SZENT ISTVÁN EGYETEM

ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR, BUDAPEST

Sör- és Szeszipari Tanszék

Különböző kapszulázási technikák alkalmazása *Bifidobacterium lactis* Bb-12 sejtek rögzítésére

TDK Dolgozat

Ecsedy Anna Lilla

IV. évfolyam BSc. hallgató

Témavezetők: **Dr. Bujna Erika,** egyetemi adjunktus

Ta Phuong Linh, PhD hallgató

Budapest

2019

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS 1
2. CÉLKITŰZÉSEK 2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 3
3.1. Funkcionális élelmiszerek 3
3.2. Probiotikumok 4
3.2.1. Tejsavbaktériumok 5
3.2.2. Bifidobaktériumok 5
3.3. Probiotikumok élettani hatásai 6
3.4. Prebiotikumok 8
3.4.1. Rezisztens keményítő 9
3.4.2. Laktoszukróz 9
3.4.3. Laktulóz 10
3.5. Probiotikumok mikrokapszulázása 10
3.5.1. Mikrokapszulázás élelmiszeripari alkalmazása 11
3.5.2. Gasztrointesztinális tranzit 12
3.5.3. Technológiai lehetőségek 13
3.6. Micellás rendszerek alkalmazása 14
3.6.1. Nioszóma 15
3.6.2. Nioszóma kialakítási technológiák 16
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 18
4.1. Felhasznált mikroorganizmus 18
4.2. Felhasznált anyagok és oldatok 18
4.2.1. Alkalmazott táplevesek 18
4.2.2. Az extrúziós kapszulázási technika során alkalmazott anyagok 20
4.2.3. Nioszómák előállításához felhasznált anyagok 21
4.2.4. Szimulált emésztőrendszeri kísérlethez alkalmazott oldatok 22
4.3. Alkalmazott módszerek 22
4.3.1. *Bifidobacterium lactis* tenyésztése 22
4.3.2. Sejtszám meghatározás 22
4.3.3. Sejtkapszulázási módszerek 23
4.3.4. Kapszulázási hatékonyság meghatározása 25
4.3.5. Mikroszkópos vizsgálat 25
4.3.6. Szimulált emésztőrendszeri vizsgálat 25
4.3.7. Hőkezelési kísérlet 26

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 27
5.1. Különböző tápközegek összehasonlítása a *Bifidobacterium lactis* felszaporítása céljából 27
5.2. Sejtek bezárása extrúziós technikával 29
5.2.1. Kapszulák mérete és morfológiai tulajdonságai 29
5.2.2. Kapszulázási hatékonyság 30
5.3. Sejtek bezárása nioszómák előállításával 31
5.3.1. Mikroszkópos vizsgálat 31
5.4. A gyöngyökbe zárt sejtek életképességének vizsgálata 32
5.4.1. Emésztés hatásának vizsgálata 33
5.4.2. Hőkezelés hatásának vizsgálata 35
6. ÖSSZEFOGLALÁS 37
7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK 40

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre nagyobb hangsúly kerül a helyes táplálkozásra, a vásárlók egyre tudatosabbak, központba került az élelmiszerminőség, amihez a piac is folyamatosan próbál alkalmazkodni. Ma már köztudott, hogy a rohanó életmóddal sok esetben együttjáró táplálkozás, a gyorsételek, alacsony tápértékű élelmiszerek fogyasztása rendkívül káros hatással van az egészségre. Az immunrendszer legyengül, fogékonyabb lesz a kórokozókkal, allergiás reakciókkal, valamint az úgynevezett civilizációs betegségekkel szemben, mivel saját védekező, tolerancia mechanizmusai nem működnek megfelelően, többek között a gyér, vitaminhiányos táplálkozásnak köszönhetően.

Kutatások során kiderült, hogy egészségünk fenntartásához a tápanyagcsatornánkban megfelelő mennyiségű, velünk szimbiózisban élő probiotikus baktériumra van szükségünk. Ezt születés után az anyatejjel természetes módon megkapjuk, melytől kezdve kialakul a saját mikrobiótánk. Ezek az élő, probiotikus baktérium kolóniák anyagcseréjükkel biztosítják többek között szervezetünk immunitását. A probléma abból adódik, hogy az élelmiszer-feldolgozás, a különböző élelmiszer-tartósítási módszerek, illetve az emésztési körülmények hatására drasztikusan lecsökkenhet az emberi bélbaktériumok száma. Ezt tovább súlyosbíthatja a túlzott antibiotikum fogyasztás, mely felborítja mikrobiótánk egyensúlyát azáltal, hogy a kóros baktériumokkal együtt a számunkra hasznos baktériumokat is elpusztítja. Ezen okokból kifolyólag szükségessé vált a probiotikus baktériumok visszajuttatása a szervezetbe, tehát a funkcionális élelmiszerek, probiotikumok, valamint probiotikumokkal dúsított élelmiszerek fogyasztása.

A probiotikus baktériumok mikrokapszulázása egy ígéretes megoldás lehet a kedvezőtlen külső körülmények ellen, mivel biztosíthatja a probiotikumok életképességének megőrzését az adott termékben, valamint a probiotikus baktériumok megfelelő mennyiségben juthatnak el rendeltetési helyükre a szervezetben. Mikrokapszulázott probiotikus termékek rendszeres fogyasztásával lehetségessé válhatna szervezetünk egészséges mikrobióta egyensúlyának visszaállítása, valamint fenntartása, így megelőzve az esetleges betegségeket.

Ezek alapján dolgozatomban a mikrokapszulázási módszerekre, ezen belül is az extrúziós technikára, valamint a micellás rendszer alapú, nioszomális sejtkapszulázásra helyeztem a hangsúlyt, és egy probiotikus törzsön keresztül a kapszulázási módszerek megvalósíthatóságát, eredményességét vizsgáltam.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám során célom két kapszulázási technika megvalósítása volt a probiotikus *Bifidobacterium lactis* Bb-12 baktériumtörzs kapszulákba való rögzítésével, életképességük fokozása érdekében. Az egyik módszer a széles körben elterjedt extrúziós mikrokapszulázási technika, a másik pedig a probiotikumok nioszómákba történő kapszulázása volt. Tekintve, hogy eddig a nioszómák leginkább hatóanyag-szállító rendszerként való alkalmazása került középpontba, probiotikumok nioszomális kapszulázásáról eddig még nincsenek tudományos adatok.

Továbbá az eredményesebb kapszulázási eljárást kiválasztva, célul tűztem ki a probiotikum túlélőképességének vizsgálatát szimulált emésztőrendszeri és hőkezelési kísérletek során.

A kutatás során az alábbi részfeladataim voltak:

- A *Bifidobacterium lactis* tömegtenyésztéséhez megfelelő tápközeg kiválasztása, különös tekintettel a nitrogénforrásra. A kiválasztott tápközegben a probiotikum felszaporítása a kapszulázási kísérletekhez.
- Az alkalmazott probiotikus törzs mikrokapszulázása extrúziós eljárással, különböző kapszula alkotóanyagokkal megvalósítva, az alginát mellett - mely széles körben elterjedt a mikrokapszulák mátrixának kialakítására - különböző prebiotikumok (rezisztens keményítő, laktoszukróz és laktulóz) alkalmazásával.
- Kapszulázási hatékonyság meghatározása a sejtszámok alapján.
- A probiotikus *B. lactis* sejtek nioszomális kapszulázása:
    - vékonyréteg hidratációs eljárással - a pronioszóma (vékonyréteg) előállítása maltodextrinnel kiegészítve, majd hidratálása során a *B. lactis* kapszulázása és nioszómák létrehozása -
    - valamint szonikálással.

  Végül az így előállított sejtszuszpenzió fénymikroszkópos vizsgálata.
- A probiotikum életképességének vizsgálata:
    - *in vitro* emésztési kísérlettel, gyomorsavas és/vagy epesavas kezeléseket,
    - valamint hőkezeléseket követően.

Kísérleteimet a Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar Sör- és Szeszipari Tanszékén végeztem.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Funkcionális élelmiszerek

A „funkcionális élelmiszerek” kifejezés Japánból származik az 1980-as évekből. Nincs általánosan elfogadott definíciójuk, mivel inkább egy látásmódot képviselnek, mintsem egy jól definiálható élelmiszer csoportot (Diplock et al., 1999). Korunkban a táplálkozástudomány irányzata visszakanyarodott Hippokratész 2500 évvel ezelőtt megfogalmazott tanához, miszerint a funkcionális élelmiszerek alapgondolata a következő: „Gyógyszered legyen az ételed, s ételed legyen a gyógyszered!” (Thomson et al., 1999). Ez egyben azt is jelenti, hogy hozzájárulnak az egyén egészségi, fizikai és pszichés állapotának javításához is, azonban kizárólag természetes hatóanyagok segítségével (Figler et al., 2004).

1991-ben hozták létre a funkcionális élelmiszerekre vonatkozó, célzott egészségre vetített előnyökkel rendelkező élelmiszerkategóriát, a FOSHU-t (Foods for Specified Health Use). A FOSHU-ként azonosított élelmiszerek kötelesek biztosítani a késztermék jótékony egészségügyi vagy élettani hatását, az egyes összetevők önmagában kifejtett hatására vonatkozó adatok nem elegendőek. Jelenleg a legtöbb elismert FOSHU termék oligoszacharidokat vagy tejsavbaktériumokat tartalmaz a bélrendszer egészségének elősegítésére. Európában a Functional Food Science in Europe (FUFOSE) 1999-ben a következő definíciót ajánlotta a funkcionális élelmiszerek meghatározására: Az élelmiszer akkor tekinthető funkcionálisnak, ha a megfelelő táplálkozásélettani hatásokon túlmenően, a szervezet egy vagy több célfunkciójára bizonyítottan jótékony hatással van, mindezt az egészségi állapot javításával, bizonyos betegségek kialakulási kockázatának csökkentésével éri el. Továbbá a termékek kizárólag élelmiszer formájában kínálhatóak, nem lehetnek tabletták vagy kapszulák, minden esetben beilleszthetőeknek kell lenniük a normális étrendbe. Ezen felül hatásukat már a szokásos fogyasztási mennyiségnél is ki kell fejteniük (Diplock et al., 1999).

A táplálkozási szakemberek hagyományosan a kiegyensúlyozott étrend meghatározására törekedtek, amely biztosítja a tápanyagok megfelelő arányú bevitelét. Az utóbbi időben azonban a hangsúly az optimalizált táplálkozás elérésére került, melynek célja az élettartam és életminőség maximalizálása az élelmiszer összetevők azonosítása révén. Többek között ennek is eredményei a funkcionális élelmiszerek, melyeknek célja a kiegyensúlyozott étrendet kiegészítve, a betegségekkel szembeni rezisztencia növelése és az általános egészségi állapot fokozása (Gibson és Williams, 2000).

A funkcionális élelmiszerek speciális területét képezik a pre-és probiotikumokkal dúsított élelmiszerek, melyeknek az élelmiszer- és gyógyszeriparban történő alkalmazhatóságát napjainkban is vizsgálják (Figler et al., 2004).

3.2. Probiotikumok

Rendkívül nagy számban és sokféleségben élnek mikrobák az emberi bélrendszerben, a bőrben, a száj- és orrüregekben, az urogenitális traktusban, valamint az emberi test bármely olyan részében, amely kapcsolatban áll a külvilággal, és ahol a körülmények kedvezőek a baktériumok túlélésére. A probiotikus elmélethez a kolonizáló mikrobák hatásainak felismerése vezetett, tehát az arra való igény, hogy az egészségre pozitív hatással lévő mikrobákat elősegítsük, azonban a behatoló patogéneket visszaszorítsuk (Sanders, 2000).

A „probiotikum" görög eredetű szó, jelentése „életért". A probiotikumok olyan élő mikrobiális élelmiszer alkotók, melyek jótékony hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre a bélmikrobióta egyensúlyának fenntartásával (Fuller, 1989). 2002-ben az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) és az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a következőképpen definiálta a probiotikumokat: Élő mikroorganizmusok, amelyeket, ha megfelelő mennyiségben fogyasztunk, pozitív élettani hatást fejtenek ki a gazdaszervezetre (Joint FAO/WHO Working Group, 2002).

A probiotikumok fogyasztása számos testhelyet érinthet (a száj, a bélrendszer, a légzőrendszer, a bőr, a húgyúti rendszer stb.), és alkalmazása specifikus emberi szubpopulációkat is célozhat: egészséges egyéneket, gyermekeket, időskorúakat, betegeket, valamint genetikai hajlammal rendelkező egyéneket. A lehetséges biológiai hatások rendkívül sokszínűek, és folyamatosan újabb funkciók után kutatnak (Vandenplas et al., 2015). A probiotikumokat tartalmazó funkcionális élelmiszerek hatékonyságát befolyásolja a fogyasztók általi elfogadottság, valamint a probiotikumok életképességének megőrzése a gyártás során. Az élelmiszeripar ajánlása alapján a fogyasztás pillanatában az élő sejtek számának célszerű elérnie a 10^6 TKE/g-ot, ahhoz, hogy a szervezetben ki tudják fejteni pozitív hatásukat (Sarao és Arora, 2017).

A probiotikumok 2 fő nemzetségre, tejsavbaktériumokra és bifidobaktériumokra oszthatóak, mindemellett ismertek probiotikus *Streptococcus, Eubacterium, Saccharomyces, Enterococcus* és *E. coli* törzsek is (Szakály, 2004).

3.2.1. Tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumok Louis Pasteur nevéhez fűződnek, aki 1857-ben fedezte fel a tejsavas erjedés mikrobáit, melyek Gram-pozitív, pálca vagy kokkusz alakú baktériumok. Általános jellemzőjük a savtűrőképesség, valamint a szaporodásukhoz szükséges változatos tápanyagigény (aminosavak és vitaminok). A tejsavas erjedés két eltérő biokémiai úton mehet végbe, megkülönböztethetünk homo- és heterofermentatív erjedést. A tejsavbaktériumoknak kiemelkedő szerepe van az élelmiszerek fermentációjában, valamint az emberi- és állati szervezetekben, de léteznek kórokozó fajaik is (Deák et al., 2006).

A legismertebb probiotikus tejsavbaktérium törzsek főleg a *Lactobacillus*, és kisebb arányban a *Streptococcus* nemzetséghez tartoznak. Nagy előnyük, hogy törzsenként eltérő mértékben, képesek túlélni a gyomorban uralkodó savas körülményeket, és a vékonybél epesóján és emésztőenzimein keresztül eljutnak a vastagbélbe, ahol a bélfalon megtapadva kolonizálódni, szaporodni képesek (Szakály, 2004).

A tejsavbaktériumok a probiotikus aktivitású baktériumok legkiemelkedőbb tagjai, nem meglepő tehát, ha a jelenleg is piacon lévő probiotikus termékek nagy része tejtermék (joghurt, sajt, kefír). Az első probiotikusnak minősített élelmiszert Japánban hozták forgalomba 1994-ben, egy „Yakult” elnevezésű probiotikus joghurtot (Figler et al., 2004).

3.2.2. Bifidobaktériumok

A bifidobaktériumokat először 1900-ben Henry Tissier írta le, és a megfigyelt baktériumot morfológiája alapján *Bacillus bifidus*-nak nevezte el. A *Bifidobacterium*-ok Gram-pozitív, szigorúan anaerob pálcák, gyakran Y alakúak (Mitsuoka, 1990).

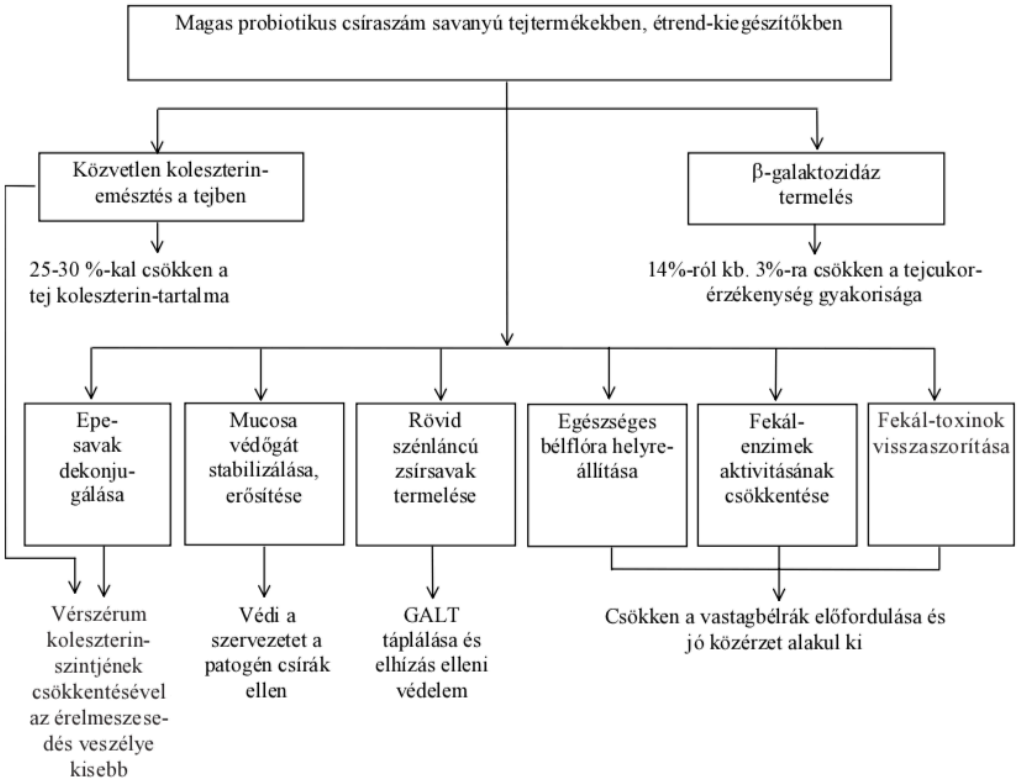
A bifidobaktériumokat csecsemők esetében a legfontosabb probiotikus baktérium csoportnak tekintik, mivel az anyatej prebiotikumainak köszönhetően kolonizálják a tápanyagcsatornát, és létrehozzák a bélmikrobiótát. Érdekesség, hogy míg csecsemők esetén 95-98%-os hasznos baktérium arány jellemző, felnőtteknél ez az egészséges arány körülbelül 40-45%-ra csökken, de voltak olyan felmérések, melyek csupán 1-2%-os hasznos baktérium arányt mutattak ki (Szakály, 2004).

A *Bifidobacterium* az egészséges gyerekek és felnőttek bélmikrobiótájának is egyik fő mikroorganizmusa, mely számtalan pozitív hatásának köszönhetően hozzájárul az egészségi állapot fenntartásához. Életkortól függően a *Bifidobacterium* törzsek típusa is változik, csecsemők szervezetéből izolált *Bifidobacterium* törzsek javarészben *B. breve* és *B. infantis*, míg a gyerekek, felnőttek és időskorúak bélrendszeréből izolált baktériumok *B. longum* és *B. adolescentis* törzsekhez tartoznak (Mitsuoka, 1990).

3.3. Probiotikumok élettani hatásai

A probiotikumok szervezetben játszott nélkülözhetetlen szerepét és jótékony hatását már 1989-ben Fuller és munkatársai is megfogalmazták, és azóta is számtalan kutatás folyik a velünk szimbiózisban élő probiotikumok szerteágazó funkcióinak felderítéséről. A következőkben a probiotikus baktériumok élettani hatásai közül néhányat emelek ki.

Az 1. ábrán a probiotikumok gyakran emlegetett, szervezetünkre gyakorolt jótékony hatásai láthatóak. Ezek közé tartozik például a probiotikus baktériumok béta-galaktozidáz termelése, mely jelentős mértékben csökkenti a tejcukor-érzékenység kialakulását, valamint a koleszterin közvetlen emésztése és az epesavak dekonjugálása, melyek a vérszérum alacsony koleszterinszintje által csökkentik az érelmeszesedés kockázatát (Szakály, 2004).



1. ábra: A probiotikumok jótékony hatásai (Szakály, 2004)

Az egészséges mikrobiom fenntartása a probiotikumok antimikrobás hatása révén (szerves savak, hidrogén-peroxid, bakteriocinek termelése) valósul meg, csökkentik a fekál-enzimek aktivitását, visszaszorítják a toxinokat és a patogén mikroorganizmusokat, így a vastagbélrák kialakulásának kockázatát is csökkentik. A bélnyálkahártya erősítése révén pedig szignifikánsan gátolják számos enteropatogén baktérium bélfalon való megtapadását, amivel rengeteg betegségtől óvnak meg (Szakály, 2004; Figler et al., 2004).

A probiotikumok alkalmazásának fontos szerepe lehet minden olyan kóros állapotban, amelyben megváltozik a bélmikrobióta összetétele, tehát diszbiózis alakul ki, például gyulladásos bélbetegség, májelégtelenség, utazási hasmenés esetén, valamint antibiotikumos kezelést követően (Figler et al., 2004). Bron és munkatársai (2017) megállapították, hogy a *Lactobacillus*-ok pozitívan befolyásolhatják a különféle metabolikus betegségeket, beleértve a károsodott bélhám és a gyulladásos állapot helyreállítását. Továbbá az étrend okozta és örökletes elhízás, valamint a II-es típusú diabétesz illetve inzulinrezisztencia kialakulásában is fontos szerepet játszhat a bélmikrobióta összetételének megváltozása, köztük a *Bifidobacterium*-ok mennyiségének csökkenése (Bron et al., 2017). Kutatások szerint a *Lactobacillus*-oknak fontos szerepük van a nők hüvelyi és húgyúti fertőzéseinek megelőzésében, valamint kezelésében is, mivel az egészséges mikrobiom egyensúlyának fenntartásával képesek leküzdeni a patogének (pl. *Candida, E. coli*) által okozott, esetleges urogenitális fertőzéseket (Vandenplas et al., 2015).

Fontos megemlíteni, hogy a bélmikrobióta a veleszületett és az adaptív immunitást is szabályozza, melyeknek zavara nemcsak bélrendszeri, hanem szisztémás autoimmun betegségeket is okozhat (Halmos és Suba, 2016). Számos immunológiai mechanizmus szerepet játszik a diszbiózis kialakulásában, például immunhiányos állapotok, a nem megfelelő táplálkozás (malnutríció), így a bélhez kapcsolódó limfoid szövet (GALT) csökkenése is (1. ábra), de a gyomorsavhiány, az epe vagy hasnyálmirigynedv elválasztásának zavara is kiválthatja a bélmikrobiom megváltozását a vékonybél területén, ahol az emberi immunrendszer mintegy 80%-a található (Figler et al., 2004).

Összességében a gyomor-bél mikrobióta alapvető fontosságú az immunrendszer működésében. Noha a probiotikumok fő orvosi alkalmazása továbbra is a gyomor-bélrendszeri rendellenességek megelőzésére és kezelésére vonatkozik, fokozatosan kezdik összefüggésbe hozni emésztőrendszeren kívüli problémákkal (például atópiás dermatitisz vagy légzőrendszeri fertőzések), és ezek kezelésével is (Vandenplas et al., 2015). A probiotikumok emésztőrendszeren kívüli funkcióira irányuló legújabb kutatások eredményeiből a következőekben néhányat emelek ki.

Egy friss tanulmány során azonosították az emberi csecsemő bélrendszerében az allergiás reakciók ellen védő probiotikus baktérium fajokat, melyek immunológiai reakcióikkal (például szabályozó T-limfociták stimulálása) elősegítik a tolerancia válaszokat az allergiás válaszok helyett (Brigham and Women's Hospital, 2019).

Szintén egy relatív új észlelés a mikrobiom-bél-agy tengely létezése, mely kétirányú információáramlást tesz lehetővé a mikrobióta és az agyi központok között. A kölcsönös

kapcsolat révén egyrészt az agy képes a bélmikrobiótát befolyásolni (például stressz hatására megváltozik a mikrobióta összetétele), másrészt a bélmikrobióta is hatást fejt ki az agyra, következésképpen befolyásolja a gazdaszervezet magatartását, immunválaszát és a vegetatív idegrendszer működését (Halmos és Suba, 2016). Johnson és Foster (2018) hipotézise erre vonatkozólag, hogy evolúciónk során függővé váltunk a bennünk élő probiotikus baktérium kolóniáktól, és szükségünk van rájuk, többek között normális agyműködésünk érdekében is.

3.4. Prebiotikumok

A prebiotikumok olyan nem emészthető, egyszerű cukrokból felépülő oligoszacharidok és poliszacharidok, melyek elősegítik a bélrendszerben élő probiotikus baktériumok növekedését (Nilegaonkar és Agte, 2010). Alapvetően élelmi (diétás) rostok, melyek nem képesek metabolizálódni, így jutnak el a vastagbélbe, ahol a probiotikumok növekedési szubsztrátjai. Természetes állapotban számos élelmiszerben előfordulnak (például csicsóka és cikóriagyökér), valamint a természetes ipari koncentrátumok lehetnek például galakto-, frukto-, malto-, vagy xilo-oligoszacharidok (Szakály, 2004).

Ahhoz, hogy egy szerves vegyületet tudományosan is prebiotikum kategóriába soroljanak, bizonyos kritériumoknak meg kell megfelelnie:

(1) Rezisztens legyen a gyomorsavakkal, különböző enzimek általi hidrolízissel és az emésztőrendszer abszorpciójával szemben.
(2) A bélrendszer mikroflórája által fermentálható legyen.
(3) A probiotikus bélbaktériumok növekedését vagy aktivitását szelektíven stimulálja (Gibson et al., 2004).

Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem fordult a prebiotikumok potenciálisan kedvező hatásaira, ezek például a betolakodó kórokozókkal szembeni fokozott rezisztencia, a bélműködés elősegítése, a vastagbélrák megelőzése, a lipidszint (koleszterin, triglicerid) csökkentése, valamint a kalcium és a vas kedvezőbb biológiai hasznosítása (Nilegaonkar és Agte, 2010).

A prebiotikumok fogyasztása az egészséges bélbaktériumok megfelelő jelenléte nélkül nem adhat kedvező eredményeket, a probiotikus étrend-kiegészítők pedig nem tartalmaznak elegendő mennyiségű prebiotikumot. Valójában a prebiotikumok és a probiotikumok együttes fogyasztásának előnyei olyan nagyok, hogy szinbiotikus termékeket (olyan termékeket, amelyekben mind a probiotikum, mind a prebiotikum kombinálva vannak), mint funkcionális élelmiszerek fejlesztettek ki (Nomoto, 2005).

A következőkben, a teljesség igénye nélkül, néhány - a kutatómunkám során is alkalmazott - prebiotikum általános jellemzőjére térek ki.

3.4.1. Rezisztens keményítő

A keményítő az egyetlen természetben előforduló poliszacharid, amelyet az emberi emésztőrendszer enzimei képesek megemészteni. Korábban úgy gondolták, hogy a keményítőt az emberi vékonybél teljes mértékben megemészti, ugyanakkor kísérletek során kimutatták, hogy a keményítő jelentős része eljut a vastagbélbe. Ezt a keményítőt rezisztens keményítőnek nevezik, mely a keményítő bomlástermékeinek összességét jelenti, s az egészséges egyén vékonybelében nem képes abszorbeálódni. Ezek a rezisztens keményítők különféle okokból kifolyólag jöhetnek létre, beleértve a főzést, egyéb poliszacharidok jelenlétét és a rágás mértékét. Kutatások alapján a magas amilóztartalmú keményítők esetében úgy tűnik, hogy prebiotikumos képességük kiterjeszti az élelmiszerekben való alkalmazhatóságukat, mivel elősegítik a probiotikus mikroorganizmusok vastagbélbe jutását. Többek között Brown és munkatársai (1997, 1998) kutatásaiból kiindulva, számos tanulmány alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a rezisztens keményítő prebiotikumnak minősül (Topping et al., 2003).

3.4.2. Laktoszukróz

A laktoszukróz egy triszacharid, amely D-galaktózból, D-glükózból és D-fruktózból áll. A laktoszukrózt enzimatikusan állítják elő, a laktózban lévő galaktozil maradék szacharózra történő enzimatikus átvitelével. A laktoszukróz ellenáll az emésztésnek a gyomorban és a vékonybélben (Nilegaonkar és Agte, 2010). A prebiotikus hatást Gibson és munkatársai (2004) laktoszukrózzal kiegészített normál étrend alkalmazásával bizonyították be, mely során a *Bifidobacterium*-ok szignifikáns növekedését figyelték meg a vizsgálat előtti értékekhez viszonyítva, valamint a *Clostridia* és *Bacteriodes* törzsek szignifikáns csökkenését. Tehát a laktoszukróz a vastagbél *Bifidobacterium* fajaira növekedési faktorként hat, melyek szelektíven hasznosítják, ennek következtében pedig a káros baktériumok visszaszorulnak. Ma már széles körben használják étrend-kiegészítőként és funkcionális élelmiszerekben prebiotikumként (Nilegaonkar és Agte, 2010).

3.4.3. Laktulóz

A laktulóz egy félig szintetikus diszacharid, amely egy D-laktóz és egy D-fruktóz cukorból áll. A cukrokat β-glikozidos kötés köti össze, így ellenáll az emberi emésztőenzimek hidrolízisének (Nilegaonkar és Agte, 2010). Kutatások szerint a laktulózt a bélrendszerben található β-galaktozidáz enzimek nem tudták lebontani, azonban a gyomorsavval szembeni rezisztenciájáról nincs tudományos eredmény (Gibson et al., 2004). A laktulózt a vastagbél baktériumai fermentálják, ami a vastagbél-ökoszisztéma változásához vezethet a bélbaktériumok, például a *Lactobacillus*-ok és a *Bifidobacterium*-ok javára (Nilegaonkar és Agte, 2010). A gyógyászatban hashajtóként széles körben alkalmazták. Annak ellenére, hogy nem teljesül minden elvárt kritérium, prebiotikumként lett besorolva az emberi vizsgálotokból származó szignifikáns adatok alapján (Gibson et al., 2004).

3.5. Probiotikumok mikrokapszulázása

Globális piaci kutatások során derült fény arra a tényre, hogy a jelenleg alkalmazott probiotikus baktériumok csak kis mennyiségben vagy egyáltalán nem maradnak életképesek a végtermékben, mivel a sejtek eltarthatósága és tűrőképessége alacsonyabb, mint az előírt minőségmegőrzési idő, valamint a probiotikumok túlélése meglehetősen gyengének bizonyul gasztrointesztinális körülmények között (De Prisco és Mauriello, 2016).

A mikrokapszulázás egy olyan technika, amely során a sejteket egy kapszulázó membránnal veszik körül, és visszatartják azokat a sejtkárosodás vagy a sejtpusztulás csökkentése érdekében (Krasaekoopt et al., 2003). A probiotikus baktériumok mikrokapszulázásának célja a sejtek védelme az élelmiszer-feldolgozás és tárolás során, valamint emésztőrendszeri körülmények között, ezzel együtt a bezárt sejtek immobilizálása, szabályozott kiszabadítása, strukturálása és funkcionalizálása. Maga a mikrokapszula egy féligáteresztő, gömb alakú, vékony és erős membránból áll, amely körülveszi a belső magot (Amin et al., 2013). A maganyag körül a mikrokapszulázó anyag által alkotott membránszerkezetet a kapszula falának nevezik. Ennek szerkezeti tulajdonságait úgy tervezték, hogy megvédje a magot, és meghatározott körülmények között, szabályozott sebességgel engedje szabadon a sejteket. A kapszulák mérete a szubmikrontól több milliméterig is terjedhet (Kailasapathy, 2002).

A megfelelő kapszulaanyag kiválasztása rendkívül fontos szerepet játszik a kapszula méretének, morfológiájának, textúrájának, valamint porozitásának meghatározásában. A sejtkapszulázáshoz leginkább vizsgált és használt mátrixok az élelmiszer-minőségű

biopolimerek (alginát, karragén, kitozán, pektin, keményítő és tejfehérjék), mivel stresszes körülmények között (például a gyomor savas pH-ja, epesók, emésztőenzimek jelenléte) is hatékony védelmet nyújtanak, azáltal, hogy valós fizikai akadályként, valamint pufferként funkcionálnak (De Prisco és Mauriello, 2016).

A probiotikumok mikrokapszulázásához leggyakrabban használt biopolimer (biogumi) a nátrium-alginát. Az alginát különféle algafajokból kivont D-mannuronsav és L-guluronsav lineáris heteropoliszacharidja (Krasaekoopt et al., 2003). Alkalmazásának előnyei a következők:

- nem toxikus,
- $CaCl_2$-dal mátrixot képez az érzékeny anyagok, például probiotikus baktériumok kapszulázása érdekében,
- a bezárt sejtek életképességét hosszú ideig képes megőrizni,
- az immobilizáció visszafordítható, mivel az alginát gél a Ca^{2+}-ok elválasztásával szolubilizálható, így felszabadítva a bezárt sejteket (Kailasapathy, 2002).

A kalcium-alginát az egyik első olyan kapszulaanyag, melyet probiotikumok kapszulázására alkalmaztak, ennek oka a sejtekre gyakorolt kíméletes hatása a kapszulázási folyamat során, valamint a kalcium-alginát pufferképessége, olcsósága, egyszerűsége és biokompatibilitása (Amin et al., 2013).

A mikrokapszulázás ma már bizonyítottan az egyik leghatékonyabb technológia a probiotikus baktériumok életképességének és stabilitásának megőrzésére, mivel védelmet nyújt a probiotikumok számára mind az élelmiszer-feldolgozás, mind a tárolás során, valamint emésztési körülmények között (Das et al., 2014). A mikrokapszulázás jövőbeni kihívásai között szerepel az új, hatékony alkalmazások felismerése, a megfelelő technikák, anyagok és baktériumtörzsek kiválasztása, valamint a mikrokapszulákkal járó többletköltségek minimalizálása (Rokka és Rantamäki, 2010).

3.5.1. Mikrokapszulázás élelmiszeripari alkalmazása

Jelenleg megfigyelhető egy egészségesebb életmód felé mutató tendencia, a fogyasztók egyre tudatosabban választják meg, hogy mit esznek és az egyes összetevők milyen pozitív hatást gyakorolnak az egészségükre. Az étrenddel történő betegségmegelőzés tulajdonképpen az innovatív, funkcionális élelmiszerek egyedi kínálatának köszönhető, melyek hozzáadott összetevőket tartalmaznak az egészség elősegítése érdekében. Azonban,

ha az élelmiszer-összetevőket csak a táplálkozási érték javítása érdekében adják a termékhez, veszélyeztethetik azok ízét, színét, textúráját és aromáját. Időnként lassan lebomlanak és elveszítik biohasznosulási képességüket, vagy oxidációs reakcióik révén veszélyesekké válnak (De Prisco és Mauriello, 2016).

A termékekben a probiotikumok túlélését számos tényező befolyásolja, beleértve a pH-t, a hidrogén-peroxid képződést, az oxigéntoxicitást (az oxigén áthatolása a csomagoláson keresztül), a tárolási hőmérsékletet, valamint a stabilitást szárított vagy fagyasztott formában (Kailasapathy, 2002).

A kedvezőtlen kölcsönhatások elkerülésének egyik ígéretes technológiai megoldása lehet a mikrokapszulázás, mely során az érzékeny alkotóelemeket (szilárd, folyadék vagy gáznemű) bevonó anyagba vagy mátrixba zárják, ahol ennek következtében teljesen körülveszi őket a védőanyag. Továbbá probiotikumok kapszulázása esetén biztosítja azok biológiai szerepének érvényesülését. A mikrokapszulázás lehetővé teszi az élelmiszeripari vállalatok számára, hogy termékeikhez ásványi anyagokat, vitaminokat, ízesítőket és illóolajokat adjanak, ezenkívül javítja a probiotikus kultúrák kezelését, valamint az erjesztés során elősegíti a nem kívánatos íz és aroma maszkolását különféle metabolikus vegyületek (például ecetsav) előállításával (De Prisco és Mauriello, 2016).

3.5.2. Gasztrointesztinális tranzit

A probiotikumok gazdaszervezetre gyakorolt jótékony hatásainak kifejtéséhez szükség van arra, hogy az adott probiotikus baktérium túlélje a gyomorban uralkodó savas körülményeket és megfelelő mennyiségben eljusson a belekbe, ott megtelepedjen és képes legyen tovább szaporodni (Shori, 2017). Tudományos eredmények alapján ez nagyobb kihívás, mint a termék feldolgozási és tárolási körülményeinek túlélése. Az emberi gyomor erősen savas körülményei a gazdaszervezet természetes védőgátját képezik, így azonban jelentős mértékben csökkentik az élő probiotikus sejtek számát. Tehát a probiotikum túlélésének legfontosabb akadálya az élelmiszerként történő alkalmazás során a gyomron való áthaladás (Heidebach et al., 2012).

A probiotikumok életképességét általában szimulált élettani körülmények között vizsgálják. Már Sheu és Marshall is kimutatta (1993), hogy a probiotikus baktériumok alginát gélgyöngyökbe való kapszulázása védelmet nyújt a sejtek számára bizonyos kedvezőtlen külső körülmények ellen, így azóta az alginát alkalmazása széles körben elterjedt probiotikumok kapszulázására. Később azonban, többek között Amin és munkatársai (2013) megfigyelték, hogy az alginát alapú mikrokapszulák átmérője csökken

a szimulált gyomor expozíció során, az alginát érzékeny a sav degradáló hatására, valamint, hogy a gellán és xantán gumi keveréke előnyösebb technológiai tulajdonságokkal rendelkezik. A kazeinát és a frukto-oligoszacharidok szintén védelmet nyújtanak a szenzitív sejteknek, továbbá a rezisztens keményítővel kapszulázott *Bifidobacterium*-okról kimutatták, hogy képesek túlélni az emberi tápanyagcsatornán való áthaladást. Különböző eredmények alapján megállapították, hogy a probiotikumok túlélését javítja az alginát koncentráció és a kapszula méretének növelése, míg a $CaCl_2$ koncentráció és a kezdeti sejtszám nem befolyásolja a baktériumok pusztulási arányát (Amin et al., 2013).

Továbbá a probiotikus baktériumok életképességét szimulált gasztrointesztinális körülmények között a mikrobiális törzs érzékenysége, valamint a gyomornedv összetétele is nagyban befolyásolja. Egy adott baktérium törzs túléléséhez szükség van arra, hogy képes legyen erősen savas körülmények között is szabályozni a citoplazmatikus pH-ját, mely nagyban függ a H^+-ATP-áz enzim aktivitásától, ez pedig törzsenként eltérő lehet (Heidebach et al., 2012).

3.5.3. Technológiai lehetőségek

A probiotikumok mikrokapszulázásához leggyakrabban alkalmazott technikák az extrúziós technika, emulzifikációs technika valamint a porlasztva szárítás (Rokka és Rantamäki, 2010).

Extrúziós technika

Az extrúzió a legrégebbi és leggyakrabban alkalmazott módszer a mikrokapszulák hidrokolloid oldatokkal történő előállítására. A technika magába foglalja a hidrokolloid oldat elkészítését, a mikroorganizmusok hozzáadását és a sejtszuszpenzió extrudálását egy fecskendő tűn keresztül cseppek formájában, melyek szabadon esnek egy szilárdító oldatba. A gyöngyök mérete és alakja a tű átmérőjétől és a szabadesés távolságától függ.

Az extrudáláshoz leggyakrabban használt hordozóanyag a nátrium-alginát. A gyöngyök képzéséhez az algináthoz keverik a probiotikus sejtszuszpenziót, és az elegyet többértékű kationt tartalmazó oldatba (általában Ca^{2+} $CaCl_2$ formájában) csepegtetik. A cseppek azonnal gélgyöngyöket alkotnak, bezárva a sejteket az ionosan keresztkötött illetve térhálósított alginát gél háromdimenziós rácsába illetve mátrixába.

Ez a módszer igen népszerű az egyszerű és olcsó megvalósíthatósága, biokompatibilitása, valamint az eljárás kíméletes körülményei miatt, melyek biztosítják a sejtek életképességének megtartását (Krasaekoopt et al., 2003). Hátránya azonban, hogy míg laboratóriumi szinten ígéretesnek bizonyult, a gélgyöngyök előállítási technológiája nagyüzemi körülmények között komoly nehézséget jelent (Sanders, 2000).

Emulzifikációs technika

Az emulzifikációs technika során kis mennyiségű sejt-polimer szuszpenziót (szakaszos fázis) adunk nagy mennyiségű növényi olajhoz (folyamatos fázis). Az elegyet homogenizálva víz-olaj emulziót kapunk. Miután az emulzió kialakult, a vízben oldott polimert oldhatatlanná kell tenni, térhálósítva azt, hogy apró gélrészecskék képződjenek az olajfázisban. A választott gélképző módszer a használt hordozóanyag típusától függ. Az emulzifikációs technika során a hordozóanyag lehet például karragén, alginát, kitozán, valamint zselatin. A mikrokapszulákat illetve gyöngyöket később szűréssel választják el. A gyöngyök méretét a keverési sebesség szabályozza, körülbelül 25 mm és 2 mm között változhat. Ezt a technikát sikeresen alkalmazták a tejsavbaktériumok kapszulázására szakaszos és folyamatos fermentáció céljából (Krasaekoopt et al., 2003).

Porlasztva szárítás

A porlasztva szárítás az élelmiszeriparban általánosan használt kapszulázási technika. Magába foglalja a probiotikumok és hordozóanyaguk emulziójának vagy szuszpenziójának porlasztását szárító levegő segítségével, ami a víz gyors elpárolgását eredményezi. A kapszulákat száraz por formájában kapjuk. A porlasztva szárítási folyamatot a termék betáplálása, a levegőáram és a hőmérséklet szabályozza. A módszer számos előnye ellenére nagy hátránya, hogy a víz elpárolgásához szükséges magas hőmérséklet hatására csökken a probiotikumok életképessége és aktivitása a késztermékben (Amin et al., 2013).

3.6. Micellás rendszerek alkalmazása

A különböző hatóanyagok kapszulázására számos kolloid rendszert terveztek és alkalmaztak a gyógyszeriparban. A fő húzóágazatok közé tartoznak a micellák, liposzómák, nanorészecskék, folyadékkristályos fázisok, aeroszolok, mikroemulziók és prokolloid rendszerek. A kolloidális gyógyszerbejuttatás tudományában a fejlődés alapja a felületaktív anyagok és polimerek felhasználása (Misra et al., 2010).

A micellás rendszereket felületaktív anyagok alkotják. A felületaktív anyagok amfoter molekulák, melyek egy poláros vagy ionos hidrofil részből, és egy apoláros hidrofób részből állnak. A természetben lehetnek ionosak és nem ionosak is. A hidrofil rész és a víz közötti erős dipólusos kölcsönhatás vízoldhatóvá teszi őket, így alakulhatnak ki micellák vagy vezikulumok. A micellák egyik fontos tulajdonsága a hidrofób anyagok kapszulázhatósága, mivel a micelláris mag megfelelő mikrokörnyezetként szolgál vízben oldhatatlan vegyületek számára (Misra et al., 2010).

A micellák folyékony maggal rendelkező dinamikus struktúrák, tehát nem feltételezhető, hogy határozottan merev alakúak. Tudományos megfontolások alapján általában gömb alakúaknak tekintik őket. Micellák csak akkor alakulnak ki, amikor az oldatban a kritikus micellakoncentrációt (CMC) meghaladja a felületaktív anyag koncentrációja (Uchegbu, 2014).

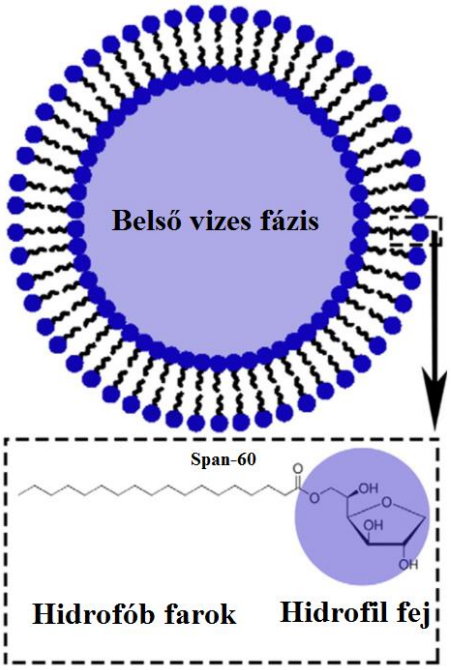
Micellás rendszerek alkalmazásának legnagyobb előnye tehát, hogy a kívánt szenzitív, apoláros molekulák általuk kolloid oldatba vihetőek, továbbá fizikai határréteget is képeznek.

3.6.1. Nioszóma

A nioszómák nem ionos felületaktív anyagokból kialakuló vezikulumok, melyek gyógyszerhordozó rendszerként való alkalmazását világszerte vizsgálják. A nioszómákról először a 70-es években számoltak be a kozmetikai iparban, ám azóta hatóanyag-szállító képességük tanulmányozására került a hangsúly (Uchegbu, 2014).

A nioszómák kettős rétegű szerkezete lehetővé teszi mind hidrofil, mind lipofil anyagok beépítését. Ez úgy történik, hogy a hidrofil anyag a vezikuláris vizes magba kapszulázódik vagy a nioszóma felületére adszorbeálódik, miközben a lipofil anyagok szétoszlanak a kettős réteg lipofil doménjében (Moghassemi és Hadjizadeh, 2014).

A nioszómák unilamelláris vagy multilamelláris vezikulumok, melyek a liposzómák analógjai. A 2. ábrán látható az unilamelláris nioszóma általános felépítése.



2. ábra: Span 60 alkalmazásával előállított unilamelláris nioszóma szerkezete (Moghassemi és Hadjizadeh, 2014 nyomán)

Elsősorban szintetikus, nem ionos felületaktív anyagok (például Span 60) önálló összeállásából alakulnak ki, adott esetben koleszterin és elektromos töltéssel rendelkező felületaktív anyagok segítségével. Az oldott anyagok kapszulázódásának képessége lehetővé teszi a nioszómák számára, hogy felhasználhatóak legyenek gyógyszerhordozó rendszerként, mivel a hatóanyagok megfelelő komponensek lehetnek a vezikulumok számára (Uchegbu, 2014).

A nioszómák kialakítására leggyakrabban alkalmazott felületaktív anyagok a következők: Span sorozat (Span-20,-40,-60,-65,-80,-85), Tween sorozat (Tween-20,-40,-60,-65,-80,-85) és Brij sorozat (Brij-30,-35,-52,-56,-58). A koleszterin, mint gyakori segédanyag, fontos szerepet játszik a nioszómák szerkezetének kialakításában, mivel hozzájárul azok stabilitásához, valamint a kettősréteg kialakításához is szükséges. Így nagyobb kapszulázási hatékonyságot is eredményez (Moghassemi és Hadjizadeh, 2014).

3.6.2. Nioszóma kialakítási technológiák

Nioszómák kialakítására számos módszerrel kísérleteztek (Moghassemi és Hadjizadeh, 2014). Ezek közül gyakran alkalmazott a vékonyréteg hidratációs eljárás és a szonikálás.

Vékonyréteg hidratációs eljárás

Könnyen alkalmazható és elterjedt technika, amely során a felületaktív anyagot és a segédanyagokat szerves oldószerben (például kloroform) egy gömblombikban oldják fel. Rotációs vákuumbepárló segítségével elvonva az oldószert, a gömblombik falán egy vékony rétegként marad vissza a prionioszóma. Hidratálás során a kapszulázandó anyagot pufferben oldva töltik a gömblombikba, majd megfelelő hőmérsékleten, folyamatos rázatás mellett kialakulnak a nioszóma kapszulák (Moghassemi és Hadjizadeh, 2014).

Szonikálás

A szonikálást különböző niószóma előkészítési eljárás során is alkalmazzák, mivel alkalmas a multilamelláris nioszóma szerkezet felbontására, és unilamelláris szerkezet kialakítására. Önmagában is alkalmazható a vékonyréteg hidratációs eljárás során, valamint azt követően is. Megvalósítása úgy zajlik, hogy a pufferben oldott kapszulázandó anyagot felületaktív anyag és koleszterin keverékéhez adják, és meghatározott ideig szonikálják, így képezve nioszómákat (Moghassemi és Hadjizadeh, 2014).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált mikroorganizmus

A kísérleteimet *Bifidobacterium lactis* Bb-12 baktériumtörzzsel végeztem. A törzs a Chr. Hansen cégtől került beszerzésre.

4.2. Felhasznált anyagok és oldatok

4.2.1. Alkalmazott táplevesek

TPY tápleves

A *Bifidobacterium lactis* szaporításához használt TPY tápleves összetevői az 1. táblázatban láthatóak. Készítése során az összetevőket táramérlegen lombikba mértem, majd desztillált vízzel felöntve mágneses keverő segítségével homogenizáltam az oldatot.

1. táblázat: TPY (Trypticase-Phytone-Yeast extract) leves összetétele

Összetevő	Mennyiség
Trypticase pepton / Proteose pepton	10 g
Phytone pepton	5 g
Glükóz	5 g
Élesztőkivonat	2,5 g
K_2HPO_4	2 g
Tween 80	1 ml
Cisztein-HCl	0,5 g
$MgCl_2$*6 H_2O	0,5 g
$ZnSO_4$*7 H_2O	0,25 g
$CaCl_2$*2 H_2O	0,15 g
$FeCl_3$*6 H_2O	0,03 g
Desztillált víz	1000 ml

Az elkészített tápközeget autoklávban 121°C-on 15 percig sterileztem.
A sejtszámláláshoz használt TPY tápagarhoz a táplevest 15g/l agarral egészítettem ki.

MRS tápleves

A *B. lactis* szaporításához használt MRS tápleves összetevői a 2. táblázatban láthatóak. Készítése során az összetevőket táramérlegen lombikba mértem, majd desztillált vízzel felöntve mágneses keverő segítségével homogenizáltam az oldatot. Az elkészített tápközeget autoklávban 121°C-on 15 percig sterileztem.

2. táblázat: MRS (de Man Rogosa Sharpe) leves összetétele

Összetevő	Mennyiség
Trypticase pepton / Proteose pepton	10 g
Húskivonat	8 g
Élesztőkivonat	4 g
Glükóz	20 g
Tween 80	1 ml
K_2HPO_4	2 g
Na-acetát	5 g
Triammónium-citrát	2 g
$MgSO_4$*7 H_2O	0,2 g
$MnSO_4$	0,05 g
Cisztein-HCl	0,5 g
Desztillált víz	1000 ml

RCM tápleves

A *B. lactis* Bb-12 szaporításához használt RCM tápleves összetevői a 3. táblázatban láthatóak. Készítése során az összetevőket táramérlegen lombikba mértem, majd desztillált vízzel felöntve mágneses keverő segítségével homogenizáltam az oldatot.

3. táblázat: RCM (Reinforced Clostridial Medium) leves összetétele

Összetevő	Mennyiség
Trypticase pepton / Proteose pepton	10 g
Húskivonat	10 g
Élesztőkivonat	3 g
Glükóz	5 g
Vízoldható keményítő	1 g
NaCl	5 g
Na-acetát	3 g
Cisztein-HCl	0,5 g
Desztillált víz	1000 ml

Az elkészített tápközeget autoklávban 121°C-on 15 percig sterileztem.

Fiziológiás sóoldat

Sejtszámlálás során tizedelő hígítási sor készítésére használt 0,85%-os NaCl oldat, melynek készítése során 0,85 g NaCl-ot adtam 100 ml desztillált vízhez. A sóoldatot 4,5 ml-enként kémcsövekbe mértem, majd 121°C-on 15 percig autoklávban sterileztem.

4.2.2. Az extrúziós kapszulázási technika során alkalmazott anyagok

Hidrokolloid oldatok

A *Bifidobacterium lactis* extrúziós technikával történő mikrokapszulázásához készítettem rezisztens keményítő-alginát, laktoszukróz-alginát, valamint laktulóz-alginát hidrokolloid oldatokat, melyeknek összetétele a 4., 5. és 6. táblázatban látható.

4. táblázat: Rezisztens keményítő-alginát oldat összetétele

Összetevő	Mennyiség
Rezisztens keményítő	1 g
Na-alginát	1 g
Desztillált víz	50 ml

5. táblázat: Laktoszukróz-alginát oldat összetétele

Összetevő	Mennyiség
Laktoszukróz (LS 55)	1 g
Na-alginát	1 g
Desztillált víz	50 ml

6. táblázat: Laktulóz-alginát oldat összetétele

Összetevő	Mennyiség
Laktulóz	1 g
Na-alginát	1 g
Desztillált víz	50 ml

A hidrokolloid oldatok sterilezése 121°C-on, 15 percen keresztül zajlott autoklávban.

$CaCl_2$-oldat (0,05 M)

Az injekciós tűvel kialakított mikrokapszulák, úgynevezett gyöngyök megszilárdítására szolgált. Sterilezése 121°C-on, 15 percen keresztül, autoklávban történt.

Peptonvíz (0,1%)

A képződött gyöngyök mosására, tárolására lett felhasználva. Összetevőit (7. táblázat) táramérlegen mértem ki és desztillált vízzel 1000 ml-re hígítottam.

7. táblázat: Peptonvíz összetétele

Összetevő	Mennyiség
NaCl	9 g
Bacto-pepton	1 g
Desztillált víz	1000 ml

A peptonvíz sterilezése 121°C-on, 15 percen keresztül autoklávban zajlott.

Foszfát puffer (0,1 M)

Sejtszám meghatározás során a mikrokapszulák (gyöngyök) feloldására szolgált. Készítése során az összetevők (8. táblázat) táramérlegen való kimérését követően 1000 ml-re hígítottam desztillált vízzel.

8. táblázat: Foszfát puffer összetétele

Összetevő	Mennyiség
$Na_2HPO_4 * 7 H_2O$	13,121 g
$NaH_2PO_4 * H_2O$	7, 044 g
Desztillált víz	1000 ml

A foszfát puffer pH értékét HCl oldat segítségével 6,8-ra állítottam és 121°C-on, 15 percen keresztül autoklávban sterileztem.

4.2.3. Nioszómák előállításához felhasznált anyagok

- Nem-ionos felületaktív anyag: Span 60
- Segédanyag: koleszterin
- Szénhidrát (prebiotikum): maltodextrin
- Szerves oldószer: kloroform

Foszfát pufferes sóoldat (PBS) a pronioszóma vékonyréteg hidratálásához alkalmazott oldat, melynek összetevői a 9. táblázatban láthatóak.

9. táblázat: PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,4) összetétele

Összetevő	Mennyiség
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
$Na_2HPO_4 * 2 H_2O$	1,15 g
K_2HPO_4	0,2 g
Desztillált víz	1000 ml

A PBS puffer oldatot 121°C-on 15 percen keresztül autoklávban sterileztem.

4.2.4. Szimulált emésztőrendszeri kísérlethez alkalmazott oldatok

Gyomornedvet modellező oldat

A gyomornedvet modellező oldat elkészítéséhez 0,2%-os NaCl oldatra volt szükség, melynek pH-ját 10%-os HCl oldattal állítottam be a megfelelő pH 2 értékre. Felhasználás előtt 121°C-on, 15 percig autoklávban sterileztem, majd lamináris fülke alatt 3 g/l pepszint adtam hozzá.

Vékonybél közeget modellező oldat

A vékonybél közeget modellező oldat elkészítéséhez a 0,05 M-os KH_2PO_4 oldat pH-ját NaOH oldat segítségével állítottam be a megfelelő pH 7,43 értékre. Felhasználás előtt 121°C-on, 15 percig autoklávban sterileztem, majd ezt követően lamináris fülke alatt 6 g/l epesót mértem hozzá.

4.3. Alkalmazott módszerek

4.3.1. *Bifidobacterium lactis* tenyésztése

A liofilizált állapotban lévő *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzset 48 órán át TPY, MRS, valamint RCM táplevesben szaporítottam fel 37°C-os termosztátban, anaerob jar-ban. Mindhárom tápleves esetén egy Trypticase peptont és egy Proteose peptont tartalmazó változatot készítettem, így vizsgálva a *B. lactis* számára megfelelő nitrogénforrást is.

További kísérleteimhez a legeredményesebbnek mutatkozó táplevesben szaporítottam fel a *B. lactis* Bb-12 törzset, ezúttal már 250 ml-es mennyiségben, ugyanúgy 48 órán keresztül, 37°C-os termosztátban, anaerob jar-ban. Ezt követően a tenyészet teljes mennyiségét lecentrifugáltam a következő beállításokon: 10000 rpm, 10 perc, 4°C, majd peptonvízbe szuszpendáltam vissza és felhasználásig 4°C-on, hűtőben tároltam.

4.3.2. Sejtszám meghatározás

A *Bifidobacterium*-ok sejtszámának meghatározásához lemezöntéses módszert alkalmaztam. Első lépésként minden esetben tizedelő hígítási sort készítettem, melynek során az egyes tagokba 4,5 ml 0,85 m/V %-os steril fiziológiás sóoldatot mértem, és a *Bifidobacteium lactis* Bb-12 szabad sejtek esetén 0,5 ml baktérium tenyészetet pipettáztam. Ezt követően a megfelelő hígítási tagokból lemezöntést végeztem a Petri-csészékbe, TPY tápagart alkalmazva. Az inkubálás 37°C-on valósult meg, anaerob körülményeket biztosító jar-ban, körülbelül 48 órán keresztül, melyet végül a telepszámlálás követett. A sejtszámokat TKE/ml-ben adtam meg.

Az extrúziós technikával kapszulázott sejtek számának meghatározása esetén, a sejtek kiszabadítása érdekében megközelítőleg 0,5 g gyöngyöt mértem ki, melyeket szükséges volt 6,8 pH-ra beállított foszfát pufferben feloldani. A kapszulák (gyöngyök) nehézkes, hosszú oldódása miatt erőteljes rázatást, vortexelést alkalmaztam. Az alkalmazott foszfát puffer mennyisége 5 ml volt, kivéve a hőkezelés során, ahol már 1 ml peptonvízben voltak a gyöngyök, így csak 4 ml foszfát pufferre volt szükség. A sejtszám meghatározást a szabad sejtekhez hasonlóan végeztem, a sejtszámokat azonban TKE/g-ban adtam meg.

4.3.3. Sejtkapszulázási módszerek

Kísérleteim során a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 probiotikus sejteket extrúziós mikrokapszulázási módszerrel, valamint nioszomálisan kapszuláztam. Kapszulázási kísérleteimhez a *B. lactis*-t előzetesen Proteose peptont tartalmazó TPY táplevesben szaporítottam fel. Az alábbiakban a kísérleteim során alkalmazott extrúziós technikát és a nioszómák kialakításának módszereit részletezem.

Extrúziós technika

Az extrúziós mikrokapszulázási technika megvalósítása Krasaekoopt és munkatársai (2003) munkája alapján történt.

Első lépésként rezisztens keményítővel, laktoszukrózzal, valamint laktulózzal kiegészített Na-alginát alapú hidrokolloid oldatokat készítettem. 50 ml hidrokolloid oldathoz adtam 5 ml *B. lactis* Bb-12 sejtszuszpenziót, majd egy 0,7 mm átmérőjű steril injekciós tűn keresztül 0,05 M-os $CaCl_2$-oldatba csepegtettem az oldatok teljes mennyiségét. Ezt követően 30 percen keresztül hagytam állni a gyöngyöket $CaCl_2$-oldatban, hogy teljesen megszilárduljanak. A folyamat során az ionok keresztkötése zajlik, a Na-alginát Na^{2+} ionjai a $CaCl_2$ Ca^{2+} ionjaira cserélődnek le, így jönnek létre a stabil, vízben nem oldható Ca-alginát gyöngyök. Ezek után eltávolítottam az oldatot, és a kapszulákat 0,1%-os peptonvízzel többszörösen átmostam.

Nioszómák előállítása

Kísérletemben a nioszómák előállításához a vékonyréteg hidratációs módszer lépéseit követtem, valamint a nioszómák hatékony kialakításának érdekében szonikálást is alkalmaztam Moghassemi és Hadjizadeh (2014) munkája alapján.

1. **Pronioszóma vékonyréteg kialakítása**

Első lépésként a nioszóma előformájának, a pronioszómának az alkotóanyagait mértem be gömblombikba a 10. táblázatban látható arányban és mennyiségben.

10. táblázat: Pronioszóma por összetétele

Összetevő	Arány	Mennyiség
Span 60	1	35,9 g
Koleszterin	2	64,5 g

Ezután 20 ml kloroformot, mint szerves oldószert adtam a keverékhez, amelyben feloldódtak az anyagok, valamint prebiotikumként 250 mg maltodextrint is mértem hozzá. Következő lépésben rotációs vákuumbepárlóba helyeztem a lombikot, ahol a kloroform 60°C-os vízfürdőben, 80 mbar és 125 rpm beállítások mellett párolgott el. A kloroform előnye, hogy jól oldódnak benne a pronioszóma alkotóanyagai, könnyen elpárolog, valamint steril környezetet biztosít, elpusztítja a nem kívánatos mikrobákat. A folyamat eredményeként a szárazanyag vékony filmrétegként rakódott ki a gömblombik falára, melyet hidratálásig 4°C-on tároltam.

2. **Vékonyréteg hidratálás**

A nioszómák kialakulásához a gömblombik falán létrejött pronioszóma filmréteget hidratáltam. A hidratálás és a baktériumok kapszulázása céljából 19,6 ml PBS puffert és 0,4 ml *B. lactis* Bb-12 sejtszuszpenzió keverékét mértem a lombikba, melyet ezután 100 rpm fordulatszámon, 50°C-on 1 órán keresztül rázattam, mialatt a vékony filmréteg teljesen diszpergálódott a hidratáló folyadékba. A rázatás után a szuszpenziót egy napon keresztül 4°C-os hűtőben tároltam, hogy tovább növeljem a nioszóma kialakulás hatékonyságát.

3. **Szonikálás**

Következő lépésként jeges vízfürdőbe merítettem a gömblombikot, hogy körülbelül 4°C-on végezhessem a kísérletet a hatékonyság növelése érdekében. Szonikálásnak vetettem alá körülbelül 10 percig, 30 mp-es ultrahangos kezelés és 15 mp-es pihentetés váltogatásával. Az ultrahang teljesítménye 50 W volt. A kezelést követően a kapszulázott sejteket tartalmazó gömblombikot 4°C-os hőmérsékletű hűtőben tároltam.

4.3.4. Kapszulázási hatékonyság meghatározása

A kapszulázási hatékonyság megadja, hogy a baktérium kiindulási sejtszámának hány százaléka lett sikeresen bezárva a mikrokapszulába. Ennek számolásához a sejtszámokat a kezelhetőség érdekében $\log_{10}$-es formában adtam meg.

$$\text{Kapszulázási hatékonyság (\%)} = \frac{\lg\,(\text{Bezárt sejtek száma})}{\lg\,(\text{Kiindulási sejtszám})} \times 100$$

A probiotikum kapszulázási hatékonyságának kimutatása érdekében sejtszámlálást végeztem a kiindulási (a még szabad) *B. lactis* Bb-12 sejtszuszpenzió, valamint a kapszulázott sejtek esetében.

4.3.5. Mikroszkópos vizsgálat

A mikroszkópos vizsgálatot Olympus BX40 típusú fénymikroszkóppal végeztem, 100-szoros nagyítású, immerziós rendszerű objektív alkalmazásával.

4.3.6. Szimulált emésztőrendszeri vizsgálat

Kísérletem során a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzs életképességét vizsgáltam szimulált emésztőrendszeri körülmények között, *in vitro* modell segítségével. Kísérletemet Shori és munkatársai (2004) munkája alapján végeztem el.

Külön-külön vizsgáltam a gyomorsav és epesók hatását, valamint egymást követő kezeléseket is alkalmaztam mind a szabad sejteken, mind pedig a kapszulázott sejteken. A gyomorsavas kezelés 135 percig, míg az epesavas kezelés 150 percig zajlott. Továbbá az alkalmazott kezelő oldatok mennyisége az előbbi esetben 5 ml, az utóbbi esetben pedig 4,5 ml volt. A kezelések 37°C-ra beállított inkubátorban zajlottak.

Szabad *B. lactis* sejtek esetében 1-1 ml-t mértem ki steril centrifugacsövekbe, majd ezekhez adtam a megfelelő kezelő oldatot. Egymást követő kezelések esetén a gyomorsavas kezelés végeztével lecentrifugáltam az oldatot, így le tudtam önteni az összegyűjtött sejtekről a kezelő oldatot és rámértem a vékonybél oldatot, majd 150 percig inkubátorba helyeztem. A kezelések végén rögtön kimértem 0,5 ml-t a hígítási sor első tagjába, melynek köszönhetően a fiziológiás sóoldat a hígítással, valamint a semleges körüli pH-ra történő beállítással leállította az emésztési folyamatot.

Kapszulázott sejtek esetében steril körülmények között 0,5 g gyöngyöt mértem ki kémcsövekbe, majd hozzáadtam a megfelelő kezelő oldatot és adott ideig a 37°C-os inkubátorba helyeztem. Egymást követő kezelések esetén a gyomorsavas kezelés végeztével 4,5 ml oldatot eltávolítottam a gyöngyökről, és folytatva az epesavas kezeléssel, 4,5 ml vékonybél oldatot mértem hozzá. A kezelések végén a kezelő oldatokat pipettával eltávolítottam, majd a gyöngyök feloldását követően sejtszámlálást végeztem.

4.3.7. Hőkezelési kísérlet

A hőkezelési kísérlet során a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzset extrém magas hőmérsékletű, 60°C-os vízfürdőben kezeltem 5, 10, 15 és 20 percen keresztül. A hőkezeléseket követően vizsgáltam a baktériumok túlélőképességét.

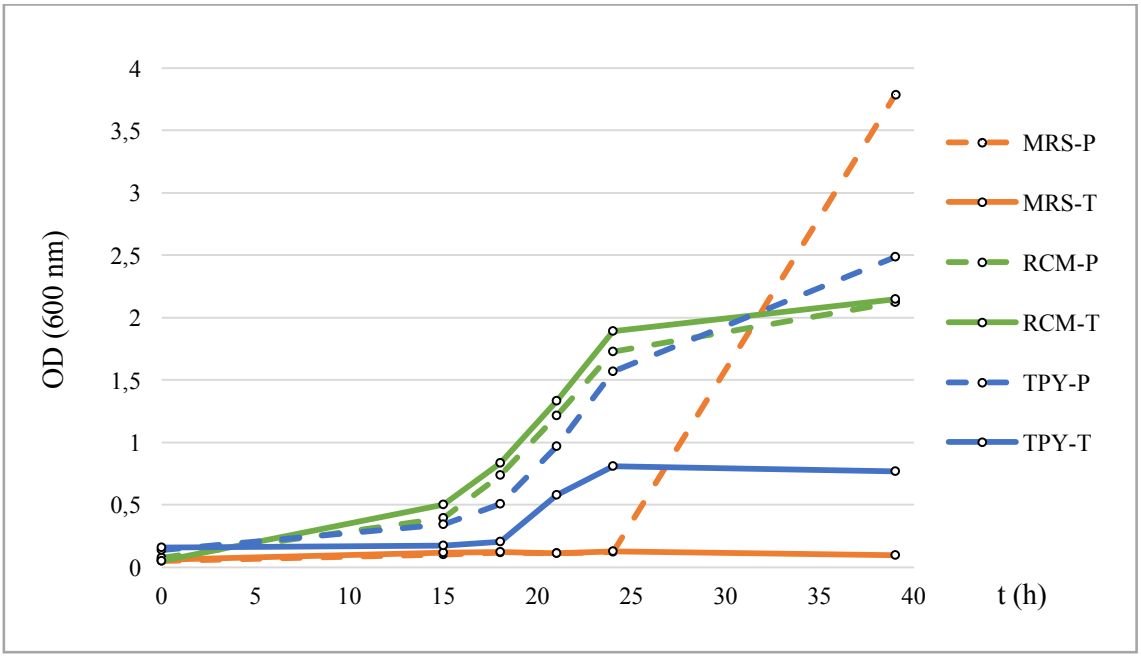
Szabad *B. lactis* sejtek esetében steril kémcsövekbe 1-1 ml-t mértem ki a Bb-12 sejtszuszpenzióból, a különböző kapszulák esetében pedig a steril körülmények között kémcsövekbe kimért 0,5 g gyöngyhöz adtam 1 ml peptonvizet. A kísérlet során a kémcsöveket 60°C-os vízfürdőbe helyeztem, és fél perc felmelegedési idővel számolva a megfelelő időrtartamon keresztül hőkezelés alá vetettem a sejteket. A folyamat leállítása céljából a kezelés befejeztével a kémcsöveket 4°C -os jeges közegbe helyeztem körülbelül 10 mp-ig, mivel ennyi idő alatt már kellő mértékű a lehűlés, viszont a sejtek még nem roncsolódnak. A kísérlet végén a szabad sejteket azonnal ki tudtam vinni a hígítási sorba, a hőkezelt gyöngyöket pedig 4 ml foszfát pufferben oldottam fel, hogy elvégezhessem a sejtszámlálást.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Különböző tápközegek összehasonlítása a *Bifidobacterium lactis* felszaporítása céljából

Kísérletem során a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzset különböző tápközegekben tenyésztettem, annak érdekében, hogy minél nagyobb sejtszámot biztosítsak a sejtkapszulázási kísérletekhez. A fenntartáshoz általánosan használt TPY tápleves mellett, MRS és RCM tápleveseket is alkalmaztam, s minden tápleves esetén mind Trypticase pepton (pl. MRS-T), mind Proteose pepton (pl. MRS-P) hozzáadásával végeztem el a kísérletet.

A *B. lactis* Bb-12 törzs számára legelőnyösebb tápleves kiválasztásához szükség volt az optikai denzitás (OD) meghatározására spektrofotométer segítségével. A mérést 600 nm-en valósítottam meg, mivel itt, az UV-VIS tartományban a legnagyobb a baktériumok fényelnyelése. A mintavételeket és az OD méréseket a 15., 18., 21., 24. és 39. órában végeztem.

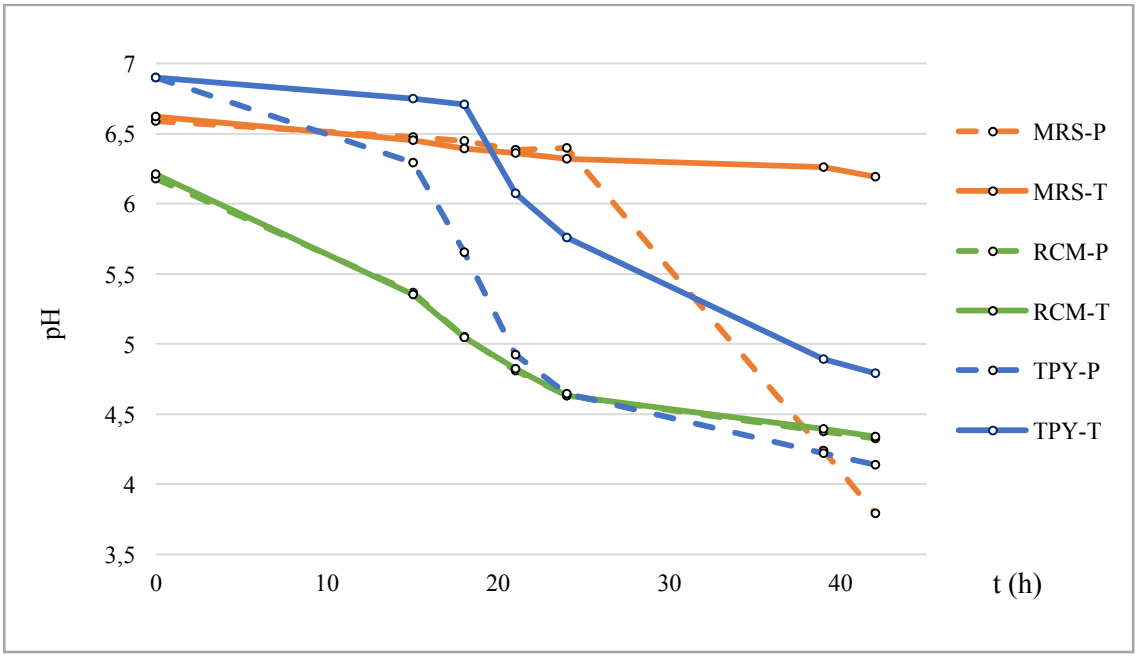


3. ábra: Különböző táplevesek optikai denzitásának változása *B. lactis* Bb-12 szaporítása során az idő függvényében (P: Proteose pepton; T: Trypticase pepton)

Az eredmények alapján jól látszik (3. ábra), hogy a Proteose peptont tartalmazó MRS tápleves jelentősen kiugró értéket jelölt, azonban a Trypticase peptont tartalmazó MRS táplevesben való szaporítás szinte semmilyen sejtnövekedést nem eredményezett. Az RCM tápleves hasonló abszorbanciát mutatott mind a Proteose, mind a Trypticase peptonnal

készített variációban, 39 óra elteltével körülbelül 2,1-es értéket. A TPY tápleves esetében viszont jelentős eltérés figyelhető meg, hiszen 39 óra elteltével a Trypticase peptont tartalmazó tápleves optikai denzitása csupán 0,77 volt, míg a Proteose peptont tartalmazó tápleves 2,49-es abszorbancia értéket mutatott.

Ezenkívül a minták pH értékét is meghatároztam (4. ábra), hogy komplexebb képet kapjak a baktériumok szaporodásáról. A *Bifidobacterium*-ok optimális szaporodása 4,5 és 8,5-ös pH értékek között valósul meg, ebből kifolyólag a savas pH kifejezetten kedvez a *Bifidobacterium lactis* szaporodásának (Rokka és Rantamäki, 2010). A mintavételeket és a pH méréseket a 15., 18., 21., 24., 39. és 42. órában végeztem.



4. ábra: A táplevesek pH változása *B. lactis* Bb-12 szaporítása során az idő függvényében (P: Proteose pepton; T: Trypticase pepton)

A Proteose peptont tartalmazó MRS tápleves a pH mérésnél is kiugró értéket mutatott, így ezt a hibák elkerülése érdekében nem vettem figyelembe. A Trypticase peptont tartalmazó MRS tápleves pH csökkenése az OD értékek alapján, a vártnak megfelelően minimális, így ez a tápleves a legkevésbé alkalmas a Bb-12 szaporítására. Az RCM táplevesek pH-ja végig rendkívül hasonlóan alakult, és 42 óra elteltével 4,3-ra csökkent.

A 3. és 4. ábrán is jól látható, hogy a 15-24 óráig tartó szakaszban a legtöbb esetben exponenciális sejtszaporodás ment végbe, így ez a szakasz tulajdonképpen a baktériumok növekedési görbéjének logaritmusos fázisaként értendő.

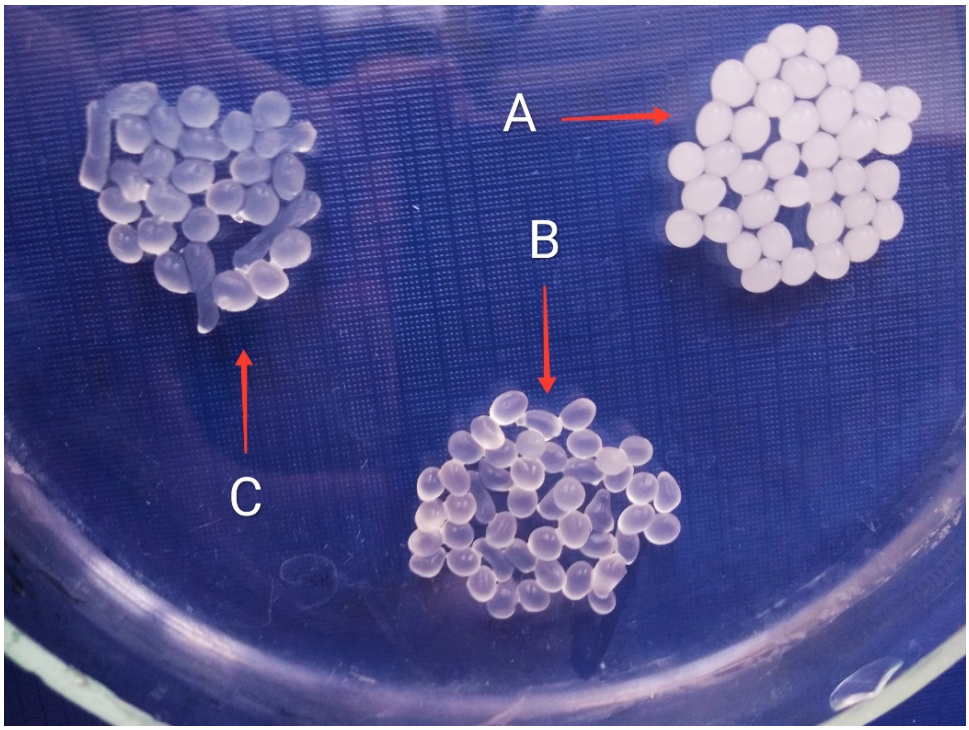
Az optikai denzitást és a pH értékeket is figyelembe véve, további kísérleteimhez a Proteose peptonnal elkészített TPY táplevest választottam, mivel 42 óra elteltével 4,14-ig csökkent a pH értéke, valamint 600 nm-en ez mutatta a legnagyobb abszorbancia értéket.

5.2. Sejtek bezárása extrúziós technikával

A *Bifidobacterium lactis* Bb-12 probiotikus sejteket extrúziós mikrokapszulázási technikával alginát alapú gélgyöngyökbe zártam. Korábbi eredmények alapján a különböző prebiotikum kiegészítéssel ellátott kalcium-alginát gyöngyök nagyobb ellenállást biztosítottak a sejteknek (Ta, 2017). Ezek alapján a kapszulák segédanyagaként 3 prebiotikumot választottam - rezisztens keményítő, laktoszukróz és laktulóz - és 1:1 arányban alkalmaztam nátrium-algináttal. Mindegyik esetben meghatároztam a kapszulázási hatékonyságot és a kapott eredményeket összehasonlítottam.

5.2.1. Kapszulák mérete és morfológiai tulajdonságai

A különböző összetételű kapszulák morfológiája az 5. ábrán látható.



5. ábra: Extrúziós technikával készült kalcium-alginát gyöngyök morfológiája

A: Rezisztens keményítő-alginát alapú gyöngyök

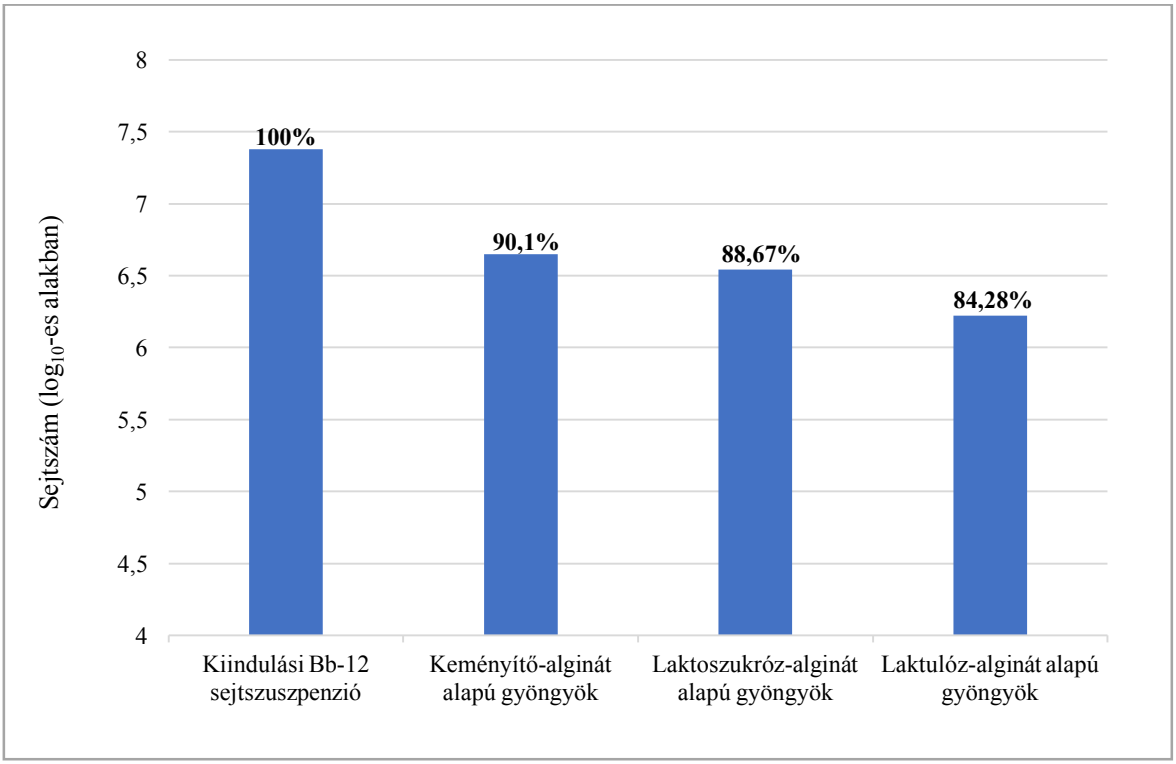
B: Laktoszukróz-alginát alapú gyöngyök

C: Laktulóz-alginát alapú gyöngyök

A rezisztens keményítő-alginát alapú gyöngyök fehér színűek, mely a keményítő színéből adódik. Viszkózus, átláthatatlan, gömb formájúak, átmérőjük 10 gyöngyöt átlagolva 0,29 mm. A laktoszukróz-alginát alapú gyöngyökre már opálosabb szín jellemző, formájuk kevésbé gömb, inkább tojás alakúak, átlagos átmérőjük 0,25 mm. A laktulózt tartalmazó gyöngyök esetében megfigyelhető a lazább szerkezet, ezt mutatja a változékony morfológia, néhol gömb, néhol pálcika formájúak. Ezek a kapszulák a leginkább áttetszőek és átmérőjük átlagosan 0,28 mm.

5.2.2. Kapszulázási hatékonyság

Kísérletem során a kiindulási *Bifidobacterium lactis* tenyészet sejtszáma átlagosan $2{,}4*10^7$ TKE/g volt, lemezöntéses módszerrel dolgozva. A kapszulázási hatékonyság meghatározásához ezt a kiindulási értéket 100%-nak tekintettem, és ehhez viszonyítottam a mikrokapszulázás eredményességét a bezárt sejtek mennyisége alapján. A különböző összetételű kapszulák esetén meghatározott kapszulázási hatékonyságot a 6. ábrán mutatom be.



6. ábra: A *B. lactis* Bb-12 sejtek kapszulázási hatékonyságának összehasonlítása extrúziós technika esetén

A rezisztens keményítő-alginát alapú gyöngyök sejtszáma átlagosan $4,46*10^6$ TKE/g volt, tehát a kapszulázási hatékonyság 90,1%. Vidhyalakshmi és munkatársai (2009) eredményei alapján rezisztens keményítő hozzáadása javítja a probiotikumok kapszulázási hatékonyságát. A laktoszukrózt tartalmazó mikrokapszulák esetében a sejtszám átlagosan $3,5*10^6$ TKE/g volt, a laktulóz tartalmú gyöngyök esetében pedig $1,66*10^6$ TKE/g, tehát a kapszulázási hatékonyság 88,67% valamint 84,28% lett.

Yari és munkatársai (2015) eredményei alapján az extrúziós technikával kalcium-alginát gyöngybe zárt *B. lactis* Bb-12 törzs kapszulázási hatékonysága 82% volt. Továbbá megállapították, hogy *Lactobacillus acidophilus* La-5 törzs esetében csupán 77% volt a kapszulázási hatékonyság, azonos paraméterek mellett. Tehát szakirodalmi adatok alapján a *B. lactis* Bb-12 sejtek kapszulázási hatékonysága valamennyi kapszulatípus esetén meghaladta a várt értéket, így megállapítható, hogy a prebiotikumként alkalmazott rezisztens keményítő, a laktoszukróz és a laktulóz is megfelelő segédanyagnak bizonyult a mikrokapszulák kialakításához.

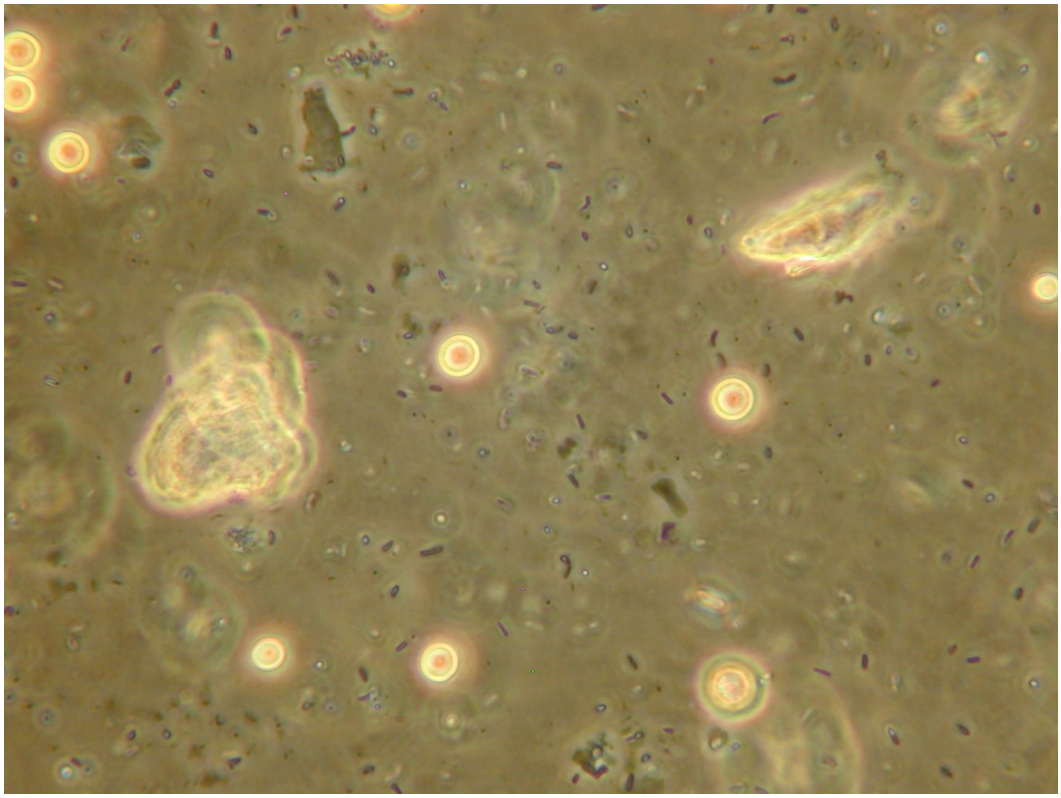
5.3. Sejtek bezárása nioszómák előállításával

Kísérletet tettem a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 sejtek nioszómákba történő kapszulázására. Tekintve, hogy a nioszómák leginkább hatóanyag-szállító rendszerként való alkalmazása került középpontba, probiotikumok nioszomális kapszulázásáról eddig még nincsenek tudományos adatok.

Kísérletemben a nioszómák előállításához a vékonyréteg hidratációs módszer lépéseit követtem, ehhez a pronioszóma filmréteg kialakítását Span 60, koleszterin és kloroform összetevők felhasználásával végeztem Moghassemi és Hadjizadeh (2014) munkája alapján. Továbbá maltodextrines kiegészítést is alkalmaztam, mely prebiotikumként funkcionál (Anekella és Orsat, 2004). Végül a nioszómák hatékony kialakításának érdekében szonikálást is végeztem. A vékonyréteg hidratációs módszer kivitelezése után megállapítottam, hogy a pronioszóma kialakításának művelete sikeres volt. A filmréteg hidratálását, a *B. lactis* Bb-12 sejtek kapszulázását, valamint a szonikálást követően előállított nioszóma szuszpenziót fénymikroszkóppal vizsgáltam.

5.3.1. Mikroszkópos vizsgálat

A fénymikroszkópos vizsgálat során célom a nioszóma kialakulás sikerességének ellenőrzése, valamint a nioszóma kapszula morfológiájának és a szuszpenzió összetételének elemzése volt. A sikeresen előállított nioszómák a 7. ábrán láthatóak.



7. ábra: Unilamelláris nioszómák fénymikroszkópos képe (100x-os nagyításban)

A 7. ábrán láthatóak a vékonyréteg hidratációs módszerrel, valamint szonikálással kialakított unilamelláris nioszómák. A mikroszkópos képen fényes fehér gyűrűként jelentek meg, melyet a fénytörés befolyásolhatott. A kettősréteg rendkívül stabil szerkezetet alakított ki, melyhez feltételezhetően a maltodextrines kiegészítés is hozzájárult. Ezenkívül a nioszóma szuszpenzióban jelen volt bizonyos mennyiségű kristályos törmelék, melyet az esetlegesen visszamaradt kloroform, vagy a hidratáló oldatként alkalmazott PBS eredményezhetett. A nioszómákba zárt *B. lactis* sejtek mennyiségét azonban nem volt módom meghatározni.

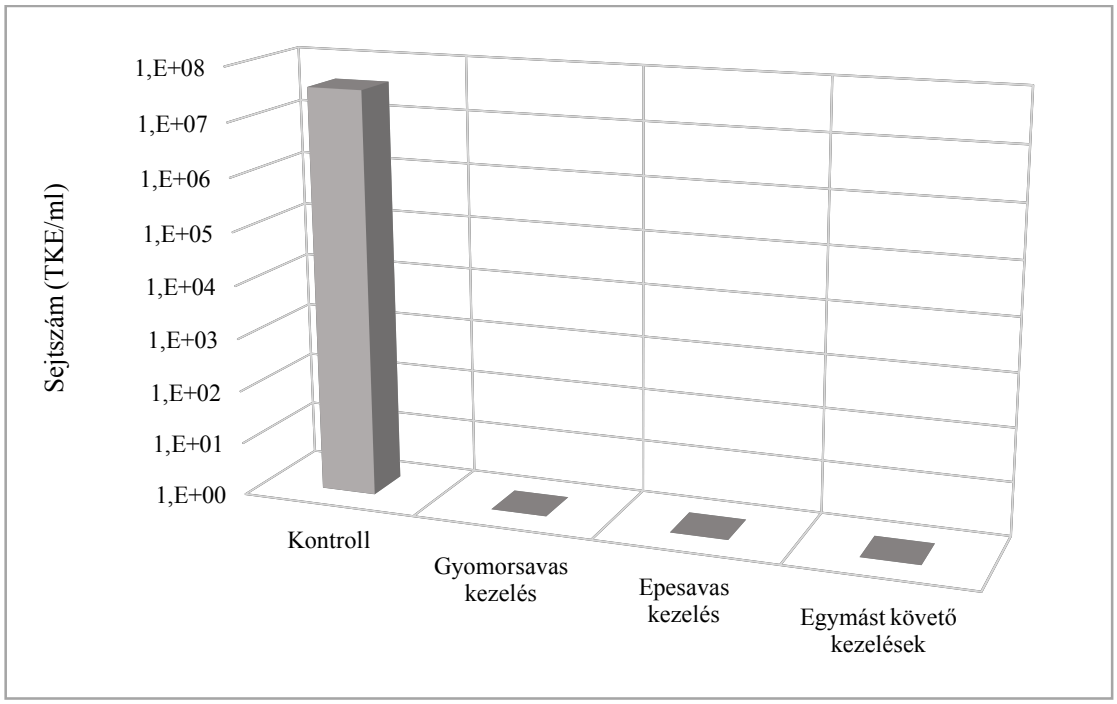
5.4. A gyöngyökbe zárt sejtek életképességének vizsgálata

Kutatásaim során alkalmazott kapszulázási módszerek közül az extrúziós technika bizonyult eredményesebbnek a kapszulázási hatékonyság meghatározása alapján, tehát további kísérleteimet ezen módszerrel létrehozott mikrokapszulákon végeztem el. A gyöngyökbe zárt sejteket emésztési modell kísérletnek, valamint 60°C-os hőkezelésnek tettem ki. Az eredmények értékeléséhez a *B. lactis* Bb-12 szabad sejtekkel végzett kísérletek kiváló összehasonlítási alapot adtak a kapszulázott sejtekkel végzett kísérletekhez.

5.4.1. Emésztés hatásának vizsgálata

Kísérletem során a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzs túlélését teszteltem szimulált gasztrointesztinális tranzit során, *in vitro* modell segítségével. Kutatások szerint a mikrokapszulázás ígéretes megoldást nyújt a szenzitív probiotikus mikroorganizmusoknak a gyomorban és vékonybélben uralkodó extrém körülmények túlélésére (Shori, 2017).

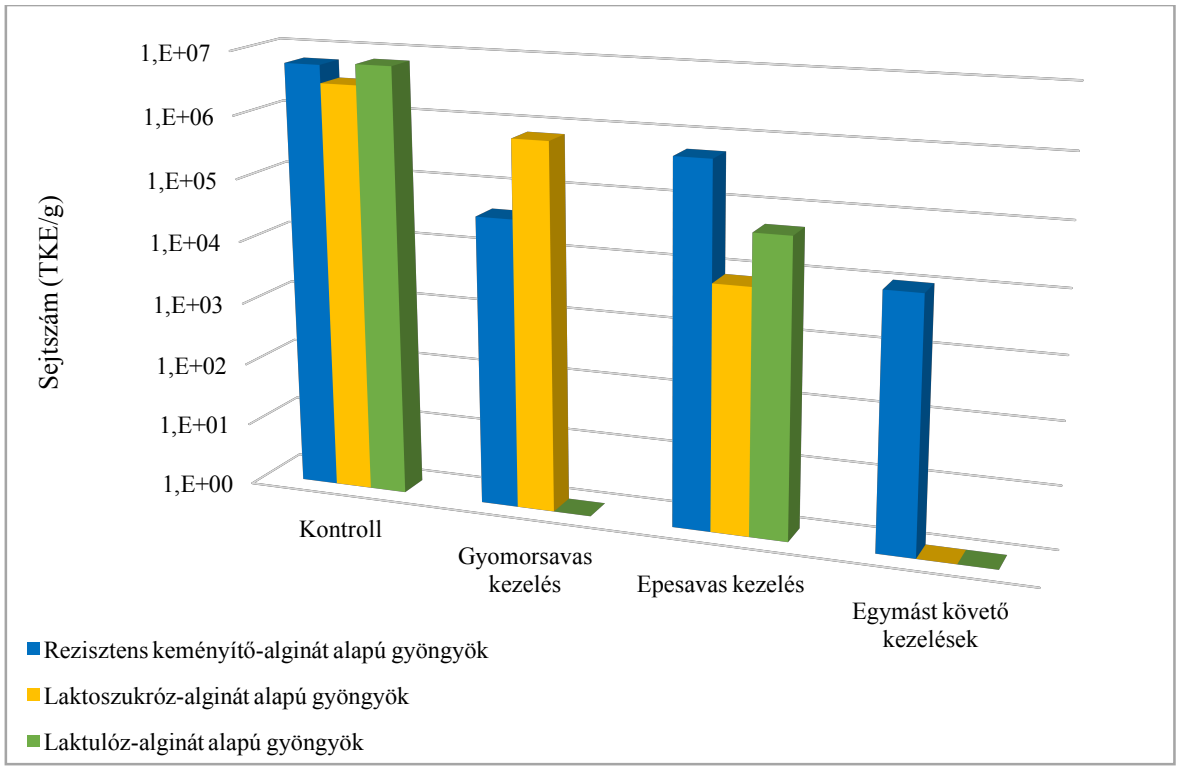
Célom a szabad *B. lactis* sejtek és a különböző prebiotikumos kiegészítésekkel (rezisztens keményítő, laktoszukróz és laktulóz) kalcium-alginát gélgyöngyökbe kapszulázott sejtek túlélőképességének összehasonlítása volt szimulált emésztőrendszeri körülmények között, gyomornedvet és vékonybél közeget modellező oldat segítségével. Ennek eredményeit a 8. és 9. ábrán ismertetem.



8. ábra: *B. lactis* Bb-12 szabad sejtek túlélése emésztési modell kísérlet során

A szabad sejtek kezeletlen, kontroll sejtszáma $3{,}8*10^7$ TKE/ml volt (8. ábra), azonban mindegyik kezelés során elpusztultak a sejtek, nem voltak képesek túlélni az emésztőrendszerben uralkodó extrém körülményeket. Számos kutatás során vizsgálták kapszulázott probiotikus sejtek (köztük *Bifidobacterium*) túlélését *in vitro* körülmények között, gyomor- és epesavas közegben, és a szabad sejtek lényegesen kisebb arányban (Vidhyalakshmi et al., 2009), valamint egyáltalán nem voltak életképesek (Shori, 2017) a többek között algináttal kapszulázott probiotikus sejtekhez képest.

Kísérletem során a különböző alkotóanyagú kapszulákba bezárt sejtek szimulált emésztőrendszeri körülmények hatására változatos túlélési rátát eredményeztek, melyet a 9. ábra szemléltet. A kontroll sejtszámok mindegyik kapszulatípus esetében nagyságrendileg 10^6-10^7 TKE/g közé tehetőek, ezekhez vizonyítottam a kezelt sejtek életben maradását.



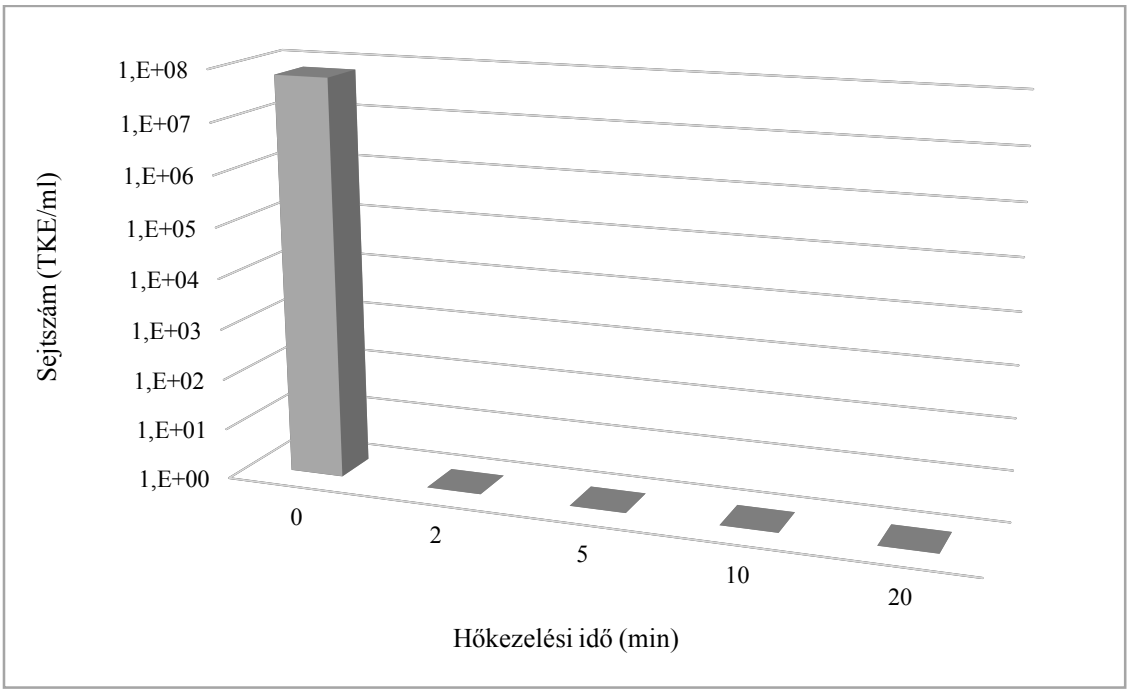
9. ábra: Különböző összetételű gélgyöngyökbe kapszulázott *B. lactis* Bb-12 sejtek túlélése szimulált emésztési modell kísérlet során

A 135 perces gyomorsavas kezelés hatására a rezisztens keményítő tartalmú kapszulák esetében jelentős sejtpusztulás volt megfigyelhető, amely esetében csupán $4*10^4$ TKE/g sejt maradt életben. A laktoszukróz tartalmú gyöngyök ehhez képest nagyobb rezisztenciát mutattak, melynek köszönhetően $6{,}7*10^5$ TKE/g sejtmennyiség állt ellen a gyomorsavas közeg degradáló hatásának. A laktulóz tartalmú gyöngyökbe zárt sejtek azonban teljes mértékben elpusztultak e kezelés során. A 150 perces epesavas kezelés hatására mindegyik kapszulatípus esetén voltak kimutatható életképes sejtek, azonban egyedül a keményítő tartalmú kapszulában lévő sejtek rezisztenciája volt kiemelkedő ($5{,}6*10^5$ TKE/g). Az egymást követő kezelések hatására a laktoszukróz és laktulóz tartalmú gyöngyökbe zárt probiotikus sejtek elpusztultak, a keményítő-alginát alapú gyöngyök esetén pedig egy minimális sejtszám (10^4 TKE/g) maradt életképes.

Bár a rezisztens keményítővel kapszulázott *Bifidobacterium*-okról kimutatták, hogy képesek túlélni az emberi tápanyagcsatornán való áthaladást (Amin et al., 2013), kísérletem során, az egymást követő kezelések eredményeit a kezdeti sejtszámhoz viszonyítva csupán 0,17% élte túl. Ennek oka lehetett a gélgyöngyök nehézkes oldódása foszfát pufferben (főleg a gyomorsavas kezelést követően), mivel a mechanikus sejtfeltárási módszerek (erőteljes rázatás) esetén a gyöngyök tökéletlen oldódása, vagy annak káros hatásai módosíthatták a sejtszámlálás eredményét (Heidebach et al., 2012).

5.4.2. Hőkezelés hatásának vizsgálata

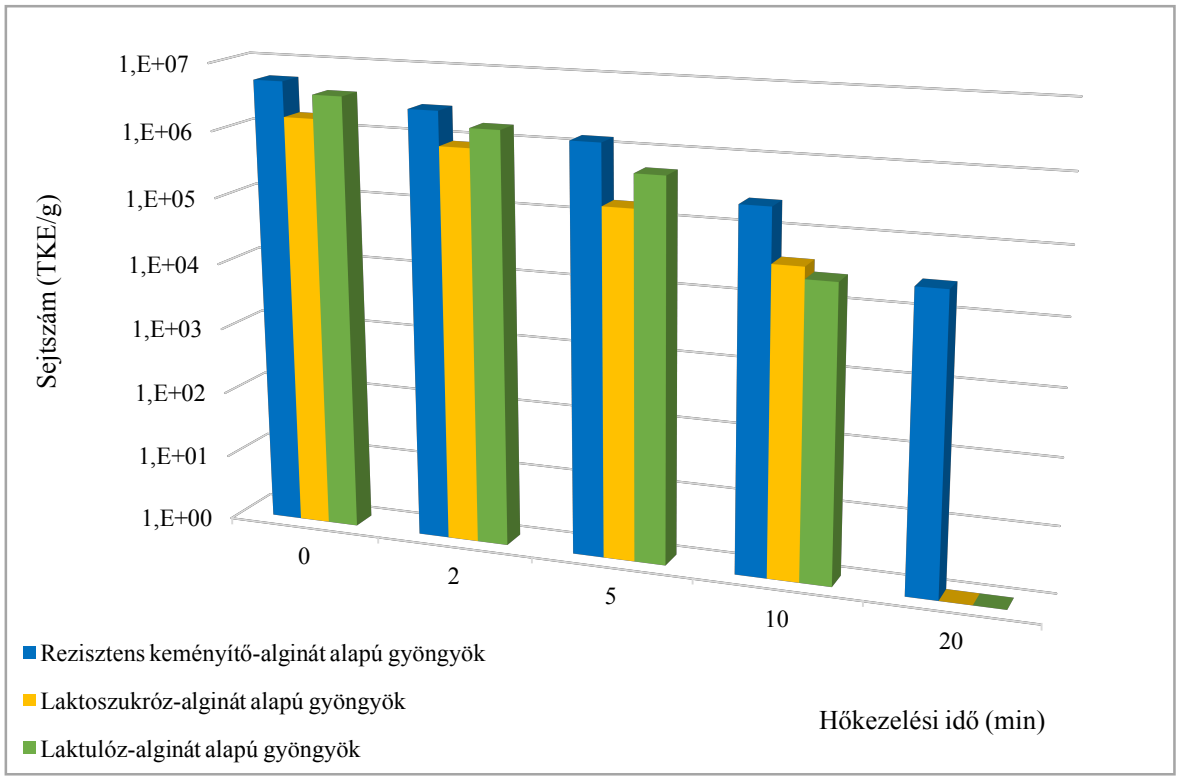
Kísérletem során a szabad és a különböző prebiotikumos kiegészítésekkel kapszulázott *B. lactis* Bb-12 törzset 60°C-os hőmérsékletnek tettem ki 5, 10, 15 és 20 percen keresztül, és vizsgáltam a baktériumok túlélését. Célom az volt, hogy megállapítsam, vajon a hőkezelés ellenére biztosítható-e megfelelő mennyiségű *Bifidobacterium lactis* egy probiotikus termék előállításához. A kapott eredményeket a 10. és 11. ábrán mutatom be.



10. ábra: *B. lactis* Bb-12 szabad sejtek túlélése 60°C-os hőkezelés során

Az eredmények alapján a szabad sejtek kiindulási sejtszáma $6{,}7*10^7$ TKE/ml volt (10. ábra), azonban már 2 perces hőkezelés során valamennyi sejt elpusztult, nem élték túl a 60°C-os hőmérsékletet.

A hőkezelt sejtek életképessége a 11. ábrán látható módon, mindhárom típusú kapszula esetében a hőhatás időtartamával arányosan változott.



11. ábra: Különböző összetételű gélgyöngyökbe kapszulázott *B. lactis* Bb-12 sejtek túlélése 60°C-os hőkezelés során

A kiindulási, kontroll sejtszámok eltérést mutattak, azonban 2 perces hőkezelés hatására nagyságrendileg a sejtek fele maradt életben a különböző kapszulatípusok esetén. 5 perces hőkezelés hatására tovább csökkentek a sejtszámok, mellyel szignifikáns sejtpusztulás figyelhető meg. A rezisztens keményítő tartalmú kapszulákban 10 perces kezelés után a sejtszám $2{,}52*10^5$ TKE/g volt, míg a laktoszukróz és laktulóz tartalmú kapszulák esetében már egy nagyságrenddel kevesebb. Fontos megemlíteni, hogy a rezisztens keményítőt tartalmazó alginát alapú gyöngyökben a 20 perces hőkezelést követően kimutatható volt egy minimális mennyiségű életképes sejttömeg, így mindezek alapján elmondható, hogy a keményítőt tartalmazó gyöngyök voltak a legellenállóbbak.

Összességében megállapítható, hogy magas kiindulási sejtszám esetén, főként rezisztens keményítő-alginát alapú gyöngyök alkalmazásával, a hőkezelés okozta csökkenést is figyelembevéve, biztosítható megfelelő sejtszám egy probiotikus termék előállításához.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A funkcionális élelmiszerek, köztük a probiotikumok feltételezhetően hatalmas fejlődés előtt állnak, kutatásuk az élelmiszeripar egyik vezető irányzata, így piaci értékük és biológiai potenciáljuk óriási. A probiotikumok megoldást kínálhatnak számos globális problémára, kutatások már gyógyszerként való alkalmazásukat is vizsgálják, mely előreláthatólag versenyképes alternatíva lehetne a túlzott antibiotikum fogyasztás problémájával szemben is. Ezen felül, a szervezetünkben élő probiotikus baktériumok számos már ismert, pozitív élettani hatásán túlmenően, egyre konkrétabb, komplexebb funkcióit fedezik fel.

A probiotikus termékek valóban hatékony fogyasztásához azonban szükségünk van az élő baktérium sejtek életképességének megőrzésére, erre kínál ígéretes technológiai megoldást a mikrokapszulázás. A probiotikus baktériumok különböző hordozóanyagokba való kapszulázása védelmet nyújt a kedvezőtlen feldolgozási és tárolási körülményekkel szemben, és ennek köszönhetően a fogyasztás pillanatában kellő mennyiségű élő sejtet tartalmazhat az adott termék. A mikrokapszulázás legfontosabb szerepe azonban még ezek után következik, amikor a probiotikumnak az emésztőrendszeren való áthaladást szükséges túlélnie, ellenállva a gyomorsavnak, emésztőenzimeknek, valamint az epesavnak, míg el nem éri a vastagbelet, ahol a bélfalon megtapadva kolonizálódni, szaporodni képes.

Mindezekből kiindulva, kutatómunkám céljául a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzs mikrokapszulázását tűztem ki. Kísérletimet azért ezzel a probiotikus törzzsel végeztem, mert korábbi kutatások szerint kiváló élettani és ígéretes technológiai tulajdonságokkal rendelkezik. Különböző mikrokapszulázási módszereket alkalmaztam, köztük a már jól ismert extrúziós technikát, valamint a még kevésbé elterjedt, micellás rendszer alapú nioszomális kapszulázást.

Az extrúziós eljárás során a probiotikus *Bifidobacterium lactis*-t a technika speciális lépéseit követve alginát-alapú gélgyöngyökbe zártam, valamint a nagyobb hatékonyság érdekében különböző prebiotikumokkal (rezisztens keményítő, laktoszukróz, laktulóz) egészítettem ki. A kapszulázási hatékonyság meghatározásával megkaptam a különböző összetételű kapszulákba zárt *B. lactis* sejtek százalékos arányát, mely a rezisztens keményítő-alginát alapú gyöngy esetében 90,1%, a laktoszukróz-alginát alapú gyöngy esetében 88,67%, valamint a laktulóz-alginát gyöngy esetében 84,28% volt. Szakirodalmi adatok alapján megállapítottam, hogy ezek az eredmények megfeleltek a várt értékeknek, tehát az extrúziós kapszulázási technika megvalósítása mindegyik kapszulatípus esetében sikeres volt.

Továbbá a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 sejtek nioszómákba történő kapszulázására is kísérletet tettem. Ez a módszer leginkább a hatóanyag-szállítással összefüggésben terjedt el, mivel a nioszómák alkalmazását számos kutatás ígéretes megoldásnak találta gyógyszer komponensek szállítására. A nioszómák különlegessége, hogy egyedi szerkezetüknek köszönhetően lehetővé teszik, hogy egyszerre szállítsanak mind hidrofil, mind hidrofób komponenseket. Tekintve, hogy a probiotikumok nioszómákba történő kapszulázásáról még nincsenek tudományos eredmények, kísérletem egy lehetséges nioszóma alkalmazási alternatívát vizsgált. A nioszómák vékonyréteg hidratációs eljárással és szonikálással való kialakítását követően fénymikroszkópos vizsgálatot végeztem, és ennek alapján megállapítottam, hogy valóban létrejöttek a kívánt nioszómák. Azonban a bezárt *B. lactis* sejtek mennyiségét, így a kapszulázási hatékonyságot nem állt módomban meghatározni.

További kísérleteim során az extrúziós mikrokapszulázási technológiával kialakított, különböző összetételű gélgyöngyökbe kapszulázott *Bifidobacterium lactis* sejtek életképességét teszteltem *in vitro,* gasztrointesztinális körülmények között, valamint hőkezelési kísérletek során.

Elsőként a *B. lactis* sejtek túlélőképességét szimulált emésztőrendszeri kísérletek során, gyomornedvet és vékonybél közeget modellező oldat alkalmazásával vizsgáltam. Kísérletem változatos eredményeket hozott, már a gyomorsav hatására szignifikánsan lecsökkent a kapszulázott probiotikus baktériumok száma, míg az epesavas kezelés kevésbé volt sejtpusztító hatású. A legjobb ellenállóképességet azonban a rezisztens keményítő tartalmú kapszulák mutatták, mivel az egymást követő emésztési kezeléseket követően még maradtak életképes sejtek.

Továbbá a *B. lactis* sejteket hőkezelés alá vetettem, mely 60°C-os vízfürdőben zajlott, és 5, 10, 15 valamint 20 percen keresztül vizsgáltam a sejtek túlélését. A kapszulázott *B. lactis* sejtek életképessége a különböző összetételű gélgyöngyökben a hőkezelés időtartamával arányosan csökkent. A legkiemelkedőbb eredményt adó kapszulatípus ebben az esetben is a rezisztens keményítő-alginát alapú kapszula volt, amelynél magas kiindulási sejtszám esetén a hőkezelés ellenére is biztosítható volt megfelelő sejtmennyiség.

Összességében megállapítható, hogy az eredmények alapján mindegyik kapszulatípus alkalmas lehet a *Bifidobacterium lactis* sejtek életképességének megőrzésére egy probiotikus termék előállításához - különösen nagyobb kiindulási sejtszám alkalmazása esetén -, mindazonáltal a legalkalmasabbnak a rezisztens keményítő tartalmú kapszulák bizonyultak. Kísérleteim kiindulási alapot képezhetnek az alginát-alapú mikrokapszulák stabilitásának növelésére különböző probiotikus termékek előállítása során.

A jövőben további kutatásokra lenne szükség a szimulált emésztőrendszeri vizsgálatokra vonatkozólag, esetleg újabb kapszulaanyagok, vagy kombinációjuk kedvezőbb technológiai tulajdonságainak felderítésére. Továbbá fontos lehet a mikrokapszulák méretének csökkentése is, mely szem előtt tartandó az élelmiszerek érzékszervi tulajdonságainak megítélésénél, azonban ronthatja a probiotikus sejtek életképességét. Bár a kisebb kapszulaméret megvalósulhatna a nioszómák esetében, a kapszulázási hatékonyság meghatározásához, valamint a probiotikumok kiszabadulásához szükség van a nioszómák feltárására, és ezzel egy időben a bezárt sejtek életben maradására, így ennek pontos felderítése is további lehetőségeket nyújt a téma folytatására.

7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Amin, T., Thakur, M., Jain, S. C. (2013): Microencapsulation-the future of probiotic cultures. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 3(1): 35-43.

2. Anekella, K., Orsat, V. (2014): Shelf life stability of lactobacilli encapsulated in raspberry powder: Insights into non-dairy probiotics. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 65(4): 411-418.

3. Brigham and Women's Hospital (2019): New therapy targets gut bacteria to prevent and reverse food allergies. *Science Daily*. www.sciencedaily.com/releases/2019/06/190624111545.htm (Megtekintési dátum: 2019. augusztus 11.)

4. Bron, P. A., Kleerebezem, M., Brummer, R.-J., Cani, P. D., Mercenier, A., MacDonald, T. T., Garcia-Ródenas, C. L., Wells, J. M. (2017): Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *The British Journal of Nutrition*. 117(1): 93-107. DOI: 10.1017/S0007114516004037

5. Brown, I. L., Warhurst, M., Arcot, J., Playne, M. J., Illman, R. J., Topping, D. L. (1997): Fecal Numbers of Bifidobacteria are Higher in Pigs Fed *Bifidobacterium longum* with a High Amylose Cornstarch than with a Low Amylose Cornstarch. *The Journal of Nutrition*. 127(9): 1822-1827. DOI: 10.1093/jn/127.9.1822

6. Brown, I. L., Wang, X., Topping, D. L., Playne, M. J., Conway, P. L. (1998): High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. *Food Australia*. 50(12): 603-610.

7. Das, A., Ray, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. (2014): Microencapsulation of Probiotic Bacteria and its Potential Application in Food Technology. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. 7(1): 47-53. DOI: 10.5958/j.2230-732X.7.1.007

8. Deák T., Kiskó G., Maráz A., Mohácsiné F. Cs. (2006): Élelmiszer mikrobiológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

9. De Prisco, A., Mauriello, G. (2016): Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science and Technology*. 48: 27-39. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.11.009

10. Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. (1999): Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81(1): 1-27.

11. Figler, M., Rab, R., B. Müller, K. (2004): Probiotikumok a humán egészségügy szolgálatában. *Élelmiszer, táplálkozás és marketing*. 1(1-2): 25-29.

12. Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66(5): 365-378. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x

13. Gibson, G. R., Williams, C. M. (2000): Functional food. Concept to product. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England. ISBN 1-85573-503-2

14. Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. (2004): Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17(2): 259-275. DOI: 10.1079/NRR200479

15. Halmos T., Suba I. (2016): A bélbakterióta élettani jellemzői és a dysbacteriosis szerepe az elhízásban, inzulinrezisztenciában, diabetesben és metabolikus szindrómában. *Orvosi Hetilap*. 157(1): 13-22. DOI: 10.1556/650.2015.30296

16. Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2012): Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52(4): 291-311. DOI: 10.1080/10408398.2010.499801

17. Johnson, K. V.-A., Foster, K. R. (2018): Why does the microbiome affect behaviour? *Nature Reviews Microbiology*. 16: 647-655.

18. Joint FAO/WHO Working Group. (2002): Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In *Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Joint Food and Agriculture Organization and World Health Organization Working Group London, Ontario, Canada.

19. Kailasapathy, K. (2002): Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 3(2): 39-48.

20. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003): Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal.* 13(1): 3-13. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00155-3

21. Misra, A., Florence, K., Lalan, M., Shah, T. (2010): Surfactants and block copolymers in drug delivery. Chapter 1. In: Fanun, M. (ed.) (2010): Colloids in Drug Delivery. CRC Press, Boca Raton. ISBN 978-1-4398-1825-1

22. Mitsuoka, T. (1990): Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology.* 6(4): 263-268. DOI: 10.1007/BF01575871

23. Moghassemi, S., Hadjizadeh, A. (2014): Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *Journal of Controlled Release*. 185: 22-36. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.04.015

24. Nilegaonkar, S., Agte, V. V. (2010): Prebiotics. Chapter: 27. In: Pandey, A., Soccol, C. S., Larroche, C., Gnansounou, E., Singh-Nigam, P., Dussap, C.-G. (eds.) (2010): Comprehensive Food Fermentation Biotechnology. Asiatech Publishers Inc., New Delhi. ISBN 81-87680-23-7

25. Nomoto, K. (2005): Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100(6): 583-592. DOI: 10.1263/jbb.100.583

26. Rokka, S., Rantamäki, P. (2010): Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*. 231(1): 1-12. DOI: 10.1007/s00217-010-1246-2

27. Sanders, M. E. (2000): Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health. *The Journal of Nutrition*. 130(2): 384-390. DOI: 10.1093/jn/130.2.384S

28. Sarao, L. K., Arora, M. (2017): Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. *57*(2): 344-371. DOI: 10.1080/10408398.2014.887055

29. Sheu, T. Y., Marshall, R. T. (1993): Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*. 54(3): 557-107561.

30. Shori, A. B. (2017): Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences*. 24(1): 1-5. DOI: 10.1016/j.hjb.2016.12.008

31. Szacsky M. (2018): Aktuális tudományos hírek - Probiotikum. *Pannon Palatinus.* http://www.pannonpalatinus.hu/wp-content/uploads/2018/09/baci-cikk-pdf-1.pdf (Megtekintési dátum: 2019. január 16.)

32. Szakály S. (2004): Probiotikumok és humánegészség. G-Print Nyomda, Budapest.

33. Ta, Phuong Linh (2017): The Effect of Textural Attributes on the Applicability of Gel-Based Microcapsules as Micro Delivery System for Probiotic Bacteria. 5th Central European Forum for Microbiology, Keszthely.

34. Thomson, C., Bloch, A. S., Hasler, C. M., Kubena, K., Earl, R., Heins, J. (1999): Position of the American Dietetic Association: Functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*. 99(10): 1278-1285.

35. Topping, D. L., Fukushima, M., Bird, A. R. (2003): Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62(1): 171-176. DOI: 10.1079/PNS2002224

36. Uchegbu, L. F. (ed.) (2014): Synthetic Surfactant Vesicles: Niosomes and Other Non-Phospholipid Vesicular Systems (Drug Targeting and Delivery Book 11). CRC Press, London. ISBN 0-203-30498-5

37. Vandenplas, Y., Huys, G., Daube, G. (2015): Probiotics: an update. *Journal de Pediatria*. 91(1): 6-21. DOI: 10.1016/j.jped.2014.08.005

38. Vidhyalakshmi, R., Bhakyaraj, R., Subhasree, R. S. (2009): Encapsulation "The Future of Probiotics"-A Review. *Advances in Biological Research*. 3(3-4): 96-103.

39. Yari, M., Fooladi, J., Motlagh, M. A. K. (2015): Microencapsulation and Fermentation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium* Bb-12. *Applied Food Biotechnology*. 2(4): 27-32.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Bujna Erikának, és Ta Phuong Linh-nek, akik munkám során végig segítségemre voltak, és kiemelkedő szakmai tudásukkal, iránymutatásukkal, valamint hasznos tanácsaikkal nagyban hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Külön köszönöm Dr. Szacsky Mihálynak munkám kezdetén nyújtott segítségét, mely biztos alapot és motivációt adott dolgozatom elkészítéséhez.