



A kép illusztráció / Picture is for illustration only

Kiss Dóra^{1,3}, Juhászné Tóth Réka^{1,3}, Zurbó Zsófia^{1,4}, Csapó János^{1,2}

Érkezett: 2020. január – Elfogadva: 2020. március

Élelmiszerek aminosav összetételének meghatározása fotometriás módszerekkel, 1. rész

A tirozin, a triptofán és a fenilalanin meghatározása

KULCSSZAVAK: aminosavak meghatározása, fehérje hidrolízis, esszenciális aminosavak, aminosavak színreakciói, fotometria, tirozin, fenilalanin, triptofán.

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Élelmiszerek aminosav összetételének meghatározására manapság leginkább az ioncserés oszlopkromatográfiát (IEC) ninhidrinnel történő oszlop utáni származékképzéssel, és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) oszlop előtti származékképzéssel alkalmazzák. A maga nemében mindkét módszer kiváló akár speciális feladatok megoldására, akár a fehérje összes aminosavainak meghatározására. A módszerek azonban olyan célműszereket (IEC), vagy speciális eszközöket (HPLC) igényelnek, melyek drágák, és működtetésük magasan szakképzett analitikusokat igényel, amit kisebb laboratóriumok, gyártásközi ellenőrzést végző üzemi egységek nem engedhetnek meg maguknak. Az általunk javasolt módszerek, megfelelő mintaelőkészítés után egy olyan UV-VIS spektrofotométerrel megvalósíthatók, amelyek képesek az aromás aminosavak és a színes aminosav származékok mérésére a 200-800 nm tartományban.

Ebben a közleményünkben az összes aminosav ninhidrinnel történő meghatározására, az aromás aminosavak együttes meghatározására, a tirozin és a triptofán együttes mennyiségének mérésére, a tirozin, a triptofán és a fenilalanin külön-külön történő meghatározásra kidolgozott fotometriás módszerekről számolunk be. Ezen módszerek közül a legalkalmasabbakat szeretnénk kvantitatívvá fejleszteni, és alkalmazhatóvá tenni élelmiszervizsgáló laboratóriumok számára. Mivel a triptofán indol csoportja a fehérjék hidrolízisének alkalmazott 6 mólos sósavas hidrolízis során gyakorlatilag teljesen elbomlik, ebben a közleményben ismertetjük azokat a fehérje hidrolízis módszereket is, amelyek alkalmasak élelmiszerek triptofán tartalmának meghatározására.

2. Bevezetés

Az aminosavak olyan szerves vegyületek, amelyek molekulái karboxil- és amino-csoportot tartalmaznak. A természetben aránylag kis mennyiségben fordulnak elő szabad állapotban, de a fehérjékben

azonban kimagasló jelentőségűek az élő szervezetek számára, mivel a heterotrof élőlények legfőbb aminosavforrása a táplálékokkal bejuttatott fehérjék lebontásából származik. Az élő szervezetekben az emésztés során a fehérjék 20 féle aminosavra bomlanak le, amelyek egy része esszenciális a szervezet számára

¹ Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertechnológiai Intézet

² SAPIENTIA Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar, Élelmiszertudományi Tanszék

³ Debreceni Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

⁴ Debreceni Egyetem, Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

(fenilalanin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofán, valin). Az az esszenciális aminosav, amely a táplálékban a szervezet szükségleteihez képest a legkisebb mennyiségben fordul elő, a limitáló aminosav [4, 5, 8, 20, 49].

Az élelmiszerek aminosav-összetételét a legtöbb laboratóriumban ioncserés oszlopkromatográfiával (IEC), vagy annak elvén működő automatikus aminosav-analizátorral [7, 9, 16, 20, 28], illetve nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzák meg [9, 20]. A szükséges készülékek beszerzése és működtetése azonban igen költséges, melyet egy kisebb laboratórium nem engedhet meg magának. Ezért vizsgálataink célja olyan fotometriás módszerek kidolgozása, melyekkel az aminosavak mérése egyszerűen, nagyműszerek alkalmazása nélkül megoldható. Ezen módszerekkel a nagyműszerekkel nem rendelkező laboratóriumokban is lehetővé válhat néhány esszenciális aminosav meghatározása.

3. Fehérjék hidrolízise

A fehérje aminosav összetételének meghatározása előtt a fehérjét hidrolizálni kell szabad aminosavakra. A fehérje hidrolízis nemzetközileg elfogadott módszerét Moore és Stein [35] dolgozták ki, melynek során élelmiszerek és takarmányok esetében a minta fehérjetartalmától függően 20-200 mg anyagot mérnek be, és a hidrolízist 6 M sósavval végzik 110 ± 1 °C-on, 24 órán át. Ilyen körülmények között a triptofán (Trp) 40-60%-ban, szénhidrátok jelenlétében pedig teljesen lebomlik, ezért a savas hidrolízis módszereket sokan módosították. Freedlander és Haber [12] a Trp bomlásának kiküszöbölésére a 6 M HCl-hoz 0,5% 1,4-bután-ditiolt, Matsubara és Sasaki [33] 2-4% tioglikolsavat, Gruen és Nichols [15] 3-(3-indolil)-propionsavat, James [26] pedig felváltva tioglikolsavat, merkaptó-propionsavat, merkaptó-szukcinsavat és oxálsavat adagolva tudták a Trp bomlását részben meggátolni. Liu és Chang [30] 0,2% 3-(2-amino-etil)-indol (triptamin) tartalmú 3 M para-toluol-szulfonsavval, Liu [31] 4 M metán-szulfonsavval, Penke és mtsai. [40] pedig 3 M merkaptó-etán-szulfonsavval hidrolizálták a fehérjét a Trp meghatározását megelőzően. Csapó és mtsai. [6] 3 M merkaptó-etán-szulfonsavval, magas hőmérsékleten (160, 170, 180 °C) és rövid ideig (30-60 perc) hidrolizálták a fehérjét, amelynek során a Trp kitermelése az összes savas módszerrel összehasonlítva a legmagasabb, és ugyanez elmondható volt a metionintartalomra is. A savas módszerekkel tökéletes sikert nem tudtak elérni, ezért Liu [31] szerint csakis alkalikus hidrolízissel lehet a Trp-tartalmat kvantitatíve meghatározni.

A fehérjék bárium-hidroxidos hidrolízisét először Homer [21] alkalmazta a Trp-tartalom meghatározására. Jorpes [27] 5 M NaOH-dal hidrolizálta a fehérjét, és a Trp-t 78-98%-ban kapta vissza. Höller [24] nátrium-hidroxiddal hidrolizálva a fehérjét megállapította, hogy mind a szabad, mind a peptidkötésben

lévő Trp részben elbomlik a bázikus hidrolízis alatt. Shizuko-Isole [45] és Dreeze [11] szerint a hidrolízist nitrogénatmoszféra alatt végezve meg lehet akadályozni a szabad Trp elbomlását.

Warner [48] szerint a nátrium-hidroxidos hidrolízis lassúbb, mint a bárium-hidroxidos, és a nátriumot sokkal nehezebb a rendszerből eltávolítani, mint a báriumot. Bárium-hidroxidot alkalmazva hidrolizáló ágensként Dreeze [11] megállapította, hogy a hidrolízis gyorsabb, és a Trp még keményítő jelenlétében sem bomlik le. Miller [34] a báriumot bárium-szulfát alakban távolította el az oldatból, aminek során a csapadék Trp adszorpciója minimális. Dévényi és mtsai. [10] 4 M nátrium-hidroxiddal hidrolizálták a fehérjét, majd a lúgot sósavval közömbösítették, melyet követően a hidrolizátumot közvetlenül kromatografálták.

Noltmann és mtsai. [37] tanulmányából úgy tűnik, hogy a triptofántartalom meghatározásakor a legcélravezetőbbnek a bárium-hidroxidos hidrolízis látszik, hisz itt a hidrolízis viszonylag gyorsan lejátszódik, és a báriumot a nátriumnál lényegesen könnyebben el lehet távolítani. Úgy tűnik, hogy a bárium szulfát alakban való eltávolítása célravezetőbb, mivel a bárium nátrium-szulfáttal való kicsapása semleges oldatból nem okoz triptofán adszorpciót.

4. A fehérjék aminosav-összetételének meghatározása fotometriás módszerekkel

4.1. Az összes aminosav mennyiségének meghatározására ninhidrines színreakcióval (ninhidrin-pozitív vegyületek)

A hidrolizált minta összes aminosav tartalmának meghatározására kiválóan alkalmazható a ninhidrin (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione), amely 4 és 8 közötti pH-tartományban az aminosavakat aldehiddé, szén-dioxiddá és ammóniává alakítja át. Az ammónia reakcióba lép a ninhidrin feleslegével, amelynek eredményeként az α -aminosavak esetén intenzív kék és lila színű vegyület, hidrindantin keletkezik, melynek fényelnyelési maximuma 570 nm, ahol az aminosavak mennyisége meghatározható. Az iminosavak, a prolin, és a hidroxil-prolin hasonló körülmények között sárga színű vegyületet képeznek a ninhidrinnel, melynek fényelnyelési maximuma 440 nm-nél van [43, 50]. A reakció az aminosavakon kívül méri a mintában lévő összes egyéb ninhidrin pozitív vegyületet is, de mivel ezek mennyisége az élelmiszerekben elhanyagolható, a reakció alkalmas az összes aminosav közelítő pontosságú mérésére.

4.2. Az aromás aminosavak (tirozin, fenilalanin, triptofán) mennyiségének együttes meghatározása spektrofotometriával ultraibolya tartományban

A fehérjealkotó aminosavak közül csak a három aromás aminosavnak (tirozin, fenilalanin, triptofán) van abszorpciós maximuma az ultraibolya tartományban, 280 nm-en. A három aminosav mennyisége, megfe-

lelő minta előkészítést követően, származékképzés nélkül mérhető. Előnye, hogy gyors és egyszerű, mivel nem kell a méréshez a fehérjét kémiai reakcióba vinni. Ezzel a módszerrel tehát a három aminosav együttes mennyisége határozható meg, abban az esetben, ha az oldatok fehérjekoncentrációja 20 és 3000 µg/ml közötti [25, 44, 46]. Fontos azonban a megfelelő oldószer kiválasztása, hiszen számos oldószernek jelentős UV-abszorpciója van az aromás aminosavak fényelnyelési sávjában.

4.3. A tirozin és triptofán együttes mennyiségének meghatározása

A xantoprotein reakció során a koncentrált salétromsav reagál az aminosav oldalláncát alkotó aromás maggal, amelynek eredménye egy sárga színű termék, melynek mennyisége fotometriásan meghatározható. A fenilalanin aromás gyűrűje nem reagál a salétromsavval, így ezzel a reakcióval csak a tirozin és a triptofán együttes mennyisége határozható meg. Hassan [17] 16 M salétromsavat, 5 M nátrium-hidroxidot és etilalkoholt használt a tirozin és triptofán mennyiségének meghatározásához. Az oldatok fényelnyelését 360 és 430 nm hullámhosszon vizsgálta.

4.4. Tirozin mennyiségének fotometriás meghatározása

A tirozin specifikusan kimutatható a Millon reagens (higany-dinitrát salétromsavas oldata) használatával, mivel a tirozin az egyetlen aminosav, amely fenil oldalláncot tartalmaz. A reakció során tirozin fenil csoportja első lépésben reagál a salétromsavval, majd a higany ionokkal komplexet képezve téglavörös színreakciót ad. A keletkezett termék színintenzitása spektrofotometriásan mérhető 500 nm hullámhosszon, az abszorbanciából a tirozin mennyisége számolható. A meghatározás azonban csak abban az esetben specifikus a tirozinra, ha a minta nem tartalmaz egyéb fenolos csoporttal rendelkező vegyületet [32, 41].

Grau [14] egy módosított Millon reakciót alkalmazott a fehérje tirozin-tartalmának meghatározására. A mintában lévő tirozin mennyiségének meghatározásához higany-szulfát-reagenst és nátrium-nitritet használt, a keletkezett vörös színű oldat fényelnyelését 475 nm hullámhosszon vizsgálta. Nem tapasztalt színreakciót, ha a módszert a fenilalanin, a hisztidin vagy a triptofán mennyiségének meghatározására próbálta alkalmazni.

4.5. Triptofán mennyiségének fotometriás meghatározása

A szabad vagy peptidkötésben lévő triptofán színes terméket képez a para-toluol-szulfonsavval, a para-dimetil-amino-benzaldehiddel és az N-bróm-szukcinimiddel. Ezek a származékképző reagensek képezik a triptofán fotometriás meghatározásának az alapját, amelynek során a kvantitatív meghatározásnál kapott

színt hasonlítják a jól ismert koncentrációjú standard színéhez, ami rendszerint szabad triptofánból áll. Spies és Chambers [47] 19 M kénsavas közegben határozták meg a minták Trp-tartalmát para-dimetil-amino-benzaldehiddel (DAB). Az oldatok fényelnyelését 580-620 nm hullámhossz tartományban vizsgálták. Húsminyak Trp-tartalmát Rékásiné és mtsai. [42] szintén para-dimetil-amino-benzaldehiddel 9,5 M kénsavas közegben határozták meg, melynek során a színtelen kondenzációs termék nátrium-nitrit hatására kék színű vegyületté oxidálódott, melynek fényelnyelését 590 nm hullámhosszon vizsgálták. A vizsgált fehérje hidrolízisével a helyzet egyszerűsödik, hisz a Trp oldatba megy, és színe hasonlóan határozható meg.

A fotometriás módszerek közül a N-bróm-szukcinimides meghatározás nem terjedt el a gyakorlatban, és ugyanez elmondható a jégecet-vas(III)-klorid reagenssel létrehozott színreakcióra is. Ez utóbbi esetben a keletkezett vörös színű oldatot 545 nm-en fotometrálnak gabona magvak Trp-tartalmát határozták meg [38]. A para-dimetil-amino-benzaldehides módszert viszont többen alkalmazták mind a hidrolizálatlan fehérje, mind a hidrolizátum Trp-tartalmának meghatározására. Érdekes módszert közölnek a Trp fotometriás meghatározására Basha és Roberts [3], akik a Trp-t nátrium-nitrittel oxidálták, és az oxidált terméket N-1(naftil)-etilén-diamino-dihidro-kloriddal reagáltatták, majd a kapott bíbor-rózsaszín anyagot 550 nm-en fotometrálták.

A triptofán indolcsoportja az ultraibolya tartományban fényelnyelést mutat, ami ugyancsak felhasználható mennyiségének meghatározására. Oldható fehérjék esetében az UV-abszorpciót 280-288 nm-en mérik. Az ultraibolya fényelnyelés a bármely oldatba vitt fehérje, valamint a hidrolizátum fényelnyelésének mérésére is alkalmas.

A triptofán mennyiségének meghatározására használható a Hopkins-Cole teszt [13], melynek alapja, hogy a triptofán indolgyűrűje reagál a Hopkins-Cole reagens (gloxilsav) és kénsav elegyével, melynek eredménye egy ibolya vagy lila színű termék. A keletkezett színes termék fényelnyelését 545 nm hullámhosszon vizsgálták. Koshland és mtsai. [2, 22] speciális reagensként 2-hidroxi-5-nitro-benzil-bromidot használták a triptofán tartalom fotometriás meghatározására. A keletkezett színes termékek fényelnyelését 300 és 410 nm közötti hullámhossz tartományban vizsgálták. Horton és Tucker [23] kimutatták, hogy a dimetil-(2-hidroxi-5-nitro-benzil)-szulfonium-só felhasználható a fehérjék triptofán-tartalmának spektrofotometriás meghatározására 3-as pH mellett. Ez a vízzel oldható szulfonium-só előnyösebb meghatározást tesz lehetővé, mint a vízben oldhatatlan 2-hidroxi-5-nitrobenzil-bromid.

Mulder és Bakema [36] a triptofán tartalmát Brummer módszerével becsülték meg. A módszer alapja a vörös-ibolya szín kialakulása vanillinnel, erősen sa-

vas oldatban. A módszer csak fehérje hidrolizátumok esetében alkalmazható, mert a mintában lévő egyéb anyagok zavarják a szín kialakulását. A triptofán-tartalom meghatározásához a vanillin mellett kénsavat és nátrium-szulfidot használtak fel. Az oldatok fényelnyelését 605 nm hullámhosszon vizsgálták.

Összegezve: a Trp fotometriás meghatározását legcélszerűbb a para-dimetil-amino-benzaldehides színreakcióval végezni, de szükség esetén az ecetsav és a glioxál, vagy az n-1(naftil)-etilén-diamino-dihidro-klorid és a Trp között létrejött szín intenzitásának mérése is javasolható.

4.6. A fenilalanin mennyiségének fotometriás meghatározása

A fehérje-hidrolizátum fenilalanin tartalmának kolorimetriás meghatározása Kapeller-Adler [29] által leírt két alapvető elvre épül: a tirozin és hisztidin által okozott zavaró hatás megszüntetése és a fenilalanin mennyiségi nitrálása, illetve redukciója a diacil-o-dinitro-benzoosav ibolya színű ammóniumsójává. A fotometriás mérést 520 és 580 nm hullámhossz tartományban végezték.

Albanese [1] a Kapeller-Adler módszert tovább fejlesztette, a hisztidin zavarását permutittal (szintetikus zeolittal) szüntette meg, a koncentrált ammónium-hidroxid helyett pedig ammónium-szulfátot, illetve nátrium hidroxidot használt. Ennek oka, hogy az ammónium-hidroxidot veszélyesnek tartotta a kísérletet végző személy egészségére, illetve a reagens ammónia koncentrációjának napi változásai befolyásolták a szín intenzitását.

Hess és Sullivan [19] kutatásai alapján a fenilalanin kolorimetriás meghatározásához szükséges annak nitrálása, a cinkkel és sósavval képződött dinitro-fenil-alanin redukciója, és enyhén savas oldatban a 2-naftokinon-4-nátrium-szulfonát-oldattal történő reakciója, melynek eredménye egy vörös színű vegyület. Az oldatok fényelnyelését 560 nm hullámhosszon vizsgálták. A hisztidin és a tirozin a reakciót nem zavarják. A kálium-permanganát oldattal történő előzetes kezelés megakadályozta a triptofán zavarását anélkül, hogy az befolyásolta volna a fenilalaninból képződő szín kialakulását.

Grau [14] a fenilalanin mennyiségének meghatározásához a mintát tartalmazó lombikot szárítószekrényben 110-120 °C-os hőmérsékleten szárította mindaddig, amíg a minta teljesen meg nem száradt, vagy nem kapott egy sűrű szirupot. Ezután adta hozzá a mintához a kálium-nitrát tömény kénsavban készült oldatát. A nitrálás 30 percig 110-120 °C hőmérsékleten történt. A lombik lehűtése után a fenilalanin mennyiségének meghatározásához hidroxil-amin-hidrokloridot, ammónium-szulfátot és nátrium-hidroxidot használt. Az oldatok fényelnyelését 550 nm hullámhosszon vizsgálta.

Henry és mtsai. [18] a Kapeller-Adler módszert módosítva a fehérjék hidrolízisét pikrinsavval végezték el. A meghatározáshoz a pikrinsavas hidrolízist követően kálium-nitrát tömény kénsavas oldatát, hidroxil-amin-hidrokloridot, illetve tömény ammónium-hidroxid oldatot használtak. A fotometrálist 550 és 560 nm hullámhossz tartományban végezték.

Pan és Perlman [39] két módosítást hajtottak végre az eredeti Kapeller-Adler módszerben. Az eljárás során, amikor tömény ammónium-hidroxidot adtak a koncentrált kénsavhoz, nagy mennyiségű hő keletkezett, amelynek hatására az oldat esetenként kicsapott a kémcsövekből, ez jelentős veszteségeket okozott. Kísérleteik során a probléma kiküszöbölését kisebb mennyiségű nitráló reagens hozzáadásával oldották meg. A vizsgálat elvégzésének megkönnyítésére szolgáló második módosítás, a minták szárazra párolásához szükséges idő lerövidítéséből állt. A mintaoldatokat tartalmazó kémcsövek 50-70 °C-os vízfürdőbe merítették, és gyengéd levegőáramot vezettek át a folyadék felületén. Ennek köszönhetően néhány, üvegből készült befűvőcső alkalmazásával számos mintát egyidőben lehet beszárítani.

5. Következtetések

Az egyes aminosavak mennyiségének meghatározását megelőzően a fehérjét 6 mólos sósavval hidrolizálják, majd a hidrolízist követi az aminosavak fotometriás meghatározása. A fehérje Trp-tartalma ilyen körülmények között, az indol csoport labilitása következtében, elbomlik, ezért a Trp meghatározása során vagy speciális savas fehérjehidrolízis módszereket (3 mólos merkaptó-etán-szulfonsav, 3 mólos para-toluol-szulfonsav, 4 mólos metán szulfonsav), vagy speciális védőreagenseket (1,4-bután-ditiol, tioglikolsav, 3-(3-indolil)-propionsav, 3-(2-aminoetil)-indol, kell alkalmazni. A másik lehetőség a triptofán meghatározás során a lúgos hidrolízis, melyet 4 mólos nátrium-hidroxiddal, vagy bárium hidroxiddal végeznek. Magas fehérjetartalom esetén a hidrolizátum nátrium-ion tartalma nem zavarja a meghatározást, a bárium-hidroxidos meghatározás előnye pedig az, hogy a báriumot könnyebb eltávolítani a hidrolizátumból, mint a nátriumot.

A hidrolizátum összes aminosav tartalma a ninhidrines színreakcióval, 570 nm-en meghatározható, a prolin és a hidoxi-prolin mennyiségéről pedig a 440 nm-en mért abszorbancia ad felvilágosítást. Az aromás aminosavak (tirozin, fenilalanin, triptofán) együttesen mérhetők 280 nm-en, az ultraibolya tartományban. Ezen a hullámhosszon a három aminosav meghatározását a többi élelmiszer összetevő általában nem zavarja.

A xantoprotein reakcióval, mivel a fenilalanin aromás gyűrűje nem reagál a salétromsavval, a tirozin és a triptofán együttes mennyisége határozható meg 360, illetve 430 nm hullámhosszon. Mivel a tirozin az egyetlen aminosav, mely fenil oldalláncot tartalmaz,

ezért a Millon reakció, melynek során a tirozin téglavörös színreakciót ad a salétromsavval és a higany ionokkal, specifikus a tirozinra. Az oldat fényelnyelését 475 nm-en vizsgálták, ahol nem zavart a fenilalanin, a hisztidin vagy a triptofán jelenléte.

A fehérje triptofán-tartalma színes vegyületet képez a para-toluol-szulfonsavval, a para-dimetil-amino-benzaldehiddel, az N-bróm-szukcin-imiddel, a nátrium-nitrit és az N-1(naftil)-etilén-diamin-dihidro-kloriddal, valamint a jégecet-vas(III)-klorid reagenssel, mely színreakciók képezik a triptofán fotometriás meghatározásának alapját. A módszerek között leginkább a para-dimetil-amino-benzaldehides eljárás terjedt el a gyakorlatban, melyet többen alkalmaztak különböző fehérjék triptofán tartalmának meghatározására. Használták ezen kívül még a glioxilsav és a kénsav elegyével (Hopkins-Cole test), a 2-hidroxil-5-nitro-benzil-bromiddal és a dimetil-(2-hidroxil-5-nitro-benzil)-szulfonsavval végzett származékképzést is, ezek a módszerek azonban nem terjedtek el a gyakorlatban.

A fehérje fenilalanin tartalmának meghatározása során ki kell küszöbölni a tirozin és a hisztidin zavaró hatását, melyet követhet a fenilalanin nitrálása és a származékképzés diacil-o-nitrobenzooesavval, melyet 570 nm-en fotometráltak. Alkalmos a nitrálást követő származékképzésre a 2-naftokinon-4-nátrium-szulfonát is, melynél a hisztidin és a tirozin zavaró hatásával nem kell számolni, valamint a hidroxil-amin-hidrokloriddal, az ammónium-szulfáttal és a nátrium hidroxiddal végzett származékképzés is.

Összességében tehát elmondható, hogy mindhárom aromás oldalláncot tartalmazó aminosavra ismert olyan színreakció szakirodalomból, melyet kvantitatív meghatározássá lehet fejleszteni.

6. Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.3-VE-KOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.