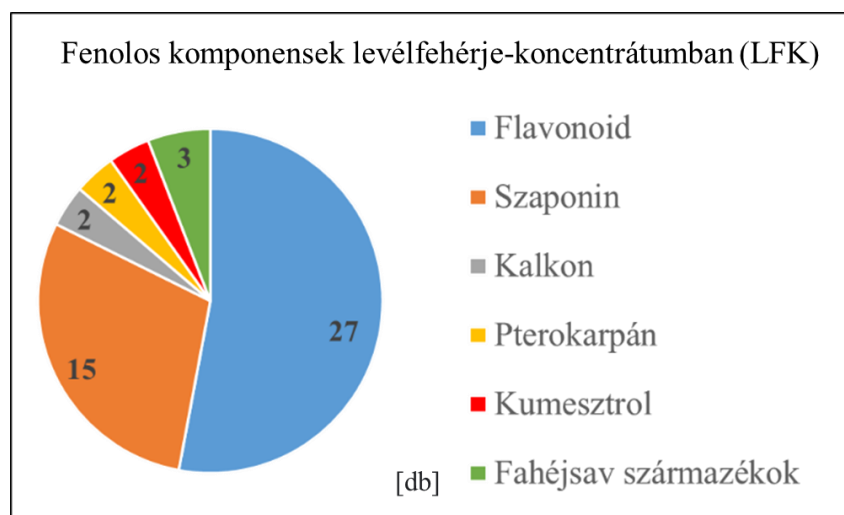
A fitonutriensek jelentősége takarmányozás és táplálkozás szempontjából is ismert ezért kvalitatív vizsgálatukhoz metanolos-vizes (70:30) kivantokat készítettünk a tenyészedényes kísérletből származó lucerna LFK-, rost- és barnalé-frakciókból. Az LC-MS vizsgálatok során nem találtunk lényeges különbségeket a szeléndúsított és kontroll minták között. A szelénkezelést nem kapott, kontroll LFK-, rost- és barnalé-frakciók kvalitatív eredményeit a 12. táblázat tartalmazza. 83 különböző vegyületet sikerült azonosítanunk, melyek mindegyik LFK-mintában előfordultak (40. ábra).

12. táblázat: Azonosított flavonoidok, szaponinok és származékaik a szeléndúsított lucerna zöld biomasszából származó LFK-, rost- és barnalé-frakciókban (Kovács *et al.*, 2023).

Flavonoid	összegképlet	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	LFK	rost	barnalé
Flavanonok						
4'.5.7-Trihidroxiflavanon (Naringenin)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅		271,06	+	+	+
4'.5.7- Trihidroxiflavanon 6.8-C-glikozid	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅		595,17	+	-	+
4'.7-Dihidroxiflavanon	C ₁₅ H ₁₂ O ₄		255,07	+	+	+
Flanonok						
Kvercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇		301,04	+	+	+
Kvercetin-3.4'-di-O-glikozid	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇		625,14	-	-	+
Kvercetin-3-O-glikozid	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂		463,09	+	+	+
Flavonok						
Apigenin-4'-O-glükuronid -7-O-[glükuronil-(1→2)-glükuronid]	C ₃₃ H ₃₄ O ₂₃		797,14	+	+	+
Apigenin-O-glikozid-O-glükuronid	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆		607,13	+	+	+
Apigenin-7-O-[feruloil-(→2)-[glükuronil-(1→3)]-glükuronil-(1→2)]glükuronid	C ₄₃ H ₄₂ O ₂₆		973,19	+	+	+
Apigenin-4'-O-glükuronid-7-O-[feruloil-(→2)-glükuronil-(1→2)-glükuronid]	C ₄₃ H ₄₂ O ₂₆		973,19	+	+	+
Apigenin-7-O-glükuronid	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₁		445,08	+	+	+
Apigenin (4'.5.7-Trihidroxiflavan)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		269,05	+	+	+
Krizeorol-4'.7-di-O-glükuronid	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₈		651,12	-	+	+
Krizeorol-7-O-glükuronid	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂		475,09	+	+	+
Krizeorol (3'-Metoxi-4'.5.7-trihidroxiflavan)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆		299,06	+	+	+
Krizeorol-glükuronil-glükuronid	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₈		651,12	+	-	+
Genkwanin (4'.5-Dihidrox-7-metoxiflavan)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285,076		+	+	+
Luteolin-di-O-glükuronid	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₈		637,1	-	+	+
Luteolin-4'-O-glükuronid-7-O-[feruloil-(→2)-glükuronil-(1→2)glükuronid]	C ₄₃ H ₄₂ O ₂₇		989,18	-	-	+
Luteolin-7-O-glükuronid	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂		461,07	+	+	+
Luteolin (3'.4'.5.7-Tetrahidroxiflavan)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆		285,04	+	+	+
Tricin-7-O-glükuronid	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃		505,1	+	+	+
Tricin-7-O-[feruloil-(→2)-glükuronil-(1→2)-glükuronid]	C ₃₉ H ₃₈ O ₂₂		857,18	+	+	+
Tricin (3'.5'-Dimetoxi-4'.5.7-trihidroxiflavan)	C ₁₇ H ₁₄ O ₇		329,07	+	+	+
Tricin-O-hexozid	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	493,134		+	-	+
4'.7-Dihidroxiflavan	C ₁₅ H ₁₀ O ₄		253,05	+	+	+
Metoxi-tetrahidroxiflavan	C ₁₆ H ₁₂ O ₇		315,05	+	+	+
Dimetoxi-hidroxiflavan	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	299,091		+	+	-
Metoxi-trihidroxiflavan	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	303,086		-	+	-
3'-Metoxi-4'.5.5'.7-tetrahidroxiflavan-7-O-glükuronid	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃		491,08	+	+	+
Apigenin-8-C-glikozid-6-C-xilozid	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565,155		+	-	-
Apigenin-6-C- glikozid -8-C-xilozid	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565,155		+	-	-
Izoflavonok						
Alfalone (4'.7-Dimetoxi-6-hidroxiizoflavan)	C ₁₇ H ₁₄ O ₅		297,08	+	+	+
Formononetin (7-Hidrox-4'-metoxiizoflavan)	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269,081		+	+	+
Ononin (Formononetin 7-O-glikozid)	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431,134		+	-	+
Biochanin A (4'-Metilgenisztein)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285,051		+	+	+
Kalkonok						
Izolikviritigenin (2'.4.4'-trihidroxikalkon)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄		255,07	+	+	+
Szaponinok						
Medikagén sav	C ₃₀ H ₄₆ O ₆		501,32	+	+	+
Medikagén sav 28-O-[xilozil-(1→4)-rhamnozil-(1→2)-arabinozil]észter	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₈		911,46	+	+	+
Medikozid H (Medikagén sav 3-O-glikozil-28-O-[rhamnozil-(1→2)-arabinozil]észter)	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉		941,47	+	+	+
Medikozid G (Medikagén sav 3,28-di-O-glikozid)	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₆		825,43	+	+	+
Medikagén sav 3-O-glükuronid-28-O-[xilozil-(1→4)-rhamnozil-(1→2)-arabinozil] észter	C ₅₂ H ₈₀ O ₂₄		1087,5	+	+	+
Medikagén sav rhamnozil-pentozil-glükuronid	C ₄₇ H ₇₂ O ₂₀		955,45	+	+	+
Medikozid J (Medikagén sav 3-O-glikozil-28-O-[xilozil-(1→4)-rhamnozil-(1→2)-arabinozil] észter)	C ₅₂ H ₈₂ O ₂₃		1073,52	+	+	+
Medikagén sav 3-O-[galaktozil-(1→2)-glikozid]-28-O-glikozil észter	C ₄₈ H ₇₆ O ₂₁		987,48	-	-	+
Medikozid E vagy izomer	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₃		1103,56	-	-	+
Szójaszaponenol B rhamnozil-hexozil-glükuronid	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈		941,51	+	-	-
Szójaszaponenol B rhamnozil-pentozil-glükuronid	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇		911,5	+	-	-
Azukiszaponin II	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄		795,45	+	+	+
Ismeretlen szaponinok						
ismeretlen szaponin. aglikon: 456.32396 (C ₂₉ H ₄₄ O ₄)	C ₅₈ H ₉₂ O ₂₉		1251,57	-	+	+
ismeretlen szaponin. aglikon: 502.32944 (C ₃₀ H ₄₆ O ₆)	C ₅₂ H ₈₀ O ₂₄		1087,5	-	+	-
ismeretlen szaponin. aglikon: 440.32905 (C ₂₉ H ₄₄ O ₃)	C ₅₈ H ₉₂ O ₂₈		1235,57	+	+	+
ismeretlen szaponin. aglikon: 458.37600 (C ₃₀ H ₅₀ O ₃)	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇		911,5	-	+	-
ismeretlen szaponin. aglikon: 504.34509 (C ₃₀ H ₄₈ O ₆)	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₆		811,41	+	-	+
ismeretlen szaponin. aglikon: 486.33452 (C ₂₉ H ₄₂ O ₃)	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆		823,41	+	+	+
ismeretlen szaponin. aglikon: 454.34470 (C ₃₀ H ₄₆ O ₃)	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉		941,48	+	-	-

Összességében a fitokémiai komponensek profilja a vizsgált frakcióban hasonló volt. Az irodalmi forrásokkal összhangban (Stochmal *et al.*, 2001a; Stochmal *et al.*, 2001b), a fenolos komponensek közül a flavonoidok voltak a legnagyobb mennyiségben jelenlévő anyagok valamennyi hidroalkoholos extraktumban (11. táblázat és 40. ábra). A 37 azonosított flavonoidból aglikonokat és glikozil-származékokat találtunk flavanon, flavonol, flavon, flavon, izoflavon és kalkon alapvázakkal. A flavonoidok közül a flavonok voltak a leggyakoribb csoport, beleértve számos hidroxiflavont és glikozilszármazékot. A legjellemzőbb alapvázak az apigenin, tricín, krizoeriol voltak. A flavonoidok cukorlánc nem kizárólag glükuronsav volt, az apigeninben, a naringeninben és a kvercetinben glükózt és xilózt is azonosítottunk. Például a viciénin-1 (apigenin-8-C-glükozid-6-C-xilozid) $[M+H]^+$ ion az m/z 565,15574-en és a viciénin-3 (apigenin-6-C-glükozid-8-C-xilozid) $[M+H]^+$ ion az m/z 565,15574-en), mint minor komponenseket mutattuk ki az LFK-frakcióban. A másik nagy csoport a szaponinok voltak, melyek közül számos ismeretlen alapvázú vegyület került elő, de találtunk medikozid, medikagénsav, azukiszaponin és szójaszaponinol alapvázú vegyületeket is, melyek korábban azonosításra kerültek (Rafińska *et al.*, 2017). Két szójaszaponinol B származékot csak az LFK-frakcióban detektáltunk, valamint több ismeretlen szaponin aglikont, amelyek egy vagy több frakcióban voltak kimutathatók (11. táblázat).

A pterokarpánok közül a medicarpin (3-hidroxi-9-metoxi-metoxi-terokarpan) $[M+H]^+$ ion m/z 271,09704) és a metilnissolin (3-hidroxi-9,10-dimetoxi-terokarpan) $[M+H]^+$ ion m/z 301,1076) valamennyi lucernafrakcióban detektálható volt.



40. ábra: Azonosított fitonutriensek száma vegyületcsoportokra bontva a levélfehérje-koncentrátum-mintákban (LFK).

5.9.2 Kvantitatív fitonutriens-vizsgálatok eredményei

A kvalitatív vizsgálati eredmények alapján, hozzáférhető standardok ismeretében, néhány pozitív vagy negatív élettani szereppel bíró fitokomponens mennyiségét is meghatároztuk frakciónként a szelénkezelések függvényében. A hidroalkoholos kivonatok kvantitatív elemzése alapján az apigenin glükuronid és az apigenin (4'.5.7-trihidroxiflavon) aglikonok voltak a legnagyobb mennyiségben előforduló flavonoidok a négy betakarításon belül (12. táblázat). A rost frakcióban volt a legnagyobb az apigenin-7-O-glükuronid koncentrációja, 90,82-170,85 µg/g között, míg az LFK-ban és a barnalében 33,31-68,10 µg/g és 376,13-1098,88 ng/ml közötti volt (12. táblázat). Az apigenin volt a második legnagyobb mennyiségben előforduló flavonoid a mennyiségi meghatározásra kiválasztott flavonoidok közül, 7,97-72,93 µg/g közötti értékekkel. Az apigenin-7-O-glükuroniddal ellentétben az apigenin az LFK- és a rostfrakciókban szűk, 13-24 µg/g tartomány között változott, kivéve a 4. betakarításkor, amikor a rostfrakcióban átlagosan 67 µg/g mennyiséget mértünk, függetlenül a Se-kezeléstől.

A Se-kezelés formája és koncentrációja hatást gyakorolt az apigenin (4'.5.7-trihidroxiflavon) és az apigenin-7-O-glükuronid tartalomra a vizsgált frakciókban. Mindkét flavon koncentrációja emelkedett a Se(IV) és Se(VI) kezeléseknél, különösen az 1. betakarítás alkalmával, míg a vörös elemi szelén (Se(0)) koncentrációtól függetlenül kisebb értékeket mutatott a kontrollhoz képest (13. táblázat). Az apigenin és származékai gyakori másodlagos anyagcseretermékek a növényekben, gyulladásgátló, antioxidáns és kemopreventív hatásuk ismert (*Shukla et al.*, 2019), ugyanakkor a természetesen előforduló apigenin biológiai hozzáférhetősége alacsony (*Sirotkin & Kolesarova*, 2022).

A többi hidroxiflavon, a luteolin (3'.4'.5.7-tetrahidroxiflavon) és származékai, illetve luteolin-7-O-glükuronid, luteolin-di-O-glükuronid, luteolin-4'-O-glükuronid-7-O-[feruloil(1→2)-glükuronil(1→2)-glükuronid] a barnalében detektálhatóak voltak; ugyanakkor néhányuk hiányzott a rost- és LFK-frakciókból. A luteolin aglikon koncentrációja minden lucerna-frakcióban jelentősen kisebb volt (0,71 - 5,10 µg/g), mint az apigeniné (13. táblázat). A luteolin koncentrációja a rostfrakcióban nem haladta meg a 2,25 µg/g-ot, míg az LFK-frakcióban 20-30%-os növekedést mutatott a rosthöz képest. A luteolin koncentráció a négy egymást követő betakarítás során összefüggést mutatott az alkalmazott Se-koncentrációval, valamint az alkalmazott Se-formával. A luteolin előnyös hatásai ismertek, humán vonatkozásban rákmegelőző, gyulladáscsökkentő, neuroprotektív hatása igazolt (*Shukla et al.*, 2019). A hidroxiflavonok mellett metoxi-hidroxiflavonokat is kvantifikáltunk a kivonatokban. A tricín

(3',5'-Dimetoxi-4',5,7-trihidroxi-flavon) átlagosan 14,5 µg/g koncentrációban volt jelen az LFK- és a rostmintákban és ~160 ng/ml koncentrációban a barnalében. A tricín esetében nem találtunk összefüggést a szelénkezeléssel. Az azonosított fitokémiai anyagok közül számos más flavonoidot is kvantifikáltunk. Függetlenül az alkalmazott Se-kezeléstől és a betakarítási időponttól, a kvercetin, az izokvercitrin, a naringenin, a likviritigenin és a genkwanin nyomokban voltak kimutathatóak, kevesebb mint 10,00 µg/g-tól (az LFK és a rost esetében átlagosan) 14 µg/g értékig, a barnalében 86 ng/ml koncentrációban átlagosan (13. táblázat). Az LFK- és a rostfrakciók a kis koncentrációjú flavonoidok mennyisége közel azonos volt (13. táblázat).

13. táblázat: Nagyobb mennyiségben (átlagosan 100 µg/g koncentrációban) előforduló flavonoid komponensek. A rost- és LFK-mintákban µg/g-ban, a barnalében ng/ml-ben kifejezve.

	Apigenin			Major-komponensek Apigenin-7-O-glükuronid			Luteolin		
	LFK [µg/g]	rost [µg/g]	barnalé [ng/ml]	LFK [µg/g]	rost [µg/g]	barnalé [ng/ml]	LFK [µg/g]	rost [µg/g]	barnalé [ng/ml]
1. betakarítás									
Kontroll	11,6	16,6	67,9	58,3	144,1	872,2	1,5	0,8	8,9
1Se(VI)	12	30,4	132,5	63,7	163,4	513,5	2,5	0,7	12
10Se(VI)	11,1	28,8	125,2	68,1	170,9	1098,9	2,9	2,5	64,8
1Se(IV)	17,1	26	68,8	55,4	137,5	584,3	2,1	0,9	9,5
10Se(IV)	15,9	22,6	96,1	57,3	128,4	490,3	2,1	1,4	11,6
50Se(IV)	19,9	19,4	97,5	57	127,4	916,3	3	1,2	50,4
10Se0	15,5	18,2	63,2	33,3	117,6	405,3	2,3	1	10,6
50Se0	8	15,4	64,2	53,1	128,1	651,2	1,6	0,9	19,1
2. betakarítás									
Kontroll	25	25,1	172,2	47,6	126,8	429,1	2,5	0,7	22,3
1Se(VI)	27,2	26,4	151,1	45,9	130	644,9	3,1	0,9	19
10Se(VI)	20,7	17,6	102,1	55,6	100	416,2	3,4	1,8	29,4
1Se(IV)	23,6	27,1	110,8	44,9	141,3	541,9	2,8	1,1	15,5
10Se(IV)	18,8	21,4	97,5	40,3	125,9	547,8	2,4	0,9	13
50Se(IV)	19,5	27,9	164,9	39,6	123,2	425,1	3,3	2	26,2
10Se0	18,1	25,3	134,2	40,5	134,7	563,5	3,5	0,8	26,6
50Se0	33,9	24,1	144,2	58,3	119,2	341,7	5,1	1,3	25,6
3. betakarítás									
Kontroll	24	19,4	60,6	61,1	99,9	379,6	0,8	0,5	2,9
1Se(VI)	17,7	22,2	49,8	50,4	106,2	440,3	1,4	0,8	3
10Se(VI)	33,9	23,9	52,6	67,3	99,1	264,4	1,2	0,5	3,4
1Se(IV)	17,9	22	36,1	56,2	121,7	444,4	0,8	0,6	2,6
10Se(IV)	21	24,3	57,7	54,4	122,1	463,9	1,4	0,7	3,6
50Se(IV)	17	22,7	39,4	39,3	92,9	290,1	1,6	0,8	4,8
10Se0	16	23,6	32,6	42,3	110,4	376,1	1,7	0,7	2,9
50Se0	15,6	18,9	44,5	66,5	130,8	254,6	1,4	0,5	5
4. betakarítás									
Kontroll	18,8	60,8	62,3	58,5	101,9	472,2	2,3	1,3	24,5
1Se(VI)	26	84,6	80,9	61,1	109,3	575,1	3,2	1,2	10
10Se(VI)	17,6	64,7	66,5	46,3	126	673	2,3	1,2	327
1Se(IV)	15	72,9	75,5	47,3	119,3	488,5	2,8	3,2	12,8
10Se(IV)	14,7	71	55,1	49,3	122,6	491,6	2,6	2,6	10,7
50Se(IV)	17,5	55,9	138,3	52,4	162,2	804,6	1,9	1,1	52,8
10Se0	11,9	64,2	125,3	59,9	133,3	427,2	1,9	2	34,6
50Se0	16,2	67,9	62,3	62,2	160,5	634,9	2	1,9	36,9
	LFK	rost	barnalé	LFK	rost	barnalé	LFK	rost	barnalé
	Apigenin			Apigenin-7-O-glükuronid			Luteolin		

Az izoflavonok közül négy vegyületet azonosítottunk (14. táblázat), melyek közül a formononetin (7-hidroxi-4'-metoxi-izoflavon) koncentrációja 0,34-8,39 µg/g között változott az LFK- és a rostfrakciókban és 3,16-80,04 ng/ml között a barnalében (15. táblázat). Az 1 mg/kg Se(IV) és a 10 mg/kg vörös elemi Se0 kezelés a kontrollhoz hasonló formononetin tartalmat mutatott. Ezzel szemben a Se(VI), Se(IV) és a vörös elemi Se0 magas koncentrációjú kezelése kisebb formononetin-tartalmat eredményezett a három frakción belül. A másik izoflavon, a biochanin A (4'-Methylgenistein) kisebb, 0,11-0,63 µg/g közötti koncentrációban volt az LFK-ban és a rostban, illetve 0,35-3,88 ng/ml mennyiségben a barnalében. Az LFK-hoz hasonló minőségű *lucerne leaf extract* (EFL) esetében az izoflavonok teljes mennyiségét egy nagyságrenddel nagyobbak írták le, ≤350 mg/kg (Gawel, 2012).

14. táblázat: Kisebb koncentrációjú, minor fitonutriens vegyületek az LFK-, rost- és barnalé-mintákban. A rost- és LFK-mintákban µg/g-ban, a barnalében ng/ml-ben kifejezve.

	Minor-komponensek											
	Kvercetin			Izokvercetin			Naringenin			Izolikviritigenin		
	LFK [µg/g]	rost [µg/g]	barnalé [ng/ml]	LFK [µg/g]	rost [µg/g]	barnalé [ng/ml]	LFK [µg/g]	rost [µg/g]	barnalé [ng/ml]	LFK [µg/g]	rost [µg/g]	barnalé [ng/ml]
1. betakarítás												
Kontroll	0,63	0,57	0,94	0,92	0,82	0,83	0,51	0,33	0,8	0,34	0,32	4,38
1Se(VI)	0,36	0,48	0,91	0,29	0,84	0,05	0,44	0,36	2,57	0,36	0,21	1,44
10Se(VI)	0,54	0,62	0,84	0,9	0,74	0,74	0,52	0,75	5,67	0,88	1,71	14,86
1Se(IV)	<0,1	0,42	0,87	0,21	0,84	0,21	0,5	0,37	1,58	0,32	0,29	0,7
10Se(IV)	0,13	0,59	<0,1	0,28	0,12	0,13	0,42	0,32	1,58	0,21	0,12	0,6
50Se(IV)	0,54	0,44	0,82	0,88	0,89	0,75	0,58	0,33	2,91	0,42	0,63	6,82
10Se0	<0,1	0,47	0,89	0,2	0,8	<0,1	0,51	0,39	1,95	0,3	0,18	1,16
50Se0	0,43	0,6	0,88	0,84	0,82	0,86	0,34	0,32	1,21	0,23	0,34	3,41
2. betakarítás												
Kontroll	0,18	0,1	1,4	0,56	0,13	2,41	0,97	0,55	5,3	0,33	0,34	3,86
1Se(VI)	0,12	<0,1	0,4	0,37	0,19	0,23	0,56	0,34	3,34	0,24	0,14	0,92
10Se(VI)	0,14	0,11	0,96	0,42	0,25	2,67	0,62	0,42	4,72	0,32	0,37	3,6
1Se(IV)	0,13	<0,1	0,25	0,31	0,12	0,05	0,58	0,4	3,51	0,22	0,12	0,87
10Se(IV)	0,12	<0,1	<0,1	0,3	0,2	0,08	0,52	0,33	1,69	0,2	0,14	0,43
50Se(IV)	0,13	0,12	1,32	0,41	0,21	1,42	0,54	0,42	n.d	0,24	0,21	n.d
10Se0	0,1	<0,1	0,13	0,35	0,14	0,13	0,6	0,41	2,31	0,21	0,13	1,31
50Se0	0,14	0,1	1,16	0,4	0,14	2,29	0,82	0,43	4,86	0,28	0,36	3,41
3. betakarítás												
Kontroll	0,12	<0,1	2,26	0,33	0,11	1,82	0,97	0,28	4,19	0,39	0,25	3,66
1Se(VI)	0,12	0,11	0,17	0,66	0,13	0,14	0,54	0,31	1,2	0,18	0,21	3,66
10Se(VI)	0,14	0,13	0,95	0,14	0,12	1,15	0,61	0,33	2,89	0,32	0,2	3,05
1Se(IV)	<0,1	<0,1	<0,1	0,52	0,23	0,17	0,58	0,39	0,54	0,22	0,2	3,67
10Se(IV)	0,11	<0,1	0,11	0,68	0,13	0,11	0,59	0,32	1,46	0,19	0,36	3,53
50Se(IV)	0,13	0,14	0,94	0,26	0,1	1,63	0,5	0,29	2,49	0,3	0,31	2,85
10Se0	<0,1	0,14	0,9	0,4	0,12	0,11	0,54	0,29	0,6	0,23	0,31	3,63
50Se0	0,11	0,12	1,89	0,32	0,11	0,81	0,44	0,27	3,48	0,32	0,3	2,88
4. betakarítás												
Kontroll	0,31	0,53	1,97	0,71	0,84	1,46	0,66	1,14	4,37	0,3	0,45	5,74
1Se(VI)	<0,1	0,52	1,12	0,89	0,12	0,37	0,81	1,05	2,28	0,22	0,32	5,15
10Se(VI)	0,74	0,53	1,14	1,1	0,87	7,03	0,68	1,04	2,58	0,25	0,48	5,49
1Se(IV)	<0,1	0,52	2,46	1,56	0,14	0,66	0,83	1,01	5,61	0,23	0,35	2,43
10Se(IV)	0,18	0,48	2,93	1,44	0,12	0,63	0,8	0,97	3,75	0,25	0,47	1,83
50Se(IV)	0,42	0,43	0,94	0,83	0,9	0,94	0,54	0,92	10	0,31	0,42	5,75
10Se0	<0,1	0,54	0,33	0,93	0,88	0,7	0,43	0,82	3,5	0,21	0,39	5,49
50Se0	0,48	0,51	5,54	0,83	0,92	0,92	0,42	0,71	3,68	0,22	0,33	5,13
	LFK	rost	barnalé	LFK	rost	barnalé	LFK	rost	barnalé	LFK	rost	barnalé
	Kvercetin			Izokvercetin			Naringenin			Izolikviritigenin		

A Se-kezeléstől függetlenül a medikagénsav és annak rövid vagy hosszú mono-, bi- vagy tridezmozid cukorláncokkal alkotott kombinációi voltak a legnagyobb számban előforduló

szaponinok valamennyi lucernafrakcióban (15. táblázat). Közülük standardok korlátozott hozzáférhetősége miatt kvantitatívan csak a medikagénsavat tudtuk vizsgálni. A medikagénsav koncentrációja 0,11-1,86 µg/g között mozgott az LFK- és a rostfrakciókban és 0,72-32,72 ng/ml között a barnalében a lucerna négy egymást követő betakarítása során. A 10 mg/kg Se(IV), 50 mg/kg Se(VI) és 50 mg/kg vörös Se0 kezelés hatására megnőtt a medikagénsav koncentrációja az LFK-ban, a rost és a barnalében, különösen az 1. betakarítás során (15. táblázat). Mindazonáltal a következő betakarítások alkalmával a medikagénsav koncentrációja nem függött egyértelműen a Se-kezeléstől. A medikagénsav alapvázú glikozidok gyakoriak a lucernában és táplálkozási, takarmányozási (különösen kérődzők esetében) szempontból antinutritív hatású vegyületek habzó, antimikorbiális, hemolizáló, torokirritáló és a bélfal felszívóképességét befolyásoló hatásuk miatt (Szumacher-Strabel *et al.*, 2019). Lucernafajták között nagy különbségek mutatkoznak a hajtás szaponin- és medikagénsav-tartalma között, a hajtás átlagosan 79,5±55,4 µg/g medikagénsavat tartalmazhat (Pérez *et al.*, 1997), azonban az általunk vizsgált termékek, LFK, rost és barnalé ennél alacsonyabb mennyiségben tartalmazták az alapvázat (15. táblázat).

15. táblázat: Medikagénsav- és formononetin-tartalom az LFK-, rost- és barnalé-mintákban a 4 betakarítás során. A rost- és LFK-mintákban µg/g-ban, a barnalében ng/ml-ben kifejezve.

	LFK [µg/g]				rost [µg/g]				barnalé [ng/ml]			
	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.
Medikagénsav												
Kontroll	0,54	1,26	0,93	1,28	0,33	0,33	0,12	0,44	0,72	13,95	5,10	28,53
1Se(VI)	0,31	0,68	0,77	1,10	0,10	0,17	0,12	0,22	6,64	13,56	7,62	15,23
10Se(VI)	1,05	0,92	0,24	0,90	0,41	0,30	<0,1	0,34	17,51	11,21	1,68	15,95
1Se(IV)	0,60	0,73	0,61	0,92	0,11	0,21	0,11	0,20	4,64	14,84	2,00	12,72
10Se(IV)	0,62	0,80	1,05	1,86	0,11	0,28	0,22	0,37	6,22	14,92	4,24	12,15
50Se(IV)	1,40	1,11	0,48	0,60	0,39	0,32	0,12	0,31	25,36	17,87	1,88	13,08
10Se0	0,71	0,82	0,83	0,66	0,18	0,24	0,14	0,13	11,45	12,36	3,43	15,24
50Se0	1,06	1,20	0,41	0,98	0,42	0,33	<0,1	0,40	16,30	14,72	1,96	37,72
Formononetin												
Kontroll	2,49	2,05	8,36	3,13	1,90	2,91	2,89	2,95	24,81	17,16	56,47	30,39
1Se(VI)	1,11	0,74	4,12	3,13	1,51	1,33	1,67	3,01	24,38	13,95	52,87	28,54
10Se(VI)	1,61	0,44	2,82	1,70	1,38	0,84	0,78	1,98	14,68	3,16	9,20	20,75
1Se(IV)	1,46	1,06	6,20	3,71	1,54	2,27	2,50	3,45	23,83	26,55	33,93	60,36
10Se(IV)	0,82	0,53	2,77	3,36	1,42	1,11	2,62	3,99	22,16	10,62	19,39	54,53
50Se(IV)	1,04	0,34	1,34	1,49	0,80	0,43	1,21	2,12	16,30	2,61	4,12	26,00
10Se0	1,57	0,80	5,40	2,59	1,58	1,16	1,85	3,42	30,45	19,77	29,38	80,04
50Se0	0,80	0,58	1,70	1,08	0,90	0,57	1,55	1,41	13,00	6,27	8,78	23,63
	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.
	LFK [µg/g]				rost [µg/g]				barnalé [ng/ml]			

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Az agronómiai szeléndúsítási (*fortification*) kísérletek során jellemzően olyan mezőgazdasági haszonnövényeket (gabonaféléket, zöldségeket, gyümölcsöket) vizsgálnak, melyeket a szelén kijuttatása és beépülése után egyszer lehetséges betakarítani, a következő termés dúsítása újabb kezelést igényel. Kutatásunkban olyan évelő, többször betakarítható növénykultúrát választottunk, melyet egy alkalommal, a termesztési szezon elején kezeltünk szelénnel és több betakarítás során vizsgáltuk a felvétel dinamikáját és a szelén megoszlását a növényi termékekben. A lucerna (*Medicago sativa* L.), mint a kísérletbe vont növény, kidolgozott, optimalizált zöld biofinomítási rendszerrel rendelkezik, emiatt magasabb feldolgozottsági szintű termékekben, mint a levélfehérje-koncentrátum (LFK), rost és barnalé lehetőségünk nyílt vizsgálni a szelén megoszlását a betakarítások során.

A tenyészedényes kísérletben elsősorban a három vizsgált szervetlen szelénforma, az ionos szelenát (Se(VI)) és szelenit (Se(IV)), illetve a vörös elemi szelén (Se0) allotrópmódosulat felvételét, beépülését tanulmányoztuk, és az alkalmazható, optimális dózis megismerése volt elsődleges célunk. Az alkalmazott koncentrációk közül az 50 mg/kg talaj dózisban kijuttatott szelenát hatására a növények el is pusztultak, emiatt további vizsgálatokat, zöld frakcionálást nem tudtunk végezni ezzel a kezeléssel. Szelenit esetében például agronómiai dúsításhoz talajkezeléssel, az optimális koncentráció 10 mg/kg (*Bai et al.*, 2019). A túl nagy koncentrációk, 50 mg/kg szelenit (Se(IV)), 10 mg/kg szelenát (Se(VI)) és 50 mg/kg vörös elemi szelén (Se0) széles határok között fluktuáló szeléntartalmat okoztak a növényekben. A kezelések után eltérő módon változott a szeléntartalom a 3 vizsgált formánál. A szelenát és szelenit az első betakarításkor mért nagy koncentrációról erősen visszacsökkent a második betakarításra, és csak a negyedik betakarításkor tapasztaltunk enyhe emelkedést, a folyamatos csökkenés ellenére. A vörös elemi szelén esetében nem tapasztaltunk olyan drasztikus változásokat, az értékek szűk határok között változtak. A kísérletek során több lucernarész és feldolgozott termék szeléntartalmát is vizsgáltuk. A zöld leveles szárat, mint a növény hasznosított részét, levél- és szárrészekre választottuk a vizsgálatokhoz. A szelén mennyisége egyértelműen minden koncentrációjú és formájú kezelés esetében a levelekben volt nagyobb, mint a szárakban, ahogyan ez a lucerna fehérjetartalmáról is ismert. Gyakorlati szempontból jelentős azonban, hogy a klasszikus lucerna hasznosítási mód, vagyis a szénakészítés során a többmenetes szárítás, forgatás alatt leperegnek az értékes tápanyagokat és szelént tartalmazó levelek, ezzel rontva a széna minőségét. Az általunk is alkalmazott zöld biofinomítás alaplépéseit követve, a feldolgozott zöldlucerna frakciói, vagyis az LFK, rost és barnalé

szeléntartalma jelentősen eltért egymástól. A zöld növényi fehérjét koncentráló LFK, az eddig ismert pigmentek, fitonutriensek mellett a szeléntartalom jelentős részét is koncentrálna a rosttal és barnalével szemben. Gyakorlati hasznosítás szempontjából jelentős, hogy az így koncentrált fehérje tehát nem csak takarmányfehérje-forrásként értékes, hanem biológiailag kedvezőbb, szervesformájú szelénrel is gazdagítható.

A nyersfehérje-tartalom mérések jelentősége szintén az LFK fehérjeforrásként való alkalmazhatósága szempontjából fontos. Az eredmények tükrében megállapítható, hogy a nagy (10, 50 mg/kg) koncentrációjú szelénkezelések negatív hatást gyakorolnak a termékekre, kifejezetten az LFK fehérjetartalmára. A kutatásunk nem terjedt ki rá, azonban megfigyeléseink szerint a nagy szeléntartalommal rendelkező növényekből a zöld frakcionálás során, a mikrohullámú koagulációt követően gyakran iszapos állagú LFK-t nyertünk, a jellemzően makrokoagulumokból álló, könnyen szűrhető állag helyett. Az összefüggés további vizsgálatokra érdemes, azonban jellemzően az alacsonyabb nyersfehérje-tartalmú mintáknál tapasztaltuk a jelenséget. A rost- és LFK-minták aminosav-tartalmát csak az első és utolsó, negyedik betakarítás alkalmával mértük, mivel a szeléntartalom különbség ezek között a mintavételek között volt a legnagyobb, mégis az aminosavak abszolút mennyiségében nem tapasztaltunk olyan egyértelmű különbségeket, mint a nyersfehérje-tartalomnál tapasztaltak. Valószínűleg a proteinogén aminosavak mennyisége, illetve a belőlük felépülő fehérjék egymáshoz viszonyított aránya nem változott olyan jelentősen, hogy ezekre az értékekre hatást gyakoroljon.

A szelénspeciáció mérések során a talajból aktív módon felvett szerves szelénformák átalakulását vizsgáltuk a zöld, föld feletti részekben, hangsúlyt fektetve a zöld biofinomítás-frakciók minőségi jellemzésére. A barnalében talált, nyomnyi mennyiségű, vélhetően Se-metilszelenocisztein és γ -glutamil-Se-metilszelenocisztein komponensek és szelenocukrok pontos azonosítása további kutatás tárgyát képezi. Azonban a leggyakoribb két szelénforma minden vizsgált frakcióban a szelenát és szelenometionin (SeMet) volt. A szelénrel és vöröses elemi szelénrel kezelt növények esetében is a hajtás leggyakoribb szerves szelénformája a szelenát volt. Ez arra enged következtetni, hogy a formák átalakulása szelenáttá már a talajban bekövetkezett és a növények már szelenátként vették fel a szelént a gyökereken keresztül. Ez a talajminőségtől függő tulajdonság értékes lehet hosszú hatású szelénműtrágyák fejlesztése során. A SeMet, mint értékes szervesforma a fakultatív szeléntűrő és nem-akkumuláló növényekre jellemző *species*. Jó biológiai hozzáférhetősége és alacsony toxicitása révén takarmányozásban előnyös az alkalmazása a szerves szelénrel szemben. A speciációmérés

során a SeMet döntő hányadát a proteáz enzimekkel feltárt mintákban találtuk, vagyis a fehérjékbe beépülve. A szelenát pedig a vizes kivonatokban volt nagyobb arányban. A lucerna-frakciók közül a fehérjetartalommal párhuzamosan az LFK SeMet-tartalma bizonyult a legnagyobbnak. Azonban érdekes eredmény, hogy a nagy koncentrációban kijuttatott szerves szelén nem emeli az értékes SeMet-szintjét a lucernában, helyette a kevésbé előnyös szelenát mennyisége növekszik. A 10Se(VI) LFK-mintákban az első betakarításkor, mikor a szeléntartalom a legnagyobb volt (916 µg/g), a SeMet-aránya kisebb mint 30%, azonban a 4. betakarításkor, bár a szeléntartalom csökkent (52,7 µg/g), a beépült szelén több mint 70%-a volt SeMet. A nagy víztartalmú barnalé szerves szelenát-iont tartalmazott főként, a minimális SeMet a koagulált fehérjétől való elválasztás során visszamaradt szabad aminosavakból ered. A szelenizált barnalé mikorálaga termesztés tápközegéül szolgálhat (Barna et al., 2022).

A fitonutriensek és fenolos komponensek vizsgálata során a lucernára jellemző, ismert, másodlagos anyagcseretermékeket találtunk. Többféle koncentrációban is alkalmazva a szelént a kisebb koncentrációjú kezeléseknél a szakirodalomban ismert *hormesis* hatást nem tudtuk igazolni (Bai et al., 2018). A kvalitatív mérések során a szelénkezelés hatására megjelenő, vagy eltűnő komponenseket kerestünk. 83 különböző szekunder anyagcsere-terméket találtunk a lucerna-frakciókban, melyek közül 27 flavonoid vegyület volt, a második gyakori csoport 15 komponenssel a szaponinok voltak. Egyértelmű változásokat nem tudtunk kimutatni, a szelénkezelés hatására azonban bizonyos komponensek más mennyiségben voltak jelen a három vizsgált frakcióban, az LFK-ban például 20-30 %-kal több volt a luteolin, mint a rostban.

A tenyészedényes kísérleti tapasztalatokra alapozva terjesztettük ki szeléndúsítás-kísérletünket szabadföldi körülmények közé a három, korábban ismertetett szelénforma összehasonlításával. A szabadföldi körülmények között beállított kísérlet során megbízhatóbb, valós adatokat kaptunk a lucerna biomasszahozama és zöld biofinomítással feltárt frakciók kihozatali eredményeire vonatkozóan. A parcellánként betakarítható friss biomassa mennyisége statisztikailag nem maradt el a kezelése hatására a kontroll parcellák biomasszahozamához képest, a három egymás utáni betakarítás során. Az utolsó betakarítás alkalmával a kezelt parcellákon több lucerna termett, mint a kontroll területeken átlagosan (1,2-1,4 kg/m²). Az első betakarítás alkalmával kaptuk azonban a legtöbb biomasszát 2 kg/m² körüli értékkel. Következésképpen a talaj szelénkezelés nem befolyásolja negatívan a betakarítható lucerna mennyiségét, azonban más (pl.: levélpermetezés) kijuttatási módszerekkel szemben sikeresen alkalmazható élő lucernakultúra szelenizálására. A zöld biofinomítás szempontjából a

szabadföldi kísérletben a korábbi, más kísérletből származó eredményekhez hasonló megoszlást kaptunk, vagyis 17 %-ban LFK, 30% rost és 50% barnalé keletkezik 1 kg friss lucerna feldolgozásából. Az eredményekből az is látható, hogy a szelénkezelés nem gyakorol hatást a frakciók mennyiségi megoszlására. A jövőben a barnalé, mint a legnagyobb mennyiségben keletkező frakció hasznosításának feltérképezése javasolható, mivel szelénrel dúsított formában fermentációs táptalajként vagy növénykondicionáló szerként potenciális kutatások tárgyát képezheti. A szelenizált levélfehérje-koncentrátum (LFK) mint takarmányfehérje, a beépülés és hasznosulás vizsgálatára kiterjedő állatkísérletekbe vonható be. Pecoraro és munkatársai szerint (2022) baromfitenyésztés során 1-21 napos korban 0,46 mg és 22-42 napos korban 0,37 mg a fejlődő csirkék szelénszükséglete testsúly kilogrammonként. A Tedej Zrt. és a Debreceni Egyetem konzorciumában 2017-2022 között megvalósult Proteomill projekt keretében, baromfi fehérjetakarmányozással végzett előzetes vizsgálatokban megállapított érték szerint a 6 %-ban lucerna LFK-t tartalmazó takarmánnyal ideális súlygyarapodás volt elérhető. Ez 6,6 g LFK-t jelent naponta a baromfi nevelőtápban. A tenyészedényes kísérlet során az 50Se0 kezelt LFK-k a 2., 3. és 4. betakarítás során átlagosan 62,1 mg/kg szelént tartalmaztak. Az intenzív tenyésztésben, 1-től 21-ik napig, a barofi napi szelénszükséglete 0,46 mg/kg (Pecoraro et al., 2022). Ezekkel az értékekkel kalkulálva 7,4 g LFK szükséges a csirke szelénszükségletének fedezésére az 50Se0 kezelt LFK-ból, vagyis a 6,6 g gyakorlatban ideálisnak bizonyult LFK-t, 50 Se0 dúsított LFK-ra cserélve közel kielégíthető a növendék csirke szelénszükséglete. A kalkulációk alapján megállapítható, hogy a tenyészedényes kísérletben alkalmazott szelén koncentrációk nagynak tekinthetők takarmányozási szempontból. Bár állatfajonként és tartásmód szerint is nagyok a különbségek. A szabadföldi kísérletben alkalmazott kezelések gyakorlati szempontól előnyösebbnek bizonyulnak.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Eredményeink alapján a vörös elemi szelén szol sikeresen alkalmazható a többször újrasarjadó lucerna (*Medicago sativa* L.) szelénnel történő dúsítására.
2. Eredményeink alapján megállapítható, hogy zárt nevelési körülmények között a lucerna (*Medicago sativa* L.) zöld biofinomítással és mikrohullámú koagulálással frakcionált termékeinek (levélfehérje-koncentrátum (LFK), rost, barnalé) mennyiségi arányait nem befolyásolja a növény szelénnel való dúsítása. Ugyanakkor szárazanyagtartalom, nyersfehérje-tartalom tekintetében az emelt szeléndózis (10 mg/kg szelenát és 50 mg/kg szelenit) statisztikailag kimutatható módon csökkentette a levélfehérje-koncentrátum és rostfrakciók értékeit.
3. A zöld biofinomításban gyakran alkalmazott fehérjenövény, a lucerna (*Medicago sativa* L.) LFK-, rost- és barnalé-frakciói közül a szelén minden esetben az LFK-ban halmozódott fel legnagyobb arányban függetlenül az alkalmazott szelén formájától (szelenát, szelenit, vörös elemi szelén) és a kijuttatott koncentrációtól.
4. A vörös elemi szelénnel kezelt növények esetén találtuk a legnagyobb mértékű szerves szelén (szelenometionin formában) beépülését LFK- és rostfrakciókban. Nagy dózisú ionos formákkal (10 mg/kg szelenát és 50 mg/kg szelenit) történő kezelés esetén nem növelhető arányosan a beépült szerves formák, mint a szelenometionin mennyisége a lucerna (*Medicago sativa* L.) hajtásokban.
5. Az LFK, mint alternatív takarmányfehérje szelénnel való dúsítására a vörös elemi szelén kiegyenlítettebb szelénfelhalmozódást eredményez az ionos formákkal (szelenát, szelenit) szemben az egymást követő többszöri betakarítások alkalmával.
6. Fitonutriensek kvalitatív és kvantitatív vizsgálatával igazoltuk, hogy a szelén az alkalmazott koncentrációtartományban és kísérleti beállítások mellett nem okozott minőségi vagy számottevő mennyiségi változást a lucerna eredetű frakciók (LFK, rost, barnalé) szekundermetabolit-összetételében.

8. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

1. A zöld biofinomításban ismert alapvető frakcionálási lépéssorozat alkalmazható agronómiai szeléndúsítással együtt anélkül, hogy lényeges változások lennének a frakciók egymáshoz viszonyított arányaiban.
2. Kísérletesen igazoltuk, hogy a szelenit (1 - 50 mg/kg), a szelenát (1 - 10 mg/kg), és a vörös elemi szelén 10 – 50 mg/kg tartományban nem befolyásolja a lucernalevélfehérje-koncentrációt.
3. A feldolgozott lucerna frakcióit összehasonlítva, a levélfehérje-koncentrációban (LFK) halmozódott fel a szelén legnagyobb mértékben. A takarmányfehérje-alternatíva LFK szeléndúsítására (*fortification*) a vörös elemiszelén-formát alkalmasabbnak találtuk, mert kiegyenlítettebb szelénfelhalmozódást eredményez, összehasonlítva az ionos szelénformákkal. Gyakorlati hasznosítás szempontjából jelentős, hogy az így koncentrált fehérje tehát nem csak takarmányfehérjeforrásként értékes, hanem biológiailag kedvezőbb szerves formájú szelénrel is gazdagítható.
4. A kémiai szintetizált vörös elemiszelén-szol technológiai továbbfejlesztés során alkalmassá tehető hosszúhatású szelénműtrágya előállítására, mely biztonságosabb szelénműtrágyázást jelenthet a termesztésben. A vörös elemi szelén lassú ionos formákká alakulása a talajban állandó és alacsony szelénellátást biztosíthat a toxikus felhalmozódás elkerülésével.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A fehérje az egyik legfontosabb összetevő a táplálékunkban és a takarmányokban. A nitrogénműtrágyák környezetre gyakorolt hatásaik mellett feloldották az iparosodott növénytermesztés fehérjeelőállításának korlátait. Mégis a technológia és a források nem egyenlő eloszlása következtében továbbra is a fehérjetartalom, mint fontos faktor szerepel a mezőgazdaságban. A kiszolgáltatottságot tovább fokozzák a globalizáció által létrejött egyedülálló, hosszú és ezáltal sérülékeny ellátási láncok. A magalapú fehérjeellátás kulcsjelentőségű forrása a szójabab, mely klimatikus igényei miatt keveset termelt fehérjenövény a legtöbbet felhasználó, mérsékelt klímájú országokban.

A zöld fehérje, vagy más néven levélfehérje alternatív megoldást kínál a magalapú fehérjeellátás mellett. A növények zöld, friss leveleiben jelentős fehérjemennyiség található, melynek kinyerése és hasznosítása megfelelő technológiát és feldolgozást igényel. Közgazdasági szempontból a magalapú fehérjeellátás kisebb költségeit a zöldfehérje-előállítás ipari szintű termelésbe illesztése kompenzálhatja. A körforgásos gazdaság elveinek megfelelően a levélfehérjét zöld biofinomítókban előállítva, a takarmányként hasznosítható fehérje mellett keletkező produktum, présrost és barnalé bioipari kapcsolódási pontként szolgálva alapanyaga lehet a nagy hozzáadott értékű termékek előállításának.

A növénytermesztés egyik várható kihívása a megművelhető talajok mikro- és nyomelemekből való kimerülése. Ennek hatását tovább súlyosbítja, hogy a megváltozott igényeknek megfelelően egyre több, olyan növényi alapú élelmiszer, fehérjét szükséges előállítani, melyek táplálkozástani szempontból értékes, az állati fehérjéhez hasonló, megemelt cink-, vas-, jód- és szeléntartalommal rendelkeznek. A cél elérése érdekében a növény-nemesítés mellett a dúsítás (*fortification*) nyújt segítséget.

A szelén, mint az egyik legtöbbet kutatott nyomelem, kitüntetett szerepének egyik oka a vékony határ a napi szükséglet (55 µg/nap) és a toxikus mennyiség (>400 µg/nap) között. A szükségesnél kisebb bevitel gyenge immunrendszert, és az oxidatív stresszel szembeni csökkent ellenállóképességet eredményez. Egyenlőtlen földrajzi eloszlása következtében egyszerre vannak jelen a szelénhiány okozta megbetegedések, és a krónikus szelenózis egészségre gyakorolt következményei.

Az agronómiai szeléndúsítás (*fortification*) célja, hogy mezőgazdasági/kertészeti haszonnövényekben, növeljék a szerves szelén mennyiségét, zárt vagy nyitott rendszerben

történő szelénutánpótlás során. Jellemzően a szelénnel történő megerősítés egyszer betakarítható termést vagy gazdasági értéket képviselő szervet érint. Jelen kutatás kísérleti növénye a takarmányozási szempontból kiemelt jelentőségű lucerna, amelynek a gazdasági értékét jelentő leveles szára a vegetációs időszak során minimum három alkalommal kerül betakarításra a mezőgazdasági gyakorlatban. Emiatt az agronómiai dúsítás érdekes kérdésként merül fel.

Először tenyészedényes kísérletet állítottunk be és a lucernanövényeket a szelénkezelés után 4 alkalommal a megfelelő fenológiai fázisban, zöldbimbós-állapotban betakarítottuk. Az edényekből gyűjthető zöld biomasszát feldolgoztuk és a keletkező rost-, LFK- és barnalé-frakciókat, illetve a leveleket és szárazakat karakterizáltuk. A vizsgálatok során nyersfehérje-tartalom, aminosavprofil, szeléntartalom, szelénspeciáció és kvalitatív, kvantitatív fitonutriens méréseket végeztünk.

Szabadföldi kisparcellás kísérletben is végeztünk szeléndúsítást (*fortification*) mind a három vizsgált formával, hogy a lucerna zöld biofinomítás mennyiségi és minőségi paramétereire gyakorolt hatását vizsgáljuk. A szabadföldi kísérlet során a szelénkezelés biomasszahozamra gyakorolt hatását is vizsgáltuk, illetve reprezentatív mennyiségű, háromszor 1 kg friss biomasszát dolgoztunk fel zöld frakcionálással. A keletkező frakciókból nyersfehérje- és teljes szeléntartalom mérést végeztünk.

A tenyészedényes kísérletben alkalmazott nagy dózisok, 10 és 50 mg/kg mérhető negatív hatást értek el a növények fejlődésére. A hajtások szárazanyag-tartalma a kezelést követő első betakarításkor kisebbnek adódott, mint a kezeléstől legtávolabbi 4. betakarítás alkalmával. A nyersfehérje-tartalom eredmények a feldolgozott termékekben a túl magas szeléntartalom hatására kevésnek bizonyultak. A vegetációs periódus végére, mikor a szeléntartalom csökkent a növényekben, megnövekedett nyersfehérje-tartalmat tapasztaltunk az LFK-, rost- és barnalé-frakciókban. A magas 10 mg/kg Se(VI) és 50 mg/kg Se(IV) kezelések átlagos nyersfehérje-tartalma 32 és 33 % volt LFK-ban, míg a kontroll növényekből készült LFK 40% nyersfehérje-tartalommal rendelkezett átlagosan.

A teljes szeléntartalom mérések során megállapítottuk a lucernalevelek és -szárazak teljes szeléntartalmát, illetve a kijuttatott formák felvételének dinamikájáról nyertünk adatokat. A nagy koncentrációjú szelenit és szelenát a kezelést követően gyorsan és nagy mennyiségben épült be a zöld növényi szövetekbe, mennyiségük azonban folyamatosan csökkent a következő 3 betakarítás alkalmával. A vörös elem szelénnél tapasztalt csökkenés lényegesen kisebb

mértékű volt, a 4. betakarításra pedig stabil, enyhén emelkedő szintet tudtunk kimutatni. A lucernafrakciók közül az LFK-ban dúsult fel a legtöbb szelén szemben a rosttal és barnalével. Azonban negatív összefüggést is megfigyeltünk a túl magas szeléntartalom mellett csökken az LFK nyersfehérje-tartalma.

Szelénspeciáció vizsgálatok során vizes és enzimes kivonatokat készítettünk a lucerna LFK-, rost- és barnalé-mintákból. A két leggyakoribb forma a szelenát és szelenometionin (SeMet) voltak minden mintatípus esetén. A szelenát a legnagyobb értéket a 10Se(VI) kezelt LFK-ban érte el, 451 mg/kg-ot. A SeMet pedig 0-246 mg/kg koncentrációban volt jelen az LFK-kban. A szelenát a vizes kivonatokban volt dominánsabb, a SeMet pedig a proteáz enzimekkel feltárt mintákban. A nagy koncentrációjú kezelések vizsgálatánál a felvett nagy mennyiségű szelén nem jelentett következetesen nagyobb mennyiségű SeMet konverziót. Vagyis az értékes szerves SeMet-forma mennyiségének növelése érdekében előnyösebb egy alacsonyabb, de stabil szelénellátás biztosítása lucerna esetében.

A fitonutriensek kvalitatív és kvantitatív vizsgálata során 83 komponenst azonosítottunk, melyek jelentős része a lucernára jellemző falvonoidok és szaponinok voltak. Nem találtunk a szelénkezelések hatására specifikus, eltérő metabolitot. Azonban egyes komponensek a mennyiségi vizsgálat során különböző arányban voltak jelen az LFK-, rost- és barnalé-mintákban. A szabadföldi kísérlet során kisebb koncentrációkban végeztük a növények kezelését, így a teljes szeléntartalom eredmények is kisebbnek adódtak. Szelenátot (Se(VI)) és szelenitet (Se(IV)) 5 és 50 mg/m² koncentrációban alkalmaztunk, a vörös elemi szelén szorból pedig 50 és 100 mg/ m² koncentrációt juttattunk ki. A kezelés után, három alkalommal takarítottuk be a biomasszát. Az első betakarítás alkalmával kaptuk a legnagyobb, közel 2 kg/m² friss zöld biomasszát, később pedig a harmadik betakarítás alkalmával az alacsony dózisú szelénkezelés biomassza hozamra gyakorolt enyhe pozitív hatását mutattuk ki. A nyersfehérjetartalom-eredmények között sem tapasztaltunk olyan markáns eltéréseket, mint a tenyészedényes kísérlet során. Az LFK 38-40 %, a rost 10 %, barnalé pedig kevesebb, mint 1 % nyersfehérje-tartalommal bírt, száraztömegre vetítve. A szeléntartalom két kezelés esetében mutatott csak a tenyészedényes kísérletnél tapasztalt csökkenést, az 50Se(VI) és a 100Se(0) kezelés esetében, az első betakarításkor 3349 és 2054 µg/kg koncentrációról 982 és 511 µg/kg-ra csökkent az LFK-ban. Szelenti esetében és alacsonyabb dózisoknál kisebb koncentrációkat találtunk és enyhébb fokú csökkenést.

Összességében agronómiai szeléndúsítással megfelelő optimalizálást követően rentábilisan növelhető a lucernaalapú zöld biofinomítás hozzáadott értéke.

10. SUMMARY

Protein is one of the most important components in our food and animal feed. The consequences of nitrogen fertilizers on the environment have removed the limitations of industrial plant-based protein production. However, due to unequal distribution of technology and resources, protein content continues to play a significant role in agriculture. Globalization has further increased vulnerability through the creation of unique, lengthy and fragile supply chains. The dominant source of plant-based protein supply comes from soybeans, a protein crop that is not highly productive due to its climate requirements but is heavily utilized in countries with temperate climates.

The green protein, also known as leaf protein, offers an alternative solution to seed-based protein supply. Significant amounts of protein can be found in the fresh green leaves of plants, but their extraction and utilization require appropriate technology and processing. From an economic perspective, the production of green protein on an industrial scale can compensate for the lower costs of seed-based protein supply. In line with the principles of circular economy, the production of leaf protein concentrate (LPC) in green biorefineries can provide a base material for the production of higher value-added products, with by-products such as press cake (fiber) and brown juice serving as connections to the bio-industry, in addition to feed protein.

One of the expected challenges of crop cultivation is the depletion of micro and trace elements in arable soils. This is further exacerbated by the increasing demand for plant-based foods and proteins that are nutritionally valuable, similar to animal proteins, and have elevated levels of zinc, iron, iodine, and selenium to meet changing dietary needs. In addition to plant breeding, biofortification provides assistance in achieving these goals.

Selenium, as one of the most extensively researched trace elements, has a unique role due to the narrow boundary between the daily requirement (55 µg/day) and the toxic level (>400 µg/day). Inadequate intake results in a weak immune system and lower resistance to oxidative stress. Due to its uneven geographical distribution, diseases caused by selenium deficiency and the health consequences of chronic selenosis are known simultaneously.

In our research, we combined the agronomic selenium fortification that is already known and used in practice with the green biorefining system. The goal was to produce an organic selenium-enriched leaf protein concentrate (LPC) that could provide both feed protein and selenium supplementation in animal husbandry. We chose alfalfa (*Medicago sativa* L.) as

model plant for the experiments, as it is one of the best-known raw materials for green biorefining, and its quantitative and qualitative parameters for LPC, fiber, and brown juice are well-known and have been the subject of extensive research. When setting up the experiments, our aim was to harvest the alfalfa several times, in line with common agricultural practice, so we carried out treatments with three different forms and various concentrations of selenium. This allowed us to observe the temporal transformation and uptake dynamics of selenate, selenite, and red elemental selenium from the soil throughout the entire vegetation period.

Firstly, a pot experiment was set up with alfalfa plants and harvested the green shoots at the appropriate phenological stage four times after selenium treatment. Green biomass was processed, collected from the pots and characterized the resulting fiber, LPC, and brown juice fractions, as well as the leaves and stems. During the analysis, measurements of crude protein content, amino acid profile, selenium content, selenium speciation, and qualitative and quantitative phytonutrient measurements were conducted. Selenium fortification in all three forms in a field experiment were also carried out to investigate the effect on the quantitative and qualitative parameters of green biorefining in alfalfa. During the field experiment, the effect of selenium treatment on biomass yield was investigated and processed representative amounts of fresh biomass (3 x 1 kg) using green fractionation. Measurements of crude protein and total selenium content of the resulting fractions were carried out.

The high doses of selenium, 10 and 50 mg/kg used in the pots experiment had a measurable negative effect on plant development. Shoot dry matter content was found to be lower at the first harvest after treatment than at the 4th harvest furthest from treatment. The crude protein content results were low in the processed products due to the excessive selenium content. At the end of the growing period, when selenium content decreased in the plants, increased crude protein content was observed in the LPC, fibre and brown juice fractions. The high 10 mg/kg Se(VI) and 50 mg/kg Se(IV) treatments had an average crude protein content of 32 and 33 % in LPC, while LPC from control plants had an average crude protein content of 40%.

During the measurements of total selenium content, we determined the total selenium content of alfalfa leaves and stems, and obtained data on the dynamics of uptake of the applied forms. High concentrations of selenite and selenate were quickly and extensively incorporated into green plant tissues after treatment, but the quantity decreased continuously in the following three harvests. The decrease in selenium was significantly less in red element selenium, and a stable, slightly rising level in the fourth harvest was detectable. The most selenium accumulated

in LPC compared to fiber and brown juice. However, a negative correlation between excessive selenium content and decreased crude protein content in LPC was observed.

Selenium speciation studies were performed on aqueous and enzymatic extracts of alfalfa LPC, fibre and brown juice samples. The two most abundant selenium forms were selenate and selenomethionine (SeMet) for all sample types. Selenate was highest in 10Se(VI) treated LPC at 451 mg/kg. SeMet was present at concentrations ranging from 0 to 246 mg/kg in the LPCs. Selenate was more dominant in aqueous extracts and SeMet in samples digested with protease enzymes. In the study of high concentration treatments, the high amount of selenium added did not consistently result in higher SeMet conversion. In other words, to increase the amount of valuable organic SeMet form, it is preferable to provide a lower but stable supply of selenium in alfalfa.

Qualitative and quantitative analysis of the phytonutrients identified 83 components, the majority of which were flavonoid and saponin compounds typical of alfalfa. No different metabolites specific to selenium treatments were found. However, some components were present in different proportions in the LPC, fibre and brown juice samples during the quantitative analysis.

In the open field experiment, the plants were treated at lower concentrations, so the total selenium content results were also lower. We applied selenate (Se(VI)) and selenite (Se(IV)) at concentrations of 5 and 50 mg/m² and red elemental selenium sol at concentrations of 50 and 100 mg/m². Biomass was harvested three times after treatment. The first harvest yielded the highest fresh green biomass of nearly 2 kg/m² and later the third harvest showed a slight positive effect of the low-dose selenium treatment on biomass yield. We did not observe such marked differences in crude protein content results as in the pot experiment. LPC had a crude protein content of 38-40 %, fibre 10 % and brown juice less than 1 % on a dry matter basis. Selenium content showed a drastic decrease in two treatments only in the pot experiment, 50Se(VI) and 100Se(0), from concentrations of 3349 and 2054 µg/kg at first harvest to 982 and 511 µg/kg in LPC, respectively. Lower concentrations were found at selenite and lower doses and a milder reduction was observed.

Overall, agronomic selenium fortification can profitably increase the added value of alfalfa-based green biorefinery after proper optimization.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Domokos-Szabolcsy Évának az immár 8 éve tartó eredményes közös munkánkért és a doktori kutatás során nyújtott szakmai tanácsaiért, iránymutatásáért.

Köszönöm Prof. Dr. Fári Miklósnak, aki segítette a doktori képzésbe lépésemet, és az anyagi feltételek biztosításával támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom Koroknai Juditnak és Dr. Kaszás Lászlónak szorgalmas segítségükért a laboratóriumi mérésekben és mintavételezésekben.

Köszönöm Dr. Tarek Alshaalnak és Dr. Nevien Elhawatnak a kísérletek megtervezésében, a mérésekben és tudományos publikálás során nyújtott áldozatos segítségüket.

Hálával tartozom Dr. Bákonyi Nórának, Barna Dömének és Csatári Gábornak a betakarítások során nyújtott segítségükért.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Veres Szilviának, hogy az Alkalmazott Növénybiológiai Tanszék labor- és eszközkészletét biztosította a kutatás során és a tanszék valamennyi munkatársának támogatásáért.

Köszönöm Prof. Dr. Kovács Bélának, Dr. Dernovics Mihálynak, Dr. Soós Áronnak, Mutasem Razemnek és Nyeste Erikának, a szelénspeciáció mérésekben nyújtott segítségüket, az Élelmiszertudományi Intézetben.

Köszönöm Dr. Prokisch Józsefnek, a Nanofood laboratórium vezetőjének a teljes szeléntartalom mérésben nyújtott segítségét.

Köszönöm az Agrárműszerközpont munkatársainak a nyersfehérje- és aminosav-tartalom mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Cziáky Zoltánnak, a Nyíregyházi Egyetem munkatársának a fitokémiai mérésekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm a családom segítségét, kiemelve édesanyámat és nagymamámat, akik a kezdetektől büszkén támogatták tanulmányaimat. Köszönöm Dr. Mester Tamás ösztönző segítségét a kutatás és biztató szavait a dolgozat megírása során és a végleges kézirat lektorálását.

12. IRODALOM

1. Abrams, M. M., Shennan, C., Zasoski, R. J., & Burau, R. G. (1990). Selenomethionine uptake by wheat seedlings. *Agronomy Journal*, 82(6), 1127–1130. <https://doi.org/10.2134/agronj1990.00021962008200060021x>
2. Addo-Bediako, A. (2013). Effects of leaf harvest on crude protein and mineral contents of selected early maturing lines of lablab (*Lablab purpureus*). *African Journal of Agricultural Research*, 8(5), 449–453.
3. Akibode, C. S., & Maredia, M. K. (Szerk.). (2012). *Global and Regional Trends in Production, Trade and Consumption of Food Legume Crops*. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.136293>
4. Alcântara, D. B., Dionísio, A. P., Artur, A. G., Silveira, B. K. S., Lopes, A. F., Guedes, J. A. C., Luz, L. R., Nascimento, R. F., Lopes, G. S., Hermsdorff, H. H. M., & Zocolo, G. J. (2022). Selenium in Brazil nuts: An overview of agronomical aspects, recent trends in analytical chemistry, and health outcomes. *Food Chemistry*, 372, 131207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131207>
5. Alfthan, G., Eurola, M., Ekholm, P., Venäläinen, E.-R., Root, T., Korkalainen, K., Hartikainen, H., Salminen, P., Hietaniemi, V., Aspila, P., & Aro, A. (2015). Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.04.009>
6. Arnér, E. S. J. (2020). Perspectives of TrxR1-based cancer therapies. In H. Sies (Szerk.), *Oxidative Stress* (o. 639–667). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00031-6>
7. Arnér, E. S. J., & Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 16(6), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.10.009>
8. Ates, S., Cicek, H., Bell, L. W., Norman, H. C., Mayberry, D. E., Kassam, S., Hannaway, D. B., & Louhaichi, M. (2018). Sustainable development of smallholder crop-livestock farming in developing countries. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 142, 012076. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/142/1/012076>
9. Ayasan, T., Cetinkaya, N., Aykanat, S., & Celik, C. (2020). Nutrient contents and *in vitro* digestibility of different parts of corn plant. *South African Journal of Animal Science*, 50(2), 302–309. <https://doi.org/10.4314/sajas.v50i2.13>

10. Bai, B., Chen, W., Zhang, J., & Shen, Y. (2018). Growth effects and distribution of selenite in *Medicago sativa*. *Plant and Soil*, 425(1), 527–538. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3589-6>
11. Bai, B., Wang, Z., Gao, L., Chen, W., & Shen, Y. (2019). Effects of selenite on the growth of alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Sadie 7) and related physiological mechanisms. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(6), 78. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2867-0>
12. Bákonyi, N., Kisvarga, S., Barna, D., O. Tóth, I., El-Ramady, H., Abdalla, N., Kovács, S., Rozbach, M., Fehér, C., Elhawat, N., Alshaal, T., & Fári, M. G. (2020). Chemical Traits of Fermented Alfalfa Brown Juice: Its Implications on Physiological, Biochemical, Anatomical, and Growth Parameters of *Celosia*. *Agronomy*, 10(2), 247. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020247>
13. Barna, D., Alshaal, T., O. Tóth, I., Cziáky, Z., Fári, M. G., Domokos-Szabolcsy, É., & Bákonyi, N. (2022). Bioactive metabolite profile and antioxidant properties of brown juice, a processed alfalfa (*Medicago sativa*) by-product. *Heliyon*, 8(11), e11655. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11655>
14. Bar-On, Y. M., & Milo, R. (2019). The global mass and average rate of rubisco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4738–4743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816654116>
15. Baumgartner, S., Krska, R., & Welzig, E. (2007). Detecting allergens in foods. In C. Mills, H. Wichers, & K. Hoffmann-Sommergruber (eds.), *Managing Allergens in Food* (228–250). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845692278.3.228>
16. Bela K. (2018). *Növényi glutation peroxidáz enzimek vizsgálata lúdfűben* [PhD, Szegedi Tudományegyetem]. <https://doi.org/10.14232/phd.9876>
17. Betschart, A., & Kinsella, J. E. (1973). Extractability and solubility of leaf protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(1), 60–65. <https://doi.org/10.1021/jf60185a019>
18. Bickoff, E. M., Knuckles, B. E., Spencer, R. R., Lazar, M. E., & Kohler, G. O. (1970). PRO-XAN process: Incorporation and evaluation of sugar cane rolls in wet fractionation of alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), 1086–1089. <https://doi.org/10.1021/jf60172a001>
19. Birringer, M., Pilawa, S., & Flohé, L. (2002). Trends in selenium biochemistry. *Natural Product Reports*, 19(6), 693–718. <https://doi.org/10.1039/B205802M>
20. Bódi, L., & Fári, M. G. (2002). *Eljárás magasabb beltartalmi értékű lucernaszárítmányok előállítására* (Patent Sz. P0203889).

21. Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 49(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>
22. Bud, R. (1989). History of „biotechnology”. *Nature*, 337(6202), Article 6202. <https://doi.org/10.1038/337010a0>
23. Cai, X., Wang, C., Yu, W., Fan, W., Wang, S., Shen, N., Wu, P., Li, X., & Wang, F. (2016). Selenium Exposure and Cancer Risk: An Updated Meta-analysis and Meta-regression. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep19213>
24. Carlsson, R. (1994). Sustainable production-Green crop fractionation: Effects of species, growth conditions, and physiological development on fractionation products. In *Handbook of Plant and Crop Physiology* (941–963). Marcel Dekker Inc.
25. Carlsson, R. (1997). Food and Non-Food Uses of Immature Cereals. In G. M. Campbell, C. Webb, & S. L. McKee (eds.), *Cereals: Novel Uses and Processes* (159–167). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2675-6_20
26. Carlsson, R. (1998). Status quo of the utilization of green biomass. In *Die Grüne Bioraffinerie* (39–45). Verlag Gesellschaft für ökologische Technologie.
27. Carlsson, R., & Hanczakowski, P. (1985). The nutritive value of mixtures of white leaf protein and food proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(10), 946–950. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740361007>
28. Castellano, S., Gladyshev, V. N., Guigó, R., & Berry, M. J. (2008). SelenoDB 1.0: A database of selenoprotein genes, proteins and SECIS elements. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_1), D332–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm731>
29. Coldebella, P. F., Gomes, S. D., Evarini, J. A., Cereda, M. P., Coelho, S. R. M., & Coldebella, A. (2013). Evaluation of protein extraction methods to obtain protein concentrate from cassava leaf. *Engenharia Agrícola*, 33, 1223–1233. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162013000600015>
30. Coly, S. M. (2022, november 1). *Learning from natural disaster in Sahel: A review of EM-DAT Database*. 4th Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration, Sousse, Tunisia. <https://www.emcei.net/>
31. Comai, S., Bertazzo, A., Bailoni, L., Zancato, M., Costa, C. V. L., & Allegri, G. (2007). Protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in legume seeds. *Food Chemistry*, 103(2), 657–661. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.045>

32. Combs, G. F., & Combs, S. B. (1986). 2—Selenium in the environment. In G. F. Combs & S. B. Combs (eds.), *The Role of Selenium in Nutrition* (15–40). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-183495-1.50007-5>
33. Csapó J. & Albert Cs. (2018). *Funkcionális élelmiszerek*. Debreceni Egyetemi Kiadó. Debrecen
34. Csapó J., & Csapóné Kiss Z. (2004). *Élelmiszerkémia*. Scientia Kiadó. Kolozsvár
<http://real.mtak.hu/117467/>
35. Csatári, G., Eged, B. J., Fehér, C., Fári, M. G., & Kovács, S. (2022). Investigation of Content Parameters in Wet-Fractionated Fibre from Various Plants for Potential Use in Human Nutrition. *Foods*, 11(19), 3038. <https://doi.org/10.3390/foods11193038>
36. Daniell, H., Lee, S.-B., Panchal, T., & Wiebe, P. O. (2001). Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts11Edited by N.-H. Chua. *Journal of Molecular Biology*, 311(5), 1001–1009. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4921>
37. Daniels, L. A. (1996). Selenium metabolism and bioavailability. *Biological Trace Element Research*, 54(3), 185–199. <https://doi.org/10.1007/BF02784430>
38. de Jong, A., & Nieuwland, M. (2011). Literature study on the properties of Rubisco. TNO report. <https://library.wur.nl/WebQuery/groenekennis/2177395>
39. de Zumelzú, D. M., Costero, B., Cavaleri, P., & Maich, R. (2002). Selection responses for some agronomic traits in hexaploid triticale. *Agriscientia*, 19.
40. Dernovics, M., Giusti, P., & Lobinski, R. (2007). ICP-MS-assisted nanoHPLC-electrospray Q/time-of-flight MS/MS selenopeptide mapping in Brazil nuts. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22(1), 41–50. <https://doi.org/10.1039/B608041C>
41. Dernovics, M., Stefánka, Zs., & Fodor, P. (2002). Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(3), 473–480. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1215-5>
42. Dhillon, K. S., & Dhillon, S. K. (2003). Distribution and management of seleniferous soils. In *Advances in Agronomy* (79, 119–184). Elsevier. Ludhiana, India. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)79003-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)79003-2)
43. Domokos-Szabolcsy, É., Abdalla, N., Alshaal, T., Sztrik, A., Márton, L., & El-Ramady, H. (2014). In vitro comparative study of two *Arundo donax* L. ecotypes' selenium tolerance. *International Journal of Horticultural Science*, 20(3–4), Article 3–4. <https://doi.org/10.31421/IJHS/20/3-4/1146>

44. Domokos-Szabolcsy, É., Barnóczki, A., Prokisch, J., Sztrik, A., & Fári, M. G. (2011). Variation in selenium tolerance among two onion cultivars in closed fortification system. *International Journal of Horticultural Science*, 17(1–2), Article 1–2. <https://doi.org/10.31421/IJHS/17/1-2./949>
45. Domokos-Szabolcsy, É., Elhawwat, N., Domingos, G. J., Kovács, Z., Koroknai, J., Bodó, E., Fári, M. G., Alshaal, T., & Bákonyi, N. (2022). Comparison of Wet Fractionation Methods for Processing Broccoli Agricultural Wastes and Evaluation of the Nutri-Chemical Values of Obtained Products. *Foods*, 11(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/foods11162418>
46. Domokos-Szabolcsy, É., Kovács, Z., Kaszás, L., Koroknai, J. Á., & Fári, M. G. (2020). Évelő növényi zöld biomassza, mint értékes fehérje és fitonutrintes forrás. In Z. Bujdosó, L. Dinya, & J. Csernák (Szerk.), *VII. Nemzetközi Tudományos Napok: 17 th International Scientific Days: A tudományos napok publikációi* (o. 298–305). Károly Róbert Nonprofit Kft.
47. Domokos-Szabolcsy, E., Marton, L., Sztrik, A., Babka, B., Prokisch, J., & Fari, M. (2012). Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotiniatabacum*. *Plant Growth Regulation*, 68(3), 525–531. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9735-x>
48. Domokos-Szabolcsy, É., Yavuz, S. R., Picoli, E., Fári, M. G., Kovács, Z., Tóth, C., Kaszás, L., Alshaal, T., & Elhawwat, N. (2023). Green Biomass-Based Protein for Sustainable Feed and Food Supply: An Overview of Current and Future Prospective. *Life*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/life13020307>
49. Doran, J. W., & Alexander, M. (1977). Microbial Formation of Volatile Selenium Compounds in Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 41(1), 70–73. <https://doi.org/10.2136/sssaj1977.03615995004100010022x>
50. Dudás, L. (2009). *A nagy csalán (Urtica dioica L.) zöldségnövénykénti hasznosításának elméleti és gyakorlati alapjai* [Doktori disszertáció, Debreceni Egyetem]. <http://hdl.handle.net/2437/79544>
51. EFSA. (é. n.). *Opinion on the safety of ‘Alfalfa protein concentrate’ as food* | EFSA. Elérés 2022. december 20., forrás <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/997>
52. EFSA. (2014). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal*, 12(10), 3846. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846>
53. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2013). Scientific Opinion on safety and efficacy of hydroxy-analogue of

- selenomethionine as feed additive for all species. *EFSA Journal*, 11(1), 3046. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3046>
54. Egressy-Molnár, O., Ouerdane, L., Györfi, J., & Dernovics, M. (2016). Analogy in selenium enrichment and selenium speciation between selenized yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Herichium erinaceus* (lion's mane mushroom). *LWT - Food Science and Technology*, 68, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.028>
 55. Ellis, R. J. (1979). The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, 4(11), 241–244. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90212-3)
 56. El-Ramady, H. R., Domokos-Szabolcsy, É., Abdalla, N. A., Alshaal, T. A., Shalaby, T. A., Sztrik, A., Prokisch, J., & Fári, M. (2014). Selenium and nano-selenium in agroecosystems. *Environmental Chemistry Letters*, 12(4), 495–510. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0476-0>
 57. El-Ramady, H. R., Domokos-Szabolcsy, É., Shalaby, T. A., Prokisch, J., & Fári, M. (2015). Selenium in Agriculture: Water, Air, Soil, Plants, Food, Animals and Nanoselenium. In E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, & D. Robert (Szerk.), *CO2 Sequestration, Biofuels and Depollution* (Köt. 5, o. 153–232). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11906-9_5
 58. Erdelmeier, I., & Moutet, M. (2012). *Process for preparing 2-hydroxy-4-methylselenobutyric acid, alone or as a mixture with its sulphur-containing analogue, and uses thereof in nutrition, in particular animal nutrition* (United States Patent Sz. US8309763B2). <https://patents.google.com/patent/US8309763B2/en>
 59. Ereky, K. (1918). Biotechnológia. *Magyar Mérnök- és Építész Egylet Közlönye*, 52(41), 337–339.
 60. Ereky, K. (1919). *Biotechnologie der fleisch-, fett- und milcherzeugung im landwirtschaftlichen grossbetriebe für naturwissenschaftlich gebildete landwirte, verfasst.*, Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin, 84 p.
 61. Ereky, K. (1926a). *Green pulper and green mill*. Atheneum Publishing and Printing Co. Ltd.
 62. Ereky, K. (1926b). *Eljárás zöldség- pép előállítására és konzerválására* (Patent Sz. 92680).
 63. Ereky, K. (1926c). *Procédé pour préparer et conserver de la pulpe d'herbages* (Patent Sz. 623150.).

64. Ereky, K. (1926d). *Process for the manufacture and for the preservation of green fodder pulp or other plant pulp and dry product made therefrom* (Patent Sz. Br. Patent, No. 270, 629.).
65. Ereky, K. (1926e). *Verfahren zur Herstellung von Grünpflanzenbrei und Konservierung desselben* (Patent Sz. 118622).
66. Ereky, K. (1927). *Gép főleg zöldnövénypép előállítására* (Patent Sz. 95006).
67. Ereky, K. (1928). *Pulp manufacture (Production de pulpe)* (Patent Sz. 282415.).
68. Ereky, K. (1933). Lucerne hay meal or chopped green lucerne? *Deutsche Landwirtschaftliche Presse*, 60, 295–296.
69. Erisman, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z., & Winiwarter, W. (2008). How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, 1(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/ngeo325>
70. Eswayah, A. S., Smith, T. J., & Gardiner, P. H. E. (2016). Microbial Transformations of Selenium Species of Relevance to Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 4848–4859. <https://doi.org/10.1128/AEM.00877-16>
71. A Bizottság (EU) 2017/2470 végrehajtási rendelete—Az új élelmiszerek uniós jegyzékének az új élelmiszerekről szóló (EU) 2015/2283 európai parlamenti és tanácsi rendelet alapján történő megállapításáról, (2017).
72. European Biomass Industry Association. (2021. május 19). *Four European projects joining forces to help boosting the Circular Economy*. <https://www.eubia.org/cms/2021/05/19/four-european-projects-joining-forces-to-help-boosting-the-circular-economy/>
73. Fantozzi, P., & Sensidoni, A. (1983). Protein extraction from tobacco leaves: Technological, nutritional and agronomical aspects. *Plant Foods for Human Nutrition*, 32(3), 351–368. <https://doi.org/10.1007/BF01091194>
74. Fári, M. G. (2011). A zöld-biomassza értéknövelő hasznosítási lehetősége: A levélfehérje-előállítás (Gondolatok a levélfehérje-előállításról). In *Mag Arany Évkönyv 2011* (72–76). Dr. Oláh István (Szerk.).
75. Fári, M. G. (2016). Kralonvánszky U. Pál emlékezete. A hazai levélfehérje-kutatások újrarendezésének története. In I. Oláh (Szerk.), *MAG Gyémánt Évkönyv 2016* (1–9). TINTA Könyvkiadó. Budapest
76. Fári, M. G. (2018a). A zöld fehérjemalom tudományos megalapozása és lehetséges szerepe a fehérjegazdálkodásban. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 67(4), 237–253.

77. Fári, M. G. (2018b). A növénytudomány kihívásai és az Új Zöld Forradalom: „The Wheat-Problem” napjainkban. In É. Szalka (Szerk.), *XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018. November 9-10. : Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia 200 éve—Múlt, jelen, jövő* (201–210). VEAB Agrártudományi Szakbizottság, Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar.
78. Fári M. G. (2020). *Proteomill – lucerna alapú fehérjetermékeket, és egyéb növényi termékeket előállító termesztési és feldolgozási technológia, valamint mintautem kialakítása* (o. 31) [Kutatásfejlesztési műszaki jelentés]. Debreceni Egyetem.
79. Fári, M. G., & Domokos-Szabolcsy, É. (2018). *Növényifehérje-koagulum előállítására szolgáló eljárás* (Patent Sz. P1800041/40).
80. Fári M. G., & Popp J. (Szerk.). (2015). *Biotechnology—Anno 1917-1919. Károly Ereky's vision about the application of life sciences. (Ereky Károly víziója az élettudomány alkalmazásáról, in Hungarian).* Szaktudás Publishing House.
<https://szaktudas.hu/webshop/33-biotechnologia-anno-1917-1919-erek-y-karoly-vizioja-az-elettudomany-alkalmazasrol>
81. Fári, M. G., & Popp, J. (Szerk.). (2016). *Biotechnology—Anno 1920-1938 and Today. Károly Ereky's program about solving the protein problem and today's tasks, (Biotechnológia anno 1920-1938 és ma—Ereky Károly programja a fehérjeprobléma megoldásáról és napjaink feladatai, in Hungarian).* Szaktudás Publishing House. Budapest
82. Fébel, H. (2018). Ipari melléktermékek felhasználása gazdasági állataink fehérjeellátásának biztosítására. *Állattenyésztés és takarmányozás*, 67(4), 254–272.
83. Feedipedia - Animal Feed Resources Information System. (2023a, február 11). *Alfalfa, aerial part, fresh* | Feedipedia. <https://www.feedipedia.org/node/11745>
84. Feedipedia - Animal Feed Resources Information System. (2023b, február 11). *Blue lupin (Lupinus angustifolius), aerial part, fresh* | Feedipedia. <https://www.feedipedia.org/node/25373>
85. Feedipedia - Animal Feed Resources Information System. (2023c, február 11). *Common vetch (Vicia sativa), aerial part, fresh* | Feedipedia. <https://www.feedipedia.org/node/12012>
86. Feedipedia - Animal Feed Resources Information System. (2023d, február 11). *Faba bean (Vicia faba), aerial part, fresh* | Feedipedia. <https://www.feedipedia.org/node/19702>

87. Feedipedia - Animal Feed Resources Information System. (2023e, február 11). *Lablab* (*Lablab purpureus*), *aerial part, fresh* | *Feedipedia*.
<https://www.feedipedia.org/node/12192>
88. Feedipedia - Animal Feed Resources Information System. (2023f, február 11). *Red clover* (*Trifolium pratense*), *aerial part, fresh* | *Feedipedia*.
<https://www.feedipedia.org/node/12508>
89. Feedipedia - Animal Feed Resources Information System. (2023g, február 11). *White clover* (*Trifolium repens*), *aerial part, fresh* | *Feedipedia*.
<https://www.feedipedia.org/node/12762>
90. Fehér, C., Barta, Z., & Réczey, K. (2012). Process considerations of a biorefinery producing value-added products from corn fibre. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 56(1), Article 1. <https://doi.org/10.3311/pp.ch.2012-1.02>
91. Fernandez, A., Sheaffer, C., Tautges, N., Putnam, D., & Hunter, M. (2019). *Alfalfa, Wildlife, and the Environment* (2nd ed.). National Alfalfa and Forage Alliance, St. Paul, MN.
92. Filippa, F., Panara, F., Leonardi, D., Arcioni, L., & Calderini, O. (2020). Life Cycle Assessment Analysis of Alfalfa and Corn for Biogas Production in a Farm Case Study. *Processes*, 8(10), 1285. <https://doi.org/10.3390/pr8101285>
93. Fiorentini, R., & Galoppini, C. (1983). The proteins from leaves. *Plant Foods for Human Nutrition*, 32(3), 335–350. <https://doi.org/10.1007/BF01091193>
94. Fordyce, F. M. (2013). Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. In O. Selinus (Szerk.), *Essentials of Medical Geology* (o. 375–416). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5_16
95. Fraanje, W., & Garnett, T. (2020). *Soy: Food, feed, and land use change*. Food Climate Research Network. <https://doi.org/10.56661/47e58c32>
96. Fu, H., Machado, P. A., Hahm, T. S., Kratochvil, R. J., Wei, C. I., & Lo, Y. M. (2010). Recovery of nicotine-free proteins from tobacco leaves using phosphate buffer system under controlled conditions. *Bioresource Technology*, 101(6), 2034–2042.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.045>
97. FVM rendelet a Magyar Takarmánykódex kötelező előírásairól, Pub. L. No. 44/2003. (IV. 26.) (2003). <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0300044.fvm>
98. Garousi, F., Kovács, B., Domokos-Szabolcsy, É., & Veres, S. (2017). Biological changes of green pea (*Pisum sativum* L.) by selenium enrichment. *Acta Biologica Hungarica*, 68(1), 60–72. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.1.6>

99. Gawel, E. (2012). Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 11(3), 303–310.
100. Glantz, M. H. (Szerk.). (1987). *Drought and Hunger in Africa*. CUP Archive.
101. Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
102. Gulyás G. (2014). *Gazdasági állatfajok vizsgálata proteomikai módszerek alkalmazásával*. <http://hdl.handle.net/2437/197534>
103. Guo, X., & Wu, L. (1998). Distribution of Free Seleno-amino Acids in Plant Tissue of *Melilotus indica* L. Grown in Selenium-Laden Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39(3), 207–214. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1628>
104. Gupta, R., Chauhan, T. R., & Lall, D. (1993). Nutritional potential of vegetable waste products for ruminants. *Bioresource Technology*, 44(3), 263–265. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90162-5](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90162-5)
105. Hall, J. A., Bobe, G., Vorachek, W. R., Hugenbuehle, Gorman, M. E., Mosher, W. D., & Pirelli, G. J. (2013). Effects of Feeding Selenium-Enriched Alfalfa Hay on Immunity and Health of Weaned Beef Calves. *Biological Trace Element Research*, 156(1–3), 96–110. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9843-0>
106. Hansen, M., Andersen, C. A., Jensen, P. R., & Hobley, T. J. (2022). Scale-Up of Alfalfa (*Medicago sativa*) Protein Recovery Using Screw Presses. *Foods*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203229>
107. Hariharan, S., & Dharmaraj, S. (2020). Selenium and selenoproteins: It's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacology*, 28(3), 667–695. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00690-x>
108. Hart, D. J., Fairweather-Tait, S. J., Broadley, M. R., Dickinson, S. J., Foot, I., Knott, P., McGrath, S. P., Mowat, H., Norman, K., Scott, P. R., Stroud, J. L., Tucker, M., White, P. J., Zhao, F. J., & Hurst, R. (2011). Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*, 126(4), 1771–1778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.079>
109. Hermansen, J. E., Jørgensen, U., Lærke, P. E., Manevski, K., Boelt, B., Jensen, S. K., Weisbjerg, M. R., Dalgaard, T. K., Danielsen, M., Asp, T., Amby-Jensen, M.,

- Sørensen, C. a. G., Jensen, M. V., Gylling, M., Lindedam, J., Lübeck, M., & Fog, E. (2017). Green biomass—Protein production through bio-refining. *DCA Report, No.93*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173356254>
110. Hojilla-Evangelista, M. P., Selling, G. W., Hatfield, R., & Digman, M. (2017). Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf protein: Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 882–888. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7810>
 111. Holló, J., & Kralovánszky, U. P. (2000). Biotechnology in Hungary. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 69, 151–173. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_6
 112. Holló, J., Zagyvai, I., & Koch, L. (1968). *Eljárás biológiailag teljesértékű, rostmentes zöldsévénykoncentrátum előállítására* (Országos Találmányi Hivatal Patent Sz. 153249).
 113. Hu, H., Hu, J., Wang, Q., Xiang, M., & Zhang, Y. (2022). Transcriptome analysis revealed accumulation-assimilation of selenium and physio-biochemical changes in alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(11), 4577–4588. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11816>
 114. Huang, B., Zhang, J., Hou, J., & Chen, C. (2003). Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(7), 805–813. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00428-3)
 115. Huang, Y., Wang, Q., Gao, J., Lin, Z., Bañuelos, G. S., Yuan, L., & Yin, X. (2013). Daily Dietary Selenium Intake in a High Selenium Area of Enshi, China. *Nutrients*, 5(3), 700. <https://doi.org/10.3390/nu5030700>
 116. Huang, Z., Liu, Y., Cui, Z., Fang, Y., He, H., Liu, B.-R., & Wu, G.-L. (2018). Soil water storage deficit of alfalfa (*Medicago sativa*) grasslands along ages in arid area (China). *Field Crops Research*, 221, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.02.013>
 117. Hughes, R. E., Ellery, P., Harry, T., Jenkins, V., & Jones, E. (1980). The dietary potential of the common nettle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(12), 1279–1286. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740311210>
 118. Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. (2000). Selenium. In *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids* (Köt. 1–7). National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225470/>

119. Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., & Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.011>
120. Irizarry, R., Moore, J., & Cai, Y. (2001). Atomic Fluorescence Determination of Selenium Using Hydride Generation Technique. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 79(2), 97–109. <https://doi.org/10.1080/03067310108035902>
121. Jia, F., Peng, S., Green, J., Koh, L., & Chen, X. (2020). Soybean supply chain management and sustainability: A systematic literature review. *Journal of Cleaner Production*, 255, 120254. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120254>
122. Jirong, Y., Huiyun, P., Zhongzhe, Y., Birong, D., Weimin, L., Ming, Y., & Yi, S. (2012). Sodium selenite for treatment of Kashin-Beck disease in children: A systematic review of randomised controlled trials. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(7), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.02.012>
123. Jones, G. D., Droz, B., Greve, P., Gottschalk, P., Poffet, D., McGrath, S. P., Seneviratne, S. I., Smith, P., & Winkel, L. H. E. (2017). Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(11), 2848–2853. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611576114>
124. Jørgensen, H., Thomsen, S. T., & Schjoerring, J. K. (2020). The potential for biorefining of triticale to protein and sugar depends on nitrogen supply and harvest time. *Industrial Crops and Products*, 149, 112333. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112333>
125. Juhászné Tóth, R., & Csapó, J. (2019). Preparation of selenium enriched smearcase cheese and whey cheese. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 65(3), 2612–2616.
126. Juhászné Tóth R., Kiss D., Zurbó Z., & Csapó J. (20019). A szelén szerepe a táplálkozásban; szelénnel dúsított tej és tejtermékek előállítása. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 141, 625–631.
127. Kamm, B., Gruber, P. R., & Kamm, M. (Szerk.). (2005). *Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions* (1. kiad.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527619849>
128. Kamm, B., Hille, C., Schönicke, P., & Dautzenberg, G. (2010). Green biorefinery demonstration plant in Havelland (Germany). *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(3), 253–262. <https://doi.org/10.1002/bbb.218>
129. Kamm, B., & Kamm, M. (2007). International biorefinery systems. *Pure and Applied Chemistry*, 79(11), 1983–1997. <https://doi.org/10.1351/pac200779111983>

130. Kamm, B., Schönicke, P., & Hille, Ch. (2016). Green biorefinery – Industrial implementation. *Food Chemistry*, 197, 1341–1345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.088>
131. Karimi, E., Oskoueian, E., Oskoueian, A., Omidvar, V., Hendra, R., & Nazeran, H. (2013). Insight into the functional and medicinal properties of *Medicago sativa* (Alfalfa) leaves extract. *Journal of medicinal plant research*, 7, 290–297.
132. Kaszás, L., Alshaal, T., Kovács, Z., Koroknai, J., Elhawwat, N., Nagy, É., El-Ramady, H., Fári, M., & Domokos-Szabolcsy, É. (2020a). Refining high-quality leaf protein and valuable co-products from green biomass of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for sustainable protein supply. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00696-z>
133. Kaszás, L., Alshaal, T., El-Ramady, H., Kovács, Z., Koroknai, J., Elhawwat, N., Nagy, É., Cziáky, Z., Fári, M., & Domokos-Szabolcsy, É. (2020b). Identification of Bioactive Phytochemicals in Leaf Protein Concentrate of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plants*, 9(7), 889. <https://doi.org/10.3390/plants9070889>
134. Kaszás, L., Fári, M. G., Hodossi, S., & Domokos-Szabolcsy, É. (2016). Levélfehérje-vizsgálatok a csicsóka leveles hajtásának hasznosítása érdekében. *Acta agraria Debreceniensis*, 67, 43–47.
135. Kaur, G., & Bhatia, S. (2021). Characterization of radish leaf protein concentrates for biochemical, functional properties, antioxidant activity, mineral content and microbial stability. *International Journal of Agricultural Sciences*, 17(2), 185–193. <https://doi.org/10.15740/HAS/IJAS/17.2/185-193>
136. Kay, D. E. (1979). Food legumes. *Food Legumes*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19800571331>
137. Keshan, Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing. (1979). Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and keshan disease. *Chinese Medical Journal*, 92(07), 477–482. <https://doi.org/10.5555/cmj.0366-6999.92.07.p477.01>
138. Késmárki I. (2007, május 10). A lucernatermesztés technológiai alapjai. *Agroinform Kiadó*, 2007. május 10., csütörtök 15:19:08. <https://www.agroinform.hu/szantofold/a-lucernatermesztes-technologiai-alapjai-1604>
139. Khamkhash, A., Srivastava, V., Ghosh, T., Akdogan, G., Ganguli, R., & Aggarwal, S. (2017). Mining-Related Selenium Contamination in Alaska, and the State of Current Knowledge. *Minerals*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/min7030046>

140. Kieliszek, M., Błażej, S., Gientka, I., & Bzducha-Wróbel, A. (2015). Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5373–5382. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6650-x>
141. Kim, Y. Y., & Mahan, D. C. (2003). Biological Aspects of Selenium in Farm Animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(3), 435–444. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.435>
142. Knuckles, B. E., Kohler, G. O., & De Fremery, D. (1979). Processing of fresh tobacco leaves for protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(2), 414–418. <https://doi.org/10.1021/jf60222a047>
143. Koivistoinen, P., & Huttunen, J. K. (1986). Selenium in food and nutrition in Finland. An overview on research and action. *Annals of Clinical Research*, 18(1), 13–17.
144. Kolbert, Z., Molnár, Á., Feigl, G., & Van Hoewyk, D. (2019). Plant selenium toxicity: Proteome in the crosshairs. *Journal of Plant Physiology*, 232, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.11.003>
145. Koller, L. D., & Exon, J. H. (1986). The two faces of selenium-deficiency and toxicity—Are similar in animals and man. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50(3), 297–306.
146. Kósa, C. A., Mircean, M., Taulescu, M., Turcitu, M., Oana, L., Andrásófszky, E., Joó, K., Szenci, O., & Kutasi, O. (2018). A terheléses rhabdomyolysis jellegzetességei egy székelyföldi régióban: Esetismertetések. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 11(140), 643–659.
147. Kovács, B., Prokisch, J., Györi, Z., Kovács, A. B., & Palencsár, A. J. (2000). Studies on soil sample preparation for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(11/14), 1949–1963.
148. Kovács, Z., Judit Ágnes, K., László, K., Miklós Gábor, F., Éva, D.-S., Nevien, E., & Tarek, A. (2022). Alfalfa-based green biorefinery: Experiences and challenges based on a five-year project. *Biotechnology at the University of Debrecen - 2022 International Symposium : abstract book*, 63.
149. Kovács, Z., Soós, Á., Kovács, B., Kaszás, L., Elhawati, N., Bákonny, N., Razem, M., Fári, M. G., Prokisch, J., Domokos-Szabolcsy, É., & Alshaal, T. (2021a). Uptake Dynamics of Ionic and Elemental Selenium Forms and Their Metabolism in Multiple-Harvested Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plants*, 10(7), 1277. <https://doi.org/10.3390/plants10071277>

150. Kovács, Z., Kaszás, L., Fári, M. G., & Domokos-Szabolcsy, É. (2021b). Amino acid composition and free amino acid content of processed Jerusalem artichoke green biomass. *LXIII. Georgikon Napok: Agrár-környezetgazdaságunk a járványok és a környezeti kihívások árnyékában, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus, Keszthely, Magyarország*, 12.
151. Kovács, Z., Soós, Á., Kovács, B., Kaszás, L., Elhawat, N., Razem, M., Veres, S., Fári, M. G., Koroknai, J., Alshaal, T., & Domokos-Szabolcsy, É. (2023). Nutrichemical alterations in different fractions of multiple-harvest alfalfa (*Medicago sativa* L.) green biomass fortified with various selenium forms. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05917-8>
152. Kromus, S., Wachter, B., Koschuh, W., Mandl, M., Krotscheck, C., & Narodoslawsky, M. (2004). The Green Biorefinery Austria – Development of an Integrated System for Green Biomass Utilization. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 18(1), 7–12.
153. Kulkarni, K. P., Tayade, R., Asekova, S., Song, J. T., Shannon, J. G., & Lee, J.-D. (2018). Harnessing the Potential of Forage Legumes, Alfalfa, Soybean, and Cowpea for Sustainable Agriculture and Global Food Security. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1314. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01314>
154. la Cour, R., Schjoerring, J. K., & Jørgensen, H. (2019). Enhancing Protein Recovery in Green Biorefineries by Lignosulfonate-Assisted Precipitation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 112. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00112>
155. Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (2014). Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, 94(3), 739–777. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>
156. Lamsal, B. P., Koegel, R. G., & Gunasekaran, S. (2005). Gelation of alfalfa soluble leaf proteins. *Transactions of the ASAE*, 48(6), 2229–2235. <https://doi.org/10.13031/2013.20070>
157. Lamsal, B. P., Koegel, R. G., & Gunasekaran, S. (2007). Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1520–1526. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.010>
158. Li, Y., Wang, W., Luo, K., & Li, H. (2008). Environmental behaviors of selenium in soil of typical selenosis area, China. *Journal of Environmental Sciences*, 20(7), 859–864. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62138-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62138-5)

159. Liyanage, R., Jayathilake, C., Perera, O., Kulasooriya, S., Jayawardana, B., & Wimalasiri, S. (2014). Protein and Micronutrient Contents of *Moringa oleifera* (Murunga) Leaves Collected from Different Localities in Sri Lanka. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Protein-and-Micronutrient-Contents-of-Moringa-from-Liyanage-Jayathilake/ab42c0a635a6c54ca8e0acb661ad91f5daaed3b5>
160. Llop-Tous, I., Ortiz, M., Torrent, M., & Ludevid, M. D. (2011). The Expression of a Xylanase Targeted to ER-Protein Bodies Provides a Simple Strategy to Produce Active Insoluble Enzyme Polymers in Tobacco Plants. *PLOS ONE*, 6(4), e19474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019474>
161. Lobanov, A. V., Fomenko, D. E., Zhang, Y., Sengupta, A., Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (2007). Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: Large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biology*, 8(9), R198. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r198>
162. Luo, W., Li, J., Ma, X., Niu, H., Hou, S., & Wu, F. (2019). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on uptake of selenate, selenite, and selenomethionine by roots of winter wheat. *Plant and Soil*, 438(1), 71–83. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04001-4>
163. Lyons, M. P., Papazyan, T. T., & Surai, P. F. (2007). Selenium in Food Chain and Animal Nutrition: Lessons from Nature -Review-. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(7), 1135–1155. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.1135>
164. MacFarquhar, J. K., Broussard, D. L., Melstrom, P., Hutchinson, R., Wolkin, A., Martin, C., Burk, R. F., Dunn, J. R., Green, A. L., Hammond, R., Schaffner, W., & Jones, T. F. (2010). Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement. *Archives of internal medicine*, 170(3), 256–261. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.495>
165. Mandl, M. G. (2010). Status of green biorefining in Europe. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(3), 268–274. <https://doi.org/10.1002/bbb.219>
166. Manninen, J. (2017, május 16). *Future biorefinery concepts*. IEA Bioenergy & IETS workshop on „The role of industrial biorefineries in a low carbon economy”, Gothenburg, Sweden.
167. Mariotti, M., Lobanov, A. V., Guigo, R., & Gladyshev, V. N. (2013). SECISearch3 and Seblastian: New tools for prediction of SECIS elements and selenoproteins. *Nucleic Acids Research*, 41(15), e149. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt550>
168. Martin, A. H., Castellani, O., de Jong, G. A., Bovetto, L., & Schmitt, C. (2019). Comparison of the functional properties of RuBisCO protein isolate extracted from

- sugar beet leaves with commercial whey protein and soy protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1568–1576. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9335>
169. Matos, Â. P. (2019). Microalgae as a Potential Source of Proteins. In C. M. Galanakis (Szerk.), *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* (o. 63–96). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816695-6.00003-9>
 170. Mehdi, Y., & Dufrasne, I. (2016). Selenium in Cattle: A Review. *Molecules*, 21(4), 545. <https://doi.org/10.3390/molecules21040545>
 171. Mézes, M. (2018). A rovarfehérje, mint a fehérjeellátás új alternatívája. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 64(4), 287–296.
 172. Mikkeisen, R. L., Haghnia, G. H., & Page, A. L. (1987). Effects of pH and selenium oxidation state on the selenium accumulation and yield of alfalfa. *Journal of Plant Nutrition*, 10(8), 937–950. <https://doi.org/10.1080/01904168709363621>
 173. Mikkelsen, R. L., Page, A. L., & Bingham, F. T. (1989). Factors Affecting Selenium Accumulation by Agricultural Crops. In *Selenium in Agriculture and the Environment* (o. 65–94). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub23.c4>
 174. Møller, A. H., Hammershøj, M., dos Passos, N. H. M., Tanambell, H., Stødkilde, L., Ambye-Jensen, M., Danielsen, M., Jensen, S. K., & Dalsgaard, T. K. (2021). Biorefinery of Green Biomass—How to Extract and Evaluate High Quality Leaf Protein for Food? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(48), 14341–14357. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04289>
 175. Mostert, V. (2000). Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376(2), 433–438. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1735>
 176. Moteszarezhadeh, B., Ghorbani, S., & Alikhani, H. A. (2020). The effect of selenium biofortification in alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Plant Nutrition*, 43(2), 240–250. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1676900>
 177. Muth, O. H., & Allaway, W. H. (1963). The relationship of white muscle disease to the distribution of naturally occurring selenium. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 142, 1379–1384.
 178. National Research Council (US) Subcommittee on Selenium. (1983). Effects of Excess Selenium. In *Selenium in Nutrition: Revised Edition*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216723/>
 179. Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. *Science of The Total Environment*, 400(1–3), 115–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.024>

180. Neal, R. H. (1995). Selenium. In B. J. Alloway (Szerk.), *Heavy Metals in Soils* (o. 260–283). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1344-1_12
181. Németh, A., García Reyes, J. F., Kosáry, J., & Dernovics, M. (2013). The relationship of selenium tolerance and speciation in Lecythidaceae species. *Metallomics*, 5(12), 1663. <https://doi.org/10.1039/c3mt00140g>
182. Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., & Foyer, C. H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1283–1304. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1283>
183. Nynäs, A.-L. (2018). White proteins from green leaves in food applications. *Introductory Paper at the Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science, 2018:1*. <https://res.slu.se/id/publ/94108>
184. O’Keeffe, S., Schulte, R. P. O., & Struik, P. C. (2009). Alternative use of grassland biomass in Ireland: Grass for biorefinery. *Alternative Functions of Grassland. Proceedings of the 15th European Grassland Federation Symposium, Brno, Czech Republic, 7-9 September 2009*, 297–313.
185. Orosz, S., & Tóth, T. (2016). A jó minőségű tömegtakarmány a gazdaságos termelés alapja—A melegen préselt repce. *Partnertájékoztató Hírlevél az Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. kiadványa, XVI. évfolyam* (12), 25–29.
186. Owusu-Sekyere, A., Kontturi, J., Hajiboland, R., Rahmat, S., Aliasghar zad, N., Hartikainen, H., & Seppänen, M. M. (2013). Influence of selenium (Se) on carbohydrate metabolism, nodulation and growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant and Soil*, 373(1–2), 541–552. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1815-9>
187. Parca, F., Koca, Y. O., & Unay, A. (2018). Nutritional and Antinutritional Factors of Some Pulses Seed and Their Effects on Human Health. *International Journal of Secondary Metabolite*, 331–342. <https://doi.org/10.21448/ijsm.488651>
188. Pepó, P., & Sárvári, M. (2011). Gabonanövények termesztése. Debreceni Egyetem.
189. Pecoraro, B.M., Leal, D.F., Frias-De-Diego, A. et al. The health benefits of selenium in food animals: a review. *J Animal Sci Biotechnol* 13 (58). <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00706-2>
190. Pérez, N., Peña, S., Vega, S., Noa, M., & Enríquez, R. (1997). Medicagenic acid content in foliage of ten varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivated in Mexico. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(3), 401–404.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199711\)75:3<401::AID-JSFA895>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199711)75:3<401::AID-JSFA895>3.0.CO;2-U)

191. Pickering, I. J., Wright, C., Bubner, B., Ellis, D., Persans, M. W., Yu, E. Y., George, G. N., Prince, R. C., & Salt, D. E. (2003). Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiology*, 131(3), 1460–1467. <https://doi.org/10.1104/pp.014787>
192. Pietschmann, J., Voepel, N., Voß, L., Rasche, S., Schubert, M., Kleines, M., Krause, H.-J., Shaw, T. M., Spiegel, H., & Schroeper, F. (2021). Development of Fast and Portable Frequency Magnetic Mixing-Based Serological SARS-CoV-2-Specific Antibody Detection Assay. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.643275>
193. Pilon-Smits, E. A. H. (2015). Selenium in Plants. In U. Lüttge & W. Beyschlag (Eds.), *Progress in Botany: Vol. 76* (o. 93–107). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08807-5_4
194. Pilon-Smits, E. A. H., & Quinn, C. F. (2010). Selenium Metabolism in Plants. In R. Hell & R.-R. Mendel (Eds.), *Cell Biology of Metals and Nutrients* (17, 225–241). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10613-2_10
195. Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 660S–663S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.660S>
196. Pirie, N. W. (1942). The direct use of leaf protein in human nutrition. *Chemistry & Industry*, 61, 45–48.
197. Pirie, N. W. (1966). Leaf Protein as a Human Food. *Science*, 152(3730), 1701–1705. <https://doi.org/10.1126/science.152.3730.1701>
198. Pirie, N. W. (1987). *Leaf Protein: And Its By-products in Human and Animal Nutrition*. Cambridge University Press.
199. Popp, J., Fári, M., Antal, G., & Harangi-Rákos, M. (Szerk.). (2015). A fehérjetakarmány-piac kilátásai az EU-ban, különös tekintettel Magyarország fehérjeigényének kielégítésére. *Gazdálkodás: Scientific Journal on Agricultural Economics*. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.253431>
200. Popp, J., Harangi-Rákos, M., & Oláh, J. (2018). Fehérjetakarmány függőség az EU-ban: Status quo? *Állattenyésztés és takarmányozás*, 67(4), 209–224.

201. Popp, J., Kovács, S., Oláh, J., Divéki, Z., & Balázs, E. (2021). Bioeconomy: Biomass and biomass-based energy supply and demand. *New Biotechnology*, 60, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.10.004>
202. Popp, J., Szakály, Z., Polereczki, Z., & Oláh, J. (2016). Substitution of soybean with alternative sources of protein for feed in the EU. *Hungarian Agricultural Research*, 25(2), 4–9.
203. Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., & Barceló, J. (2013). Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Science*, 212, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.012>
204. Prokisch, J., Sztrik, A., Babka, B., Zommara, M., & Daroczi, L. (2009). *New challenge in the speciation of selenium. Measurement and production on nano selenium.* <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/21432537>
205. Rafińska, K., Pomastowski, P., Wrona, O., Górecki, R., & Buszewski, B. (2017). Medicago sativa as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochemistry Letters*, 20, 520–539. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.006>
206. Raisbeck, M. F. (2000). Selenosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(3), 465–480. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30081-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30081-5)
207. Ravindran, V. (1993). Cassava leaves as animal feed: Potential and limitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(2), 141–150. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740610202>
208. Rayman, M. P. (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: How does it measure up? *British Journal of Nutrition*, 92(4), 557–573. <https://doi.org/10.1079/BJN20041251>
209. Reeves, M. A., & Hoffmann, P. R. (2009). The human selenoproteome: Recent insights into functions and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(15), 2457–2478. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0032-4>
210. Roberts, L. (2011). 9 Billion? *Science*, 333(6042), 540–543. <https://doi.org/10.1126/science.333.6042.540>
211. Sabaté, J., & Soret, S. (2014). Sustainability of plant-based diets: Back to the future. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(suppl_1), 476S–482S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071522>

212. Saltiola, T. (2020). *Cd, Hg and Pb concentration of finnish lyophilized hemp (Cannabis sativa L.) juice* (Authorea) [Preprint]. Preprints. <https://doi.org/10.22541/au.159916070.07390723>
213. Salvucci, M. E., & Anderson, J. C. (1987). Factors Affecting the Activation State and the Level of Total Activity of Ribulose Biphosphate Carboxylase in Tobacco Protoplasts 1. *Plant Physiology*, 85(1), 66–71. <https://doi.org/10.1104/pp.85.1.66>
214. Sanchez, P. A. (2002). Soil Fertility and Hunger in Africa. *Science*, 295(5562), 2019–2020. <https://doi.org/10.1126/science.1065256>
215. Santamaria-Fernandez, M., Ambye-Jensen, M., Damborg, V. K., & Lübeck, M. (2019). Demonstration-scale protein recovery by lactic acid fermentation from grass clover – a single case of the production of protein concentrate and press cake silage for animal feeding trials. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(3), 502–513. <https://doi.org/10.1002/bbb.1957>
216. Santamaría-Fernández, M., & Lübeck, M. (2020). Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, 268, 114605. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114605>
217. Scarlat, N., Dallemand, J.-F., Monforti-Ferrario, F., & Nita, V. (2015). The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: Policies and facts. *Environmental Development*, 15, 3–34. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.006>
218. Schiavon, M., Nardi, S., dalla Vecchia, F., & Ertani, A. (2020). Selenium biofortification in the 21st century: Status and challenges for healthy human nutrition. *Plant and Soil*, 453(1–2), 245–270. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04635-9>
219. Schiavon, M., Pilon, M., Malagoli, M., & Pilon-Smits, E. A. H. (2015). Exploring the importance of sulfate transporters and ATP sulphurylases for selenium hyperaccumulation—A comparison of *Stanleya pinnata* and *Brassica juncea* (*Brassicaceae*). *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00002>
220. Schmidt János. (1993). *Takarmányozástan*. Mezőgazda Kiadó. Budapest
221. Schubert, A., Holden, J. M., & Wolf, W. R. (1987). Selenium content of a core group of foods based on a critical evaluation of published analytical data. *Journal of the American Dietetic Association*, 87(3), 285–299.
222. Schwarz, K., & Foltz, C. M. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 79(12), 3292–3293. <https://doi.org/10.1021/ja01569a087>

223. Searchinger, T., Hanson, C., Ranganathan, J., Lipinski, B., Waite, R., Winterbottom, R., Dinshaw, A., Heimlich, R., Boval, M., Chemineau, P., Dumas, P., Guyomard, H., Kaushik, S., Markovsky, D., Manceron, S., & Ben Ari, T. (2014). *Creating a sustainable food future. A menu of solutions to sustainably feed more than 9 billion people by 2050. World resources report 2013-14: Interim findings.*
224. Séboussi, R., Tremblay, G. F., Ouellet, V., Chouinard, P. Y., Chorfi, Y., Bélanger, G., & Charbonneau, É. (2016). Selenium-fertilized forage as a way to supplement lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5358–5369. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10758>
225. SelenoDB. (2023). <http://selenodb.crg.eu/cgi-perl/keyword-search.pl?report=Gene&keyword=homo>
226. Sevélla B. (2011). *Biomérnöki műveletek és folyamatok*. Typotex Kiadó. Budapest <https://edu.interkonyv.hu/konyvek/biomernoki-muveletek-es-folyamatok/>
227. Shah, F. H., Salam Sheikh, A., Farrukh, N., & Rasool, A. (1980). A comparison of leaf protein concentrate fortified dishes and milk as supplements for children with nutritionally inadequate diets. *Plant Foods for Human Nutrition*, 30(3), 245–258. <https://doi.org/10.1007/BF01094029>
228. Shahid, M., Niazi, N. K., Khalid, S., Murtaza, B., Bibi, I., & Rashid, M. I. (2018). A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. *Environmental Pollution*, 234, 915–934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.019>
229. Shalaby, T. A., Bayoumi, Y., Abdalla, N., Taha, H., Alshaal, T., Shehata, S., Amer, M., Domokos-Szabolcsy, É., & El-Ramady, H. (2016). Nanoparticles, Soils, Plants and Sustainable Agriculture. In S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Eds.), *Nanoscience in Food and Agriculture 1* (o. 283–312). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39303-2_10
230. Shao, S., Mi, X., Ouerdane, L., Lobinski, R., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., Vass, A., & Dernovics, M. (2014). Quantification of Se-Methylselenocysteine and Its γ -Glutamyl Derivative from Naturally Se-Enriched Green Bean (*Phaseolus vulgaris vulgaris*) After HPLC-ESI-TOF-MS and Orbitrap MSn-Based Identification. *Food Analytical Methods*, 7(5), 1147–1157. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9728-z>
231. Sharma, H. S. S., Lyons, G., & McRoberts, C. (2011). Biorefining of perennial grasses: A potential sustainable option for Northern Ireland grassland production. *Chemical*

- Engineering Research and Design*, 89(11), 2309–2321.
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.03.004>
232. Sharma, V. K., McDonald, T. J., Sohn, M., Anquandah, G. A. K., Pettine, M., & Zboril, R. (2015). Biogeochemistry of selenium. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 13(1), 49–58. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0487-x>
233. Shini, S., Sultan, A., & Bryden, W. L. (2015). Selenium Biochemistry and Bioavailability: Implications for Animal Agriculture. *Agriculture*, 5(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041277>
234. Shukla, R., Pandey, V., Vadnere, G. P., & Lodhi, S. (2019). Chapter 18—Role of Flavonoids in Management of Inflammatory Disorders. In R. R. Watson & V. R. Preedy (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases (Second Edition)* (o. 293–322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00018-0>
235. Simon L., Bíró B., Széles É., & Balázs S. (2007). Szelén fitoextrakciója és mikrobacsoportok előfordulása szennyezett talajokban. *Agrokémia és Talajtan*, 56(1), 161–172. <https://doi.org/10.1556/agrokem.56.2007.1.12>
236. Simon, L., Széles, É., Kovács, B., Prokisch, J., & Győri, Z. (2006). Phytoextraction of selenium from contaminated soils with Indian mustard, fodder radish and alfalfa. *Trace Elements in the Food Chain. Proceedings of an International Symposium on Trace Elements in the Food Chain, Budapest, Hungary, 25-27 May, 2006*, 40–44.
237. Sinclair, S. (2009). *Protein extraction from pasture. Literature review Part A: The plant fractionation bio-process and adaptability to farming systems*. AgResearch Ltd.
238. Singh, A. K., Singh, S. S., Prakash, V., Kumar, S., & Dwivedi, S. K. (2015). Pulses Production in India: Present Status, sent Status, Bottleneck and Way Forward. *Journal of AgriSearch*, 2(2), Article 2.
239. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
240. Sirotkin, A. V., & Kolesarova, A. (2022). Chapter 4—Plant molecules and their influence on health and female reproduction. In A. V. Sirotkin & A. Kolesarova (Eds.), *Environmental Contaminants and Medicinal Plants Action on Female Reproduction* (o. 245–399). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824292-6.00004-0>
241. Slade, R. E., & Birkinshaw, J. H. (1938). *Improvements in, or relating to the utilization of grass and other green crops* (Patent Sz. British Patent, No. 511525.).

242. Smil, V. (1999). Detonator of the population explosion. *Nature*, 400(6743), Article 6743.
<https://doi.org/10.1038/22672>
243. Sodamade, A., Bolaji, O. S., & Adeboye, O. O. (2013). Proximate Analysis, Mineral Contents and Functional Properties of Moringa Oleifera Leaf Protein Concentrate. *Journal of Applied Chemistry*.
https://www.academia.edu/5334453/Proximate_Analysis_Mineral_Contents_and_Functional_Properties_of_Moringa_Oleifera_Leaf_Protein_Concentrate
244. Staswick, P. E. (1994). Storage Proteins of Vegetative Plant Tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45(1), 303–322.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.001511>
245. Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., De Riccardis, F., Leitz, R., & Oleszek, W. (2001a). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and Luteolin Glycosides from Aerial Parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 753–758.
<https://doi.org/10.1021/jf000876p>
246. Stochmal, A., Simonet, A. M., Macias, F. A., & Oleszek, W. (2001b). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 2. Tricin and Chrysoeriol Glycosides from Aerial Parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5310–5314.
<https://doi.org/10.1021/jf010600x>
247. Stoffaneller, R., & Morse, N. L. (2015). A Review of Dietary Selenium Intake and Selenium Status in Europe and the Middle East. *Nutrients*, 7(3), 1494–1537.
<https://doi.org/10.3390/nu7031494>
248. Subba Rau, B. H., Ramana, K. V. R., & Singh, N. (1972). Studies on nutritive value of leaf proteins and some factors affecting their quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23(2), 233–245. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740230211>
249. Sun, H., Mu, T., Xi, L., Zhang, M., & Chen, J. (2014). Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves as nutritional and functional foods. *Food Chemistry*, 156, 380–389.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.079>
250. Sun, P., Wang, J., Liu, W., Bu, D. P., Liu, S. J., & Zhang, K. Z. (2017). Hydroxy-selenomethionine: A novel organic selenium source that improves antioxidant status and selenium concentrations in milk and plasma of mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9602–9610. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12610>
251. Surai, P. F., & Fisinin, V. I. (2016). Selenium in Livestock and Other Domestic Animals. In D. L. Hatfield, U. Schweizer, P. A. Tsuji, & V. N. Gladyshev (Eds.), *Selenium: Its*

- Molecular Biology and Role in Human Health* (595–606). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41283-2_50
252. Suzuki, Y., Nishiyama, K., Takano, Y., Tajiri, T., & Sakurayama, H. (1959). Studies on the selenium content of various food stuffs, fertilizers and the human hairs. *Tokushima Journal of Experimental Medicine*, 6, 243–249.
 253. Sztrik, A. (2016). *Nanométerű elemiszelén-részecskék előállítása és vizsgálata a talaj-növény-állat rendszerben* [Doktori disszertáció]. Debreceni Egyetem.
 254. Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., Cieslak, A., Kozłowska, M., Kuznicki, D., Kowalczyk, M., & Oleszek, W. (2019). Structural and quantitative changes of saponins in fresh alfalfa compared to alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2243–2250. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9419>
 255. Tacon, A. G. J. (2022). Contribution of Fish and Seafood to Global Food and Feed Supply: An Analysis of the FAO Food Balance Sheet for 2019. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2022.2124364>
 256. Tamás M. (2016). *Eltérő típusú talajokon termesztett búza szeléntartalmának és szelénformáinak vizsgálata Románia különböző tájegységein* [Doktori disszertáció, Debreceni Egyetem]. <http://hdl.handle.net/2437/222317>
 257. Tamayo Tenorio, A. (2017). *Sugar beet leaves for functional ingredients* [PhD, Wageningen University]. <https://library.wur.nl/WebQuery/wda/2210962>
 258. Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., de Jong, G. A. H., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chemistry*, 203, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>
 259. Tanambell, H., Møller, A. H., Corredig, M., & Dalsgaard, T. K. (2022). RuBisCO from alfalfa – native subunits preservation through sodium sulfite addition and reduced solubility after acid precipitation followed by freeze-drying. *LWT*, 154, 112682. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112682>
 260. Tangl, H. (1949). Kísérletek újabb nagyértékű lucernaliszt előállítására. *Agrártudomány*, 1(4), 456–460.
 261. Tangl, H. (1955). A takarmányok tartósítása a fehérje-ellátás szolgálatában. *Agrártudományi Közlemények*, 6, 308–326.
 262. Telek, L. (1979). Preparation of leaf protein concentrates in lowland humid tropics. In *Tropical Food: Chemistry and Nutrition* (659–683). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370902-8.50022-8>

263. Telek, L. (1983). *Leaf protein extraction from tropical plants* (o. 78–125). U.S. Department of Agriculture, Tropical Agriculture Research Station, Mayaguez, Puerto Rico. <http://www.princeton.edu/~ota/disk3/1983/8315/831508.PDF>
264. Telek, L., & Graham, H. D. (Szerk.). (1983). *Leaf protein concentrates*. AVI Pub. Co.
265. Terry, N., Zayed, A. M., de Souza, M. P., & Tarun, A. S. (2000). Selenium in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51(1), 401–432. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.401>
266. Tiwari, B. K., & Singh, N. (2012). *Pulse Chemistry and Technology*. Royal Society of Chemistry.
267. Trofast, J. (2011). Berzelius' discovery of selenium. *Chemistry International*, 33(5), 16–19.
268. Tso, T. C. (1990). Organic metabolism tobacco proteins. In T. C. Tso (Szerk.), *Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant* (o. 487). Ideals Inc.
269. Tso, T. C., & Kung, S. D. (1983). Soluble proteins in tobacco and their potential use. In L. Telek & H. D. Graham (Szerk.), *Leaf protein concentrates* (o. 117–129). AVI Publishing Company, Inc.
270. USDA ARS, A. R. S. (2018). *Selenium-Accumulating Plants: USDA ARS*. <https://www.ars.usda.gov/pacific-west-area/logan-ut/poisonous-plant-research/docs/selenium-accumulating-plants/>
271. van Zuuren, E. J., Albusta, A. Y., Fedorowicz, Z., Carter, B., & Pijl, H. (2014). Selenium Supplementation for Hashimoto's Thyroiditis: Summary of a Cochrane Systematic Review. *European Thyroid Journal*, 3(1), 25–31. <https://doi.org/10.1159/000356040>
272. Veres, Z., Kim, I. Y., Scholz, T. D., & Stadtman, T. C. (1994). Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), 10597–10603. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34101-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34101-7)
273. Vinczeffy, I. (2004). Legelőink különleges értékei. *Gyepgazdálkodási Közlemények*, 2(1–2), 5–24.
274. Wadehra, A., Patil, P. S., Hussain, S. A., singh, A. K., Tomar, S. K., & Chavan, R. S. (2018). Applications of supercritical fluid extraction in the food industry. In *Technological Interventions in Dairy Science*. Apple Academic Press.
275. Wang, Q., Zhang, Y., Hu, H., Hu, J., Xiang, M., & Yang, Q. (2021). Comparative proteomics analysis of the responses to selenium in selenium-enriched alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.039>

276. Wang, Y., Zhao, Y., Xue, F., Nan, X., Wang, H., Hua, D., Liu, J., Yang, L., Jiang, L., & Xiong, B. (2020). Nutritional value, bioactivity, and application potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a neotype feed resource. *Animal Nutrition*, 6(4), 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.001>
277. Welch, R. M., Graham, R. D., & Cakmak, I. (2013). *Linking Agricultural Production Practices to Improving Human Nutrition and Health*. FAO/WHO: Rome, Italy, 7-16.
278. White, P. J. (2016). Selenium accumulation by plants. *Annals of Botany*, 117(2), 217–235. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv180>
279. WHO. (2011). Selenium in drinking-water: Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. In *WHO Guidelines for Drinking-water Quality: Köt. No. WHO/SDE/WSH/03.04/13*. WHO Press.
280. Willett, W. C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., & Trichopoulos, D. (1995). Mediterranean diet pyramid: A cultural model for healthy eating. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(6), 1402S-1406S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.6.1402S>
281. Winkel, L. H. E., Vriens, B., Jones, G. D., Schneider, L. S., Pilon-Smits, E., & Bañuelos, G. S. (2015). Selenium Cycling Across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review. *Nutrients*, 7(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/nu7064199>
282. Xiu, S., & Shahbazi, A. (2015). Development of Green Biorefinery for Biomass Utilization: A Review. *Trends in Renewable Energy*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.17737/tre.2015.1.1.008>
283. Xu, X.-M., Carlson, B. A., Irons, R., Mix, H., Zhong, N., Gladyshev, V. N., & Hatfield, D. L. (2007). Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochemical Journal*, 404(1), 115–120. <https://doi.org/10.1042/BJ20070165>
284. Zhang, W., Grimi, N., Jaffrin, M. Y., Ding, L., & Tang, B. (2017). A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology: A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(12), 2894–2900. <https://doi.org/10.1002/jctb.5364>
285. Zhang, X., He, H., Xiang, J., Yin, H., & Hou, T. (2020). Selenium-Containing Proteins/Peptides from Plants: A Review on the Structures and Functions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(51), 15061–15073. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05594>

286. Zhu, Z., Chen, Y., Shi, G., & Zhang, X. (2017). Selenium delays tomato fruit ripening by inhibiting ethylene biosynthesis and enhancing the antioxidant defense system. *Food Chemistry*, 219, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.138>
287. Zosel, A. (1964). Der Schubmodul von Hochpolymeren als Funktion von Druck und Temperatur. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 199(2), 113–125. <https://doi.org/10.1007/BF01499216>
288. Zsombik, L. (2018). Alternatív fehérjenövények: Lehetőség vagy örök ígéret? *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 67(4), 225–236.

13. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/86/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Zoltán

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Élelmiszertudományi doktori program

MTMT azonosító: 10066391

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Kovács, Z.**, Soós, Á., Kovács, B., Kaszás, L., Elhawati, N. A., Razem, M., Veres, S., Fári, M., Koroknai, J., Alshaal, T. A. A. I., Domokos-Szabolcsy, É.: Nutrichemical alterations in different fractions of multiple-harvest alfalfa (*Medicago sativa* L.) green biomass fortified with various selenium forms.
Plant Soil. [Epub ahead of print], 1-23, 2023. ISSN: 0032-079X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-023-05917-8>
IF: 4.993 (2021)
2. **Kovács, Z.**, Soós, Á., Kovács, B., Kaszás, L., Elhawati, N. A., Bákonny, N., Razem, M., Fári, M., Prokisch, J., Domokos-Szabolcsy, É., Alshaal, T. A. A. I.: Uptake Dynamics of Ionic and Elemental Selenium Forms and Their Metabolism in Multiple-Harvested Alfalfa (*Medicago sativa* L.).
Plants-Basel. 10 (7), 1-24, 2021. ISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants10071277>
IF: 4.658

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (8)

3. Domokos-Szabolcsy, É., Yavuz, S. R., Picoli, E. A. d. T., Fári, M., **Kovács, Z.**, Tóth, C., Kaszás, L., Alshaal, T. A. A. I., Elhawati, N. A.: Green biomass-based protein for sustainable feed and food supply: An overview of current and future prospective.
Life (Basel). 13 (2), 1-37, 2023. ISSN: 0024-3019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life13020307>
IF: 3.251 (2021)





4. Domokos-Szabolcsy, É., Elhawát, N. A., Domingos, G. J., **Kovács, Z.**, Koroknai, J., Bodó, E., Fári, M., Alshaal, T. A. A. I., Bákonyi, N.: Comparison of Wet Fractionation Methods for Processing Broccoli Agricultural Wastes and Evaluation of the Nutri-Chemical Values of Obtained Products.
Foods. 11 (16), 1-18, 2022. EISSN: 2304-8158.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/foods11162418>
IF: 5.561 (2021)
5. Abdalla, N., Ragab, M. I., El, M. S., Arafa, N., Kaszás, L., **Kovács, Z.**, Domokos-Szabolcsy, É., Taha, H. S.: Biochemical Assessments of some Important Components in Tubers, Leaves and Calli Cultures of Three Jerusalem Artichoke Cultivars.
Env. Biodiv. Soil Security. 4, 267-275, 2020. EISSN: 2536-9423.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21608/jenvbs.2020.42184.1106>
6. Kaszás, L., Alshaal, T. A. A. I., El-Ramady, H., **Kovács, Z.**, Koroknai, J., Elhawát, N. A., Nagy, É., Cziáky, Z., Fári, M., Domokos-Szabolcsy, É.: Identification of Bioactive Phytochemicals in Leaf Protein Concentrate of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.).
Plants-Basel. 9 (7), 1-17, 2020. ISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants9070889>
IF: 3.935
7. Kaszás, L., Alshaal, T. A. A. I., **Kovács, Z.**, Koroknai, J., Elhawát, N. A., Nagy, É., El-Ramady, H., Fári, M., Domokos-Szabolcsy, É.: Refining high-quality leaf protein and valuable co-products from green biomass of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for sustainable protein supply.
Biomass Conv. Bioref. 10, 1-16, 2020. ISSN: 2190-6815.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13399-020-00696-z>
IF: 4.987
8. Kaszás, L., Alshaal, T. A. A. I., El-Ramady, H., **Kovács, Z.**, Koroknai, J., Elhawát, N. A., Nagy, É., Cziáky, Z., Fári, M., Domokos-Szabolcsy, É.: Finding valuable bioactive components from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) 2 leaf protein concentrate in a green biorefinery concept.
bioRxiv Plant Biology [Epub ahead of print], 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1101/866178>
9. Omara, A. E. D., Elsakhawy, T., Alshaal, T. A. A. I., El-Ramady, H., **Kovács, Z.**, Fári, M.: Nanoparticles: a Novel Approach for Sustainable Agro-productivity.
Env. Biodiv. Soil Security. 3, 29-62, 2019. ISSN: 2536-9415.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21608/jenvbs.2019.7478.1050>
10. Kaszás, L., **Kovács, Z.**, Nagy, É., Elhawát, N. A., Abdalla, N., Domokos-Szabolcsy, É.: Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a potential chlorophyll source for humans and animals nutrition.
Env. Biodiv. Soil Security. 2 (1), 1-9, 2018. ISSN: 2536-9415.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21608/JENVBS.2018.2942.1022>





Magyar nyelvű konferencia közlemények (1)

11. **Kovács, Z.**, Domokos-Szabolcsy, É., Fári, M.: Az Ereky processz rekonstruálása: lucerna zöldlé és hordozó keverékek vizsgálata.
In: Növénynevelés a 21. század elején: kihívások és válaszok : XXV. Növénynevelési Tudományos Nap 2019. Szerk.: Karsai Ildikó, Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Tudományos Bizottsága., Budapest, 359-362, 2019. ISBN: 9789638351456

Idegen nyelvű konferencia közlemények (2)

12. Domokos-Szabolcsy, É., **Kovács, Z.**, Kaszás, L., Koroknai, J., Fári, M.: Élő növényi zöld biomassza, mint értékes fehérje és fitonutrient forrás = Green biomass of perennial crops as valuable source of protein and phytonutrients.
In: VII. Nemzetközi Tudományos Napok : 17 th International Scientific Days : A tudományos napok publikációi. Szerk.: Bujdosó Zoltán, Dinya László, Csernák József, Károly Róbert Nonprofit Kft., Gyöngyös, 298-305, 2020. ISBN: 19786155969027
13. Bákonny, N., **Kovács, Z.**, Tóth, I. O., Barna, D., Fári, M., Alshaal, T. A. A. I.: To study the secondary element contents (Ca, Mg, S) of deproteinized leaf juice of selected alfalfa varieties at different harvest time.
In: Arcs vagy háttal a jövőnek? : LX. Georgikon Napok, tanulmánykötet. Szerk.: Pintér Gábor, Zsiborács Henrik, Csányi Szilvia, Pannon Egyetem Georgikon Kar, Keszthely, 11-15, 2018.

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (5)

14. **Kovács, Z.**, Domokos-Szabolcsy, É., Alshaal, T. A. A. I., Elhawati, N. A., Fári, M.: Lucerna (*Medicago sativa* L.) gyökérmikrobiális közösségének javítása hatékonyabb fehérje biofinomítás és stressztűrési érdekében.
In: XXIV. Növénynevelési Tudományos Nap : Összefoglalók. Szerk.: Karsai Ildikó, Polgár Zoltán, Keszthelyi Burgonyáért Egyes, Keszthely, 98, 2018. ISBN: 9786150014692
15. Kaszás, L., **Kovács, Z.**, Nagy, É., Domokos-Szabolcsy, É.: Csicsóka genotípusok szelekciója fehérje-takarmányozási célból.
In: XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap : Összefoglalók. Szerk.: Veisz Ottó, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, 110, 2017. ISBN: 9789638351449
16. Matus, G., **Kovács, Z.**, Kovásznai-Oláh, R., Béregi, B., Balogh, R., Hanyicska, M., Jambor, J., Novák, T., Antal, K., Budai, J., Papp, M.: Juh endozoochoria szerepe kis nyírségi védett terület *Corynephorum*-ában.
Bot. közl. 102 (2), 163-163, 2015. ISSN: 0006-8144.





17. Matus, G., **Kovács, Z.**, Kovásznai-Oláh, R., Béregi, B., Balogh, R., Hanyicska, M., Jámbor, I.:
Juh endozoochoria természetvédelmi szerepe nyírségi védett területen.
In: IX. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia : "Tudományoktól a döntéshozatalig"
: absztrakt-kötet. Szerk.: Lengyel Szabolcs, Magyar Biológiai Társaság : MTA Ökológiai
Kutatóközpont ; Szeged : Szegedi Tudományegyetem Ökológiai Tanszék, Budapest, 84-85,
2014.
18. Hanyicska, M., Matus, G., Antal, K., Lőkös, L., Budai, J., Balogh, R., Béregi, B., **Kovács, Z.**,
Kovácsnai-Oláh, R., Papp, M.: Legelészikizárás hatása kelet-magyarországi szárazgyepekben
= Impact of the extrusion of grazing at the dry-grassland on Eastern-Hungary.
In: X. Aktuális Flóra- és Vegetációkutatás a Kárpát-medencében : nemzetközi konferencia =
Recent Flora- and Vegetation Research in the Carpathian Basin X. : International
Conference. Szerk.: Schmidt Dávid, Kovács Miklós, Bartha Dénes, Nyugat-magyarországi
Egyetem, Erdőmérnöki Kar, Növénytani és Természetvédelmi Intézet, Sopron, 157-158,
2014. ISBN: 9789633341537

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (6)

19. **Kovács, Z.**, Koroknai, J., Kaszás, L., Fári, M., Domokos-Szabolcsy, É., Elhawat, N. A., Alshaal,
T. A. A. I.: Alfalfa-based green biorefinery: experiences and challenges based on a five-year
project.
In: Biotechnology at the University of Debrecen - 2022 International Symposium : abstarct
book, Faculty of Science and Technology, Department of Molecular Biotechnology and
Microbiology, Institute of Biotechnology and Faculty of Agricultural and Food Sciences and
Environmental Management, Central Laboratory of Agricultural and Food Products,
Debrecen, 63-63, 2022. ISBN: 9789634904687
20. Domokos-Szabolcsy, É., Veres, S., Kovács, S., Bákonyi, N., Makleit, P., Elhawat, N. A., **Kovács,**
Z., Kaszás, L., Alshaal, T. A. A. I., Fári, M.: From crops in field to space plants grown in
ground bioregenerative life-support facilities: the potential of green biorefining with reflecting
the environmental challenges.
In: Biotechnology at the University of Debrecen - 2022 International Symposium : abstarct
book, Faculty of Science and Technology, Department of Molecular Biotechnology and
Microbiology, Institute of Biotechnology and Faculty of Agricultural and Food Sciences and
Environmental Management, Central Laboratory of Agricultural and Food Products,
Debrecen, 22-22, 2022. ISBN: 9789634904687
21. Kaszás, L., **Kovács, Z.**, Koroknai, J., Alshaal, T. A. A. I., Elhawat, N. A., Fári, M., Domokos-
Szabolcsy, É.: Possible uses of jerusalem artichoke (*Heliathus Tuberosus* L.) for green
biorefining.
In: Biotechnology at the University of Debrecen - 2022 International Symposium : abstarct
book, Faculty of Science and Technology, Department of Molecular Biotechnology and
Microbiology, Institute of Biotechnology and Faculty of Agricultural and Food Sciences and
Environmental Management, Central Laboratory of Agricultural and Food Products,
Debrecen, 61-61, 2022. ISBN: 9789634904687





22. **Kovács, Z.**, Alshaal, T. A. A. I., Elhawati, N. A., Kaszás, L., Koroknai, J., Prokisch, J., Fári, M., Domokos-Szabolcsy, É.: Agronomic fortification to enhance the organic selenium content of alfalfa green biomass.
In: 4th National Conference of Young Biotechnologists "FIBOK 2020" online conference : abstract book. Ed.: by Tünde Pusztahelyi, Levente Czeglédi, Éva Domokos-Szabolcsy, Tamás Emri, Debreceni Egyetem, Debrecen, 29, 2020. ISBN: 9789634902720
23. Kaszás, L., **Kovács, Z.**, Koroknai, J., Domokos-Szabolcsy, É.: Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) green biomass as a potential protein source.
New Biotech. 44, S101, 2018. ISSN: 1871-6784.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.980>
24. **Kovács, Z.**, Fári, M., Kaszás, L., Koroknai, J., Csatári, G., Domokos-Szabolcsy, É.: Obtention of functional leaf protein concentrate (F-LPC) based on Ereky-process: historical survey and preliminary results.
New Biotech. 44, S100-S101, 2018. ISSN: 1871-6784.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.978>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,385

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,651**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.03.27.



14. NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 20.....

.....

a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Kovács Zoltán doktorjelölt 2018-2022 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 20.....

.....

a témavezető aláírása

15. MELLÉKLETEK

1. sz. melléklet: tenyészedényes kísérletből származó levélfehérje-koncentrátum- (LFK) minták proteinogén aminosav összetétele, mintára vonatkoztatva az első és a negyedik, utolsó betakarítás alkalmával.

Levélfehérje-koncentrátum (LFK) aminosav összetétele 1. betakarítás								
aminosav (m/m%)	Kontroll	1 Se(VI)	10 Se(VI)	1 Se(IV)	10 Se(IV)	50 Se(IV)	10 Se0	50 Se0
Asp	3,05	3,13	2,97	2,81	3,15	2,82	3,14	3,42
Thr	1,40	1,48	1,33	1,40	1,55	1,37	1,52	1,61
Ser	1,30	1,43	1,27	1,40	1,47	1,31	1,42	1,46
Glu	3,90	4,13	2,86	3,38	3,92	3,44	3,74	3,71
Pro	3,40	3,02	2,23	3,33	2,69	2,24	2,42	2,67
Gly	2,50	2,23	1,43	1,82	2,00	1,63	1,88	1,87
Ala	2,70	2,39	1,54	2,03	2,08	1,70	2,03	2,01
Cys	0,80	0,53	0,74	0,73	0,34	0,13	0,24	0,28
Val	2,50	2,33	1,54	2,60	2,09	1,64	1,91	1,89
Met	0,70	0,90	0,90	0,99	0,41	0,29	0,29	0,30
Ile	2,15	1,96	1,43	1,77	1,81	1,45	1,64	1,60
Leu	4,35	3,98	2,54	3,43	3,50	2,82	3,24	3,23
Tyr	2,20	1,91	1,33	1,72	1,53	1,23	1,45	1,48
Phe	3,30	2,70	1,86	2,60	2,51	2,02	2,35	2,40
His	1,25	1,22	0,80	1,04	0,90	0,71	0,85	0,90
Lys	4,55	4,24	2,65	3,38	3,20	2,79	3,07	3,07
Arg	2,80	2,12	1,38	1,72	2,17	1,57	1,79	1,86
Összes	42,85	39,70	28,78	36,14	35,32	29,15	32,99	33,74
Levélfehérje-koncentrátum (LFK) aminosav összetétele 4. betakarítás								
aminosav (m/m%)	Kontroll	1 Se(VI)	10 Se(VI)	1 Se(IV)	10 Se(IV)	50 Se(IV)	10 Se0	50 Se0
Asp	3,18	3,26	3,20	3,14	3,31	3,17	2,73	2,92
Thr	1,58	1,58	1,50	1,52	1,62	1,55	1,36	1,38
Ser	1,49	1,51	1,43	1,43	1,52	1,45	1,27	1,31
Glu	3,91	3,77	3,66	3,49	3,64	3,55	3,39	3,31
Pro	2,60	2,35	2,25	1,38	1,60	1,50	2,16	2,20
Gly	2,04	1,87	1,74	1,42	1,59	1,50	1,62	1,63
Ala	2,27	2,12	1,95	1,73	1,89	1,79	1,69	1,72
Cys	0,27	0,22	0,21	0,17	0,17	0,21	0,23	0,29
Val	2,18	1,99	1,89	1,80	1,90	1,85	1,65	1,69
Met	0,29	0,43	0,45	0,29	0,24	0,42	0,27	0,37
Ile	1,89	1,75	1,65	1,51	1,56	1,55	1,44	1,47
Leu	3,54	3,13	3,00	2,53	2,76	2,70	2,86	2,91
Tyr	1,70	1,60	1,47	1,18	1,26	1,23	1,25	1,27
Phe	2,70	2,54	2,34	1,82	1,90	1,84	1,99	2,03
His	0,98	0,98	0,89	0,61	0,65	0,64	0,73	0,77
Lys	3,23	2,89	2,70	2,19	2,48	2,37	2,78	2,80
Arg	2,05	2,19	1,98	1,50	1,39	1,61	1,76	1,82
Összes	35,90	34,16	32,31	27,65	29,49	28,93	29,17	29,88

2. sz. melléklet: tenyészedényes kísérletből származó rostminták proteinogén aminosav-összetétele, mintára vonatkoztatva az első és a negyedik, utolsó betakarítás alkalmával.

Rostminták aminosav összetétele 1. betakarítás								
aminosav (m/m%)	Kontroll	1 Se(VI)	10 Se(VI)	1 Se(IV)	10 Se(IV)	50 Se(IV)	10 Se0	50 Se0
Asp	1,13	1,23	1,07	1,15	1,13	0,78	1,12	1,01
Thr	0,46	0,49	0,42	0,47	0,46	0,35	0,50	0,47
Ser	0,47	0,52	0,46	0,51	0,48	0,37	0,53	0,47
Glu	1,15	1,05	0,96	1,02	1,00	0,73	1,02	0,94
Pro	0,75	0,55	0,67	0,73	0,78	0,55	0,72	0,60
Gly	0,63	0,58	0,48	0,57	0,53	0,39	0,56	0,47
Ala	0,65	0,57	0,47	0,56	0,54	0,39	0,55	0,47
Cys	0,08	0,08	0,11	0,08	0,09	0,11	0,15	0,13
Val	0,60	0,54	0,45	0,51	0,50	0,38	0,52	0,47
Met	0,08	0,13	0,09	0,07	0,13	0,06	0,15	0,13
Ile	0,57	0,47	0,42	0,43	0,43	0,32	0,45	0,40
Leu	1,08	0,89	0,72	0,86	0,84	0,60	0,87	0,74
Tyr	0,43	0,32	0,32	0,34	0,31	0,25	0,36	0,34
Phe	0,74	0,63	0,51	0,62	0,57	0,43	0,59	0,54
His	0,28	0,28	0,21	0,25	0,25	0,18	0,26	0,27
Lys	1,19	1,10	0,91	1,06	1,01	0,76	1,08	0,94
Arg	0,79	0,43	0,37	0,44	0,46	0,35	0,45	0,40
Összes	11,07	9,87	8,64	9,67	9,50	7,02	9,88	8,78
Rostminták aminosav összetétele 4. betakarítás								
aminosav (m/m%)	Kontroll	1 Se(VI)	10 Se(VI)	1 Se(IV)	10 Se(IV)	50 Se(IV)	10 Se0	50 Se0
Asp	1,05	1,02	1,06	0,96	0,97	1,04	1,07	0,98
Thr	0,44	0,41	0,46	0,41	0,40	0,46	0,50	0,46
Ser	0,48	0,45	0,49	0,44	0,42	0,48	0,56	0,51
Glu	0,88	0,89	0,90	0,86	0,83	0,99	1,01	0,46
Pro	0,76	0,71	0,23	0,62	0,21	0,84	0,50	0,96
Gly	0,49	0,49	0,54	0,51	0,49	0,55	0,54	0,50
Ala	0,50	0,49	0,51	0,47	0,46	0,52	0,58	0,52
Cys	0,07	0,10	0,08	0,08	0,06	0,07	0,03	0,04
Val	0,44	0,53	0,47	0,46	0,46	0,52	0,56	0,53
Met	0,05	0,20	0,12	0,16	0,08	0,12	0,06	0,07
Ile	0,39	0,44	0,44	0,43	0,41	0,49	0,48	0,48
Leu	0,77	0,86	0,83	0,76	0,75	0,85	0,85	0,78
Tyr	0,32	0,34	0,37	0,33	0,26	0,37	0,33	0,30
Phe	0,53	0,58	0,62	0,53	0,53	0,62	0,54	0,50
His	0,23	0,23	0,23	0,25	0,22	0,24	0,22	0,19
Lys	0,95	0,93	1,05	0,96	0,92	1,05	0,92	0,84
Arg	0,38	0,43	0,51	0,39	0,39	0,42	0,37	0,33
Összes	8,70	9,10	8,91	8,62	7,85	9,63	9,11	8,45