

Eszterházy Károly Főiskola

Természettudományi Kar

TDK DOLGOZAT

XXXI. OTDK Agrártudományi Szekció

**Fruktán és rezisztens keményítő minták prebiotikus hatásának vizsgálata *in vitro* humán
intesztinális modellben**

Konzulensek:

Dr. Naár Zoltán

Tanszékvezető főiskolai tanár

Kalóczkai Kata

Tudományos segédmunkatárs

Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Élelmiszertudományi Intézet

Készítette:

Gál Viktor

II. évfolyam

Biológus laboratóriumi operátor

Eger

2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2.
1. BEVEZETŐ	4.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5.
2.1 A vastagbél mikrobióta összetétele	5.
2.2 Probiotikumok	6.
2.3 Prebiotikumok	7.
2.4 Szinbiotikumok	9.
2.5 Funkcionális élelmiszerek	10.
3. CÉLKITŰZÉSEK	11.
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	12.
4.1 Szubsztrátok	12.
4.2 Baktérium törzsek	13.
4.3 Tenyésztés körülményei	14.
4.4 Prebiotikus index	15.
4.5 Növekedési ráta	15.
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	16.
5.1 pH értékek	16.
5.1.1 pH értékek a probiotikus baktériumok tiszta tenyészeiből	16.
5.1.2 pH értékek a probiotikus és potenciálisan patogén baktériumok kevert tenyészeiből	20.
5.2 Csíraszám változások és Növekedési ráta értékek	23.
5.2.1 Csíraszám változások és Növekedési ráta értékek a probiotikus baktériumok tiszta tenyészeiből	23.

5.2.2 Csíraszám változások és Növekedési ráta értékek

a probiotikus és potenciálisan patogén baktériumok

kevert tenyészeiből 28.

5.3 PREBIOTIKUS INDEX ÉRTÉKEK 32.

6. ÖSSZEFOGLALÁS 34.

7. IRODALOMJEGYZÉK 36.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 39.

9. NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL

A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ 40.

1. BEVEZETÉS

Egy ideális vastagbél ökoszisztémában a potenciálisan egészségvédő hatással rendelkező mikroorganizmusok túlsúlyban vannak számban és aktivitásban a potenciálisan káros fajok felett, ezt az állapotot „*normobiózisnak*” nevezzük. Ennek az ideális állapotnak a megzavarása patogén baktériumokkal, vagy egyéb ártalmas faktorokkal a „*diszbiózis*” tünet együtteséhez vezethet, amely egy olyan vastagbél mikrobióta kialakulását jelenti, amelyben egy vagy több potenciálisan káros mikroba faj dominanciát élvez a jótékony baktériumok felett, ezzel egy betegségre hajlamosító szituációt teremtve (Roberfroid és mts. 2010).

A prebiotikumokkal kapcsolatos kutatások eredményeiből világosan látszik, hogy a bél mikrobióta aktivitásának szelektív modifikációján keresztül erősíteni lehet a „*normobiózis*” állapotát, mellyel egyrészt kedvező fiziológiás hatások indukálódnak a vastagbélben, illetve redukálni lehet a „*diszbiózis*” állapot kialakulásának és az ezzel összefüggésben kialakuló intesztinális és szisztémás megbetegedések kockázatát.

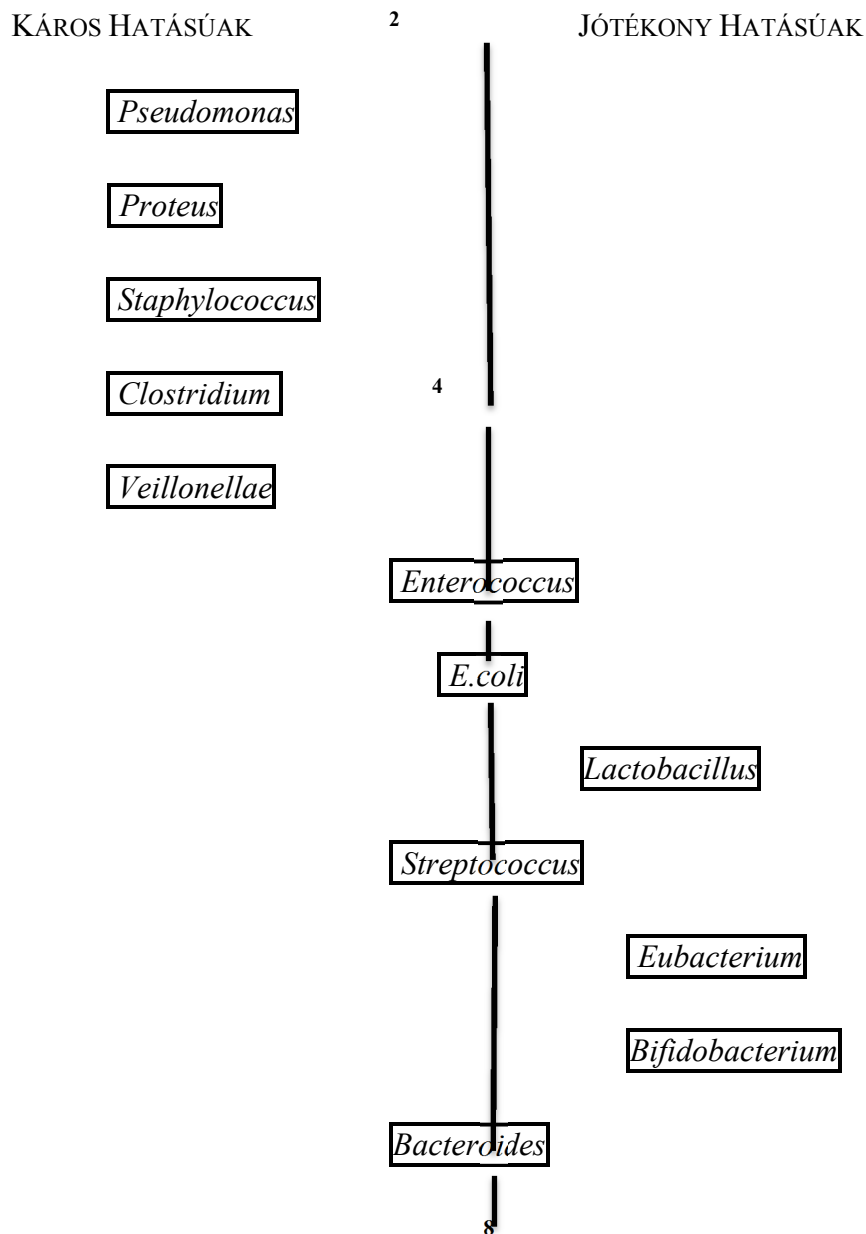
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A vastagbél mikrobióta összetétele

A vastagbél biológiai funkciói a víz és bizonyos elektrolitok felszívódásában és kiválasztásában, ezen kívül a salakanyag raktározási és ürítési folyamataiban vannak. A vastagbél emésztési funkciói mellett fontos az itt lezajló folyamatok egészségi állapotra és közérzetre kifejtett hatására. Ebből a szempontból kiemelkedő fontosságú a bél mikrobióta összetétele és aktivitása (Meyer Á. 2004). Az emberi szervezetben lévő mikroorganizmusok közül a legtöbb a vastagbélben található, 10^{14} baktérium jut a béltartalom minden grammjára. Ez több mint a testi sejtek tízszerese (Holzapfel és mts. 1998). A bélbaktériumok a fermentációs tevékenységük következtében különböző, a szervezetre kedvező és káros hatású végtermékeket képezhetnek. Vannak például olyan bélbaktériumok, melyek a fehérje és szénhidrát anyagcseréjük során különböző rövid láncú zsírsavakat termelnek, ezáltal csökkentik a vastagbél pH-ját, kiszorítva a káros N-nitrozó vegyületeket és a toxinokat termelő baktériumokat (Cummings és mts. 2001, Hijova és mts. 2007). Ezért igen figyelemreméltó a bélflóra összetételének befolyásolása az étrend segítségével.

A baktériumfajokat a szerint is megkülönböztetjük, hogy károsak vagy hasznosak az emberi szervezetre (**1. Ábra**).

1. **Ábra** Az emberi vastagbél mikrobiótájának összetétele (Gibson és Roberfroid 1995)



2.2 A probiotikumok

A tudományos alapokat a probiotikumokkal kapcsolatban először a 20. század elején a Pasteur Intézetben dolgozó Metchnikoff fogalmazta meg (Demeter P. 2005). Magyarországon és a világpiacra is nagy számban elérhetőek a probiotikumokkal dúsított funkcionális élelmiszerek illetve probiotikus törzsek táplálék kiegészítők formájában. A probiotikumok élő mikroorganizmusok, melyek megfelelő mennyiségben adagolva jótékony egészségügyi hatásokat nyújtanak, a gazdaszervezet számára (FAO/WHO 2002). A *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek a leggyakrabban használt probiotikumok, de az utóbbi időben egyéb törzsek alkalmazása is

elterjedt, mint az *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli*, néhány *Bacillus* törzs és *Saccharomyces cerevisiae*. A különböző probiotikumok, különböző mennyiségben hatékonyak ezért nehéz egy sztenderd optimális dózist megállapítani, amely minden probiotikumra vonatkoztatható. A tudományos irodalom adatait figyelembe véve egy termék jótékony egészségügyi hatása akkor érvényesül, ha 50 milliótól 1 trillió vagy több CFU (colony forming unit)/nap mennyiségű baktériumot tartalmaz (ISAAP).

Probiotikumok kritériumai (Charteris és mts. 1998a) :

- Az emberi béltraktus honos organizmusa legyen
- Túlélje a bél felső szakaszát (az emésztőenzimekre, epesavakra rezisztens legyen)
- A bélhámsejtjeihez tapadjon és képes legyen ott szaporodni
- A szervezetre előnyös hatást gyakoroljon
- Ipari szempontból nagy mennyiségben és olcsón előállítható legyen
- A felhasználás és tárolás alatt életképes és genetikailag stabil maradjon

2.3 Prebiotikumok

A prebiotikumok definíciója az évek során folyamatosan változott.

Gibson és Roberfroid 1995-ben, úgy határozta meg a prebiotikumokat mint „nem-emésztődő táplálék összetevők, melyek előnyösen hatnak a gazdaszervezetre azáltal, hogy szelektíven stimulálják egy vagy több baktérium növekedését és/vagy aktivitását a vastagbélben és így támogatják a gazdaszervezet egészségi állapotát”.

2004-ben Gibson és munkatársai a következőképpen módosították a prebiotikumok fogalmát: „Egy szelektíven fermentálódó összetevő, amely specifikus változások indukál a gasztrointesztinális mikrobióta összetételében és aktivitásában, mellyel jótékony hatásokat fejt ki a gazdaszervezet közérzetére és egészségére.

2008-ban a Prebiotikumok és Probiotikumok Nemzetközi Tudományos Szövetségének találkozóján az a definíció született miszerint „a diétás prebiotikumok szelektíven fermentálódó összetevők, melyek specifikus változásokat eredményeznek a gasztrointesztinális mikrobióta összetételében és/vagy aktivitásában, ezáltal előnyös hatásokat fejtenek ki a gazdaszervezet egészségi állapotára”.

Roberfroid és munkatársai 2010-ben megjelent közleményükben kibővítették a prebiotikumok fogalmát: „A szelektív stimulációja egy vagy több mikroba faj vagy nemzetség növekedésének és /vagy aktivitásának a bél mikrobiótában amelyek támogatják a gazdaszervezet egészségi állapotát”.

A prebiotikumok természetes állapotban, számos élelmiszerben előfordulnak: gazdag forrásai pl. a csicsóka- és a cikóriagyökér, de léteznek a vöröshagymában, a foghagymában és a póréhagymában, az articsókában, zabpehelyben, búzában, banánban, tejben és az érett sajtokban is. Az Európai szinten leggyakrabban alkalmazott és egyben legtöbbet vizsgált prebiotikus szénhidrátok az inulinok, fruktooligoszacharidok, galaktooligoszacharidok (1. Táblázat) és rezisztens keményítők. A fruktán oligomerek és polimerek széles körben tanulmányozott prebiotikus szubsztrátok és számos tanulmány foglalkozik jótékony hatásaikkal. A rezisztens keményítők élelmi keményítők melyek nem emésztődnek meg a vékonybélben, intakt formában érik el a vastagbelet ahol az ott jelenlévő baktériumok által fermentálódnak (Cummings és mts. 1996; Bajka és mts. 2008). A rezisztens keményítők szelektíven stimulálják a hasznos baktériumok szaporodását és aktivitását és fokozzák ezek rövid szénláncú zsírsav termelését, főként a butirátot (Bird és mts. 2010, Moreau és mts. 2003, Silvester és mts. 1995). Az egyes diétás rostok fermentálhatósága a szénhidrát lánc hosszúságától függ. A rövid szénláncú fruktánok gyorsabban fermentálódnak, míg a hosszú szénláncú prebiotikumok és rezisztens keményítők sokkal lassabban degradálódnak. Így a fermentációs mintázatuk és a mikrobióta összetételére kifejtett hatásuk nagyon különböző lehet. A rövid szénláncú zsírsavak a prebiotikumok lebontásának fő végtermékei (Cummings és mts. 2001). Ázsiában főleg Japánban a prebiotikus szénhidrátok sokkal szélesebb körét használják élelmiszeripari célokra ilyenek a manno-, pektin-, izomalto- és szója-oligoszacharidok, illetve a cukoralkoholok mannitol, szorbitol, xilitol, laktitol, melyek számos jótékony egészségügyi hatásuk mellett a legutóbbi irodalmi adatok alapján prebiotikus tulajdonságokkal is bírnak (Hongo et al. 2010).

1. Táblázat Leggyakrabban alkalmazott prebiotikus szénhidrátok szerkezeti jellemzői

Tudományos név és szerkezeti jellemzők	Általános név és átlagos polimerizációs fok
INULIN TÍPUSÚ FRUKTÁNOK	Inulin
Lineáris $\beta(2 \rightarrow 1)$ fruktozil-fruktóz	
Rövid és hosszú szénláncú polimerek (PF 2-60)	Inulin (főleg cikória inulin) (PF _{átlag} 12)
Rövid szénláncú oligomerek (PF 2-8)	Frukto-oligoszacharidok (FOS) (PF _{átlag} 3-6)

	Oligofruktóz (PF _{átlag} 4)
Hosszú szénláncú polimerek (PF 10-60)	Nagy molekulásúlyú inulin (PF _{átlag} 25)
Keverékek (PF 2-8) + (PF 10-60)	Oligomerek és hosszú szénláncú polimerek keverékei
<i>GALAKTÁNOK</i> $\beta(1\rightarrow6)$; $\beta(1\rightarrow3)$; $\beta(1\rightarrow4)$ galaktozil- galaktóz keverékek (PF 2-8)	Galakto-oligoszacharidok, <i>transz</i>-galakto-oligoszacharidok
<i>GALAKTÁNOK ÉS INULIN TÍPUSÚ FRUKTÁNOK KEVERÉKEI GOS-FOS</i>	Galakto-oligoszacharidok és nagy molekulásúlyú inulinok

PF: polimerizációs fok

A prebiotikus hatás fő célterületei (Roberfroid és mts. 2002 és 2007):

- A bél mikrobióta összetételének javítása és/vagy stabilizálása
- Az intesztinális funkciók támogatása
- Az ásványi anyagok adszorpciójának növelése és a csontrendszer egészségének védelme
- A gasztrointesztinális peptidek termelődésének modulációja, energia metabolizmus
- Az immunfunkciók iniciációja (születést követően), immunmoduláció
- Intesztinális barrier funkciók támogatása, a metabolikus endotoxémia redukálása
- Az intesztinális infekciók kockázatának csökkentése
- Az elhízás, a 2-es típusú diabétesz és a metabolikus szindróma kockázatának csökkentése
- A gyulladásos intesztinális megbetegedések kockázatának csökkentése/kezelése
- A vastagbélrák kockázatának csökkentése

2.4 Szinbiotikumok

A prebiotikumot és probiotikumot tartalmazó élelmiszereket szinbiotikus élelmiszereknek nevezzük. A szó jelentése is szinergizmusra utal, e szó használata akkor helyes, ha az adott prebiotikus komponens szelektíven támogatja a vele együtt lévő probiotikumot (Schrezenmeir és De Vrese, 2001). A probiotikus élelmiszer megfelelő koncentrációban élő probiotikus baktériumot tartalmaz és elfogyasztásuk után is igazolható a hatásuk.

2.5 Funkcionális élelmiszerek

A funkcionális élelmiszerek olyan hozzáadott összetevőket tartalmaznak, amelyek támogatják és fokozzák az egészséges állapot fenntartását. Ilyen funkcionális élelmiszerkomponensek lehetnek például a bioaktív növényi kivonatok, antioxidánsok, diétás rostok – prebiotikumok és funkcionális keményítők, probiotikumok, funkcionális lipidek, biaktív peptidek, vitaminok, ásványi anyagok, fitokemikáliák. Világszerte egyre ismertebbek és népszerűbbek a funkcionális élelmiszerek, a Szinapszis Kft. legújabb kutatásából kiderült, hogy hazánkban a lakosság mindössze 23 százaléka van tisztában a funkcionális élelmiszerek fogalmával, és csupán minden tízedik válaszadó tudott konkrét példát mondani az egészség megőrzését támogató funkcionális élelmiszerekre.

A European Commission Concerted Action on Functional Food Science (FUFOSE-Group) definíciója szerint „egy adott élelmiszer akkor tekinthető funkcionálisnak, ha fogyasztása – a megfelelő táplálkozás-élettani hatásokon túlmenően –, a szervezet egy vagy több cél-funkciójára kimutathatóan pozitív hatással van úgy, hogy jobb egészségi állapot vagy kedvezőbb közérzet vagy a betegségek kockázatának csökkentését éri el.

3. CÉLKÍTÜZÉS

Az Eszterházy Károly Főiskola Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszékén évek óta folyó kutatások során vizsgáljuk a hazai piacon elérhető funkcionális élelmiszerfejlesztés során alkalmazott prebiotikumok és egyéb egészségjavító illetve betegség megelőző összetevők élettani hatásait különböző modellkísérletek segítségével.

Jelen munkában három fruktánt és két rezisztens keményítőt illetve ezek kombinációit vizsgáltuk a humán bélmikrobióta összetételére kifejtett hatásukon keresztül négy probiotikus baktérium tiszta tenyészetében illetve két probiotikus és két potenciálisan patogén baktérium alkalmazásával kevert kultúrák modellben. Célunk volt megtalálni a kereskedelmi forgalomban elérhető fruktánok (BENEO-Orafti, Sensus) és rezisztens keményítők (National Starch) leghatékonyabb kombinációit új, innovatív funkcionális élelmiszerek fejlesztéséhez, melyek egy kiegyensúlyozott étrend és egészséges életvitel mellett fogyasztva előnyös fiziológias hatásokat indukálnak és támogatják a betegségek elleni védekezést.

Patkányokkal folytatott etetési kísérletek során (Rodríguez-Cabezas és mts. 2010) bebizonyították, hogy a rezisztens keményítők és fruktánok kombinációi additív hatásúak, *in vivo*. A Tanszéken folyó korábbi kísérleteink során beigazolódott, hogy a fruktán és rezisztens keményítő minták 1:1 arányú keverékei effektívebb prebiotikus hatást fejtenek ki a tiszta anyagoknál.

Funkcionális élelmiszer fejlesztés során, költséghatékonysági szempontokat figyelembe véve, célszerű lenne nagyobb mennyiségű keményítő alkalmazása, mivel a rezisztens keményítők olcsóbbak (2. Táblázat) és magasabb napi mennyiségben alkalmazhatók, mint a fruktánok.

Célunk volt vizsgálni, hogy a két prebiotikum egymást támogató hatása nagyobb arányú keményítő hozzáadásával hogyan érvényesül.

2. Táblázat A fruktánok és rezisztens keményítők 2012. november havi aktuális árai euróban kifejezve

1 kg Hi-maize 260	1 kg Novelose 330	1 kg BENEO Orafti-Sy.-1	1 kg Frutafit CLR
3,45 €	3,10 €	8,40 €	8,55 €

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Szubsztrátok

A szubsztrátként felhasznált prebiotikus szénhidrátok jellemzőit és rövidítéseit a 3. Táblázat tartalmazza.

Három fruktán mintát vizsgáltunk: egy BENE0-Orafti (Tienen, Belgium) terméket, Orafti®Synergy 1, egy Sensus terméket a Frutafit®CLR-t mindkettő oligofruktóz és inulin keveréke illetve egy kémiai tisztaságú fruktooligoszacharidot amelyet a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztünk be. Két rezisztens keményítőt alkalmaztunk: Hi-maize 260, amely egy magas amilóz tartalmú kukoricából kivont keményítő és a Novelose 330, amely egy retrogrált keményítő, természetes formában olyan élelmiszerekben található meg meg mint a megfőzött és kihűtött burgonya. A rezisztens keményítőket a National Starch and Chemical GmbH (Germany, Hamburg) állítja elő.

3. Táblázat Vizsgált szubsztrátok jellemzői és rövidítési - Fruktánok (PF: Polimerizációs fok)

Gyártó	Kereskedelmi megnevezés	Rövidítés	Kémiai összetétel	Származás	Technológiai tulajdonságok
BENE0-Orafti	Orafti®Synergy 1	O-Sy1	Oligofruktóz: 92%, Glükóz/Fruktóz/Szacharóz: ~8%, PF: N/A	cikória gyökér	inulin és oligofruktóz szabadalmaztatott keveréke
Sensus	Frutafit®CLR	Fr-CLR	Inulin/fruktooligoszacharid: ≥85%, Glükóz/Fruktóz/Szacharóz: ≤15%, PF: 7-9	cikória gyökér	cikória inulinon alapul, nagy mennyiségű fruktooligoszacharid hozzáadásával
Sigma-Aldrich	Fruktooligoszacharid	FOS	N/A	cikória gyökér	N/A
National Starch Food Innovation	Hi-Maize 260	Hi-M	Rezisztens keményítő, RS-2 típus, 60% diétás rost	magas amilóz tartalmú kukorica	természetes keményítő
National Starch Food Innovation	Novelose 330	Nov-330	Rezisztens keményítő, RS-3 típus, 30% diétás rost	magas amilóz tartalmú kukorica	nem granuláris, retrogradált keményítő

A szubsztárokat a tiszta anyagok vizsgálatánál 1% mennyiségben adagoltuk a tápleveshez, a fruktán és rezisztens keményítők kombinációinál 3:7 arányt alkalmaztunk. Kontrollként szénhidrát mentes táplevest alkalmaztunk.

Vizsgált tiszta anyagok és kombinációk alkalmazott mennyiségei 10 ml táplevesben:

Fruktánok:

1. Fruktooligoszacharid - 0,1g
2. Frutafit CLR– 0,1g
3. BENEEO-Orafti Synergy 1– 0,1g

Rezisztens keményítők:

4. Hi-Maize 260 – 0,1g
5. Novelose 330 – 0,1g

Fruktán és rezisztens keményítők kombinációi:

6. Fruktooligoszacharid + Hi-Maize : 0,03g+0,07g
7. Fruktooligoszacharid + Novelose-330 : 0,03g+0,07g
8. Frutafit-CLR + Hi-Maize : 0,03g+0,07g
9. Frutafit-CLR + Novelose-330 : 0,03g+0,07g
10. BENEEO-Orafti Synergy 1 + Hi-Maize : 0,03g+0,07g
11. BENEEO-Orafti Synergy 1 + Novelose-330 : 0,03g+0,07g

Kontrol:

12. Szénhidrátmentes

4.2 Baktérium törzsek

A probiotikus baktériumok tiszta tenyészetben való vizsgálatához négy törzset választottunk ki a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 és a *Lactobacillus casei* DSM 20011 törzseket, amelyeket a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures törzsgyűjteményéből szereztünk be, a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 törzset amely a Chr. Hansen törzsgyűjteményéből származik és a *Lactobacillus reuteri* törzset amelyet egy probiotikus készítményből a Reuflor-ból izoláltunk.

Kevert tenyészetben való vizsgálathoz kiválasztottuk a tesztelt szubsztrátokat tiszta tenyészetben legeredményesebben hasznosító két probiotikus törzset a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 és a *Lactobacillus casei* DSM 20011 törzseket. Illetve két potenciálisan patogén törzset használtunk *Bacteroides fragilis* EKF 201 és *Clostridium perfringens* EKF 200, amelyek az Eszetházy Károly Főiskola, Egerfood Regionális Tudásközpont Törzsgyűjteményéből származnak.

4.3 Tenyésztés körülményei

A probiotikus baktériumok tiszta és a probiotikus és potenciálisan patogén baktériumok kevert tenyészeit Anaerob alap táptalajban tenyésztettük (10 ml), melynek összetétele g/l-ben, pepton, 2; élesztő kivonat, 2; NaCl, 0,1; K₂HPO₄, 0,04; KH₂PO₄, 0,04; CaCl₂•6H₂O, 0,01; MgSO₄•7H₂O, 0,01; NaHCO₃, 2; Tween 80, 2 ml; hemin, 0,005; K1 vitamin, 10 µl; cystein-HCl, 0,5; különböző szénhidrát források (1% w/v) anaerob körülmények között (Fooks és mts. 2002, Wang és mts. 1999). Az Anaerob alap táplevesből 10 ml mintákat steril műanyag csövekbe mértünk. Fruktán és rezisztens keményítő mintákat 1% mennyiségben (0,1g) adagoltuk a tápleveshez, a szénhidrátok kombinációjánál 3:7 arányt alkalmaztunk, vagyis 0,03g fruktán:0,07g rezisztens keményítő. Kontrollként szénhidrát mentes tápoldatot alkalmaztunk. A tenyésztő folyadék kezdeti pH-ját 6,8-ra állítottuk be és nem kontrolláltuk az inkubáció során. A *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* törzsek tiszta tenyszeit illetve a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088, *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Clostridium perfringens* EKF 200 és a *Bacteroides fragilis* EKF 201 kevert tenyszeit anaerob körülmények között növekedtek (10:10:80, H₂:CO₂:N₂). A tápoldatokat tartalmazó csöveket 30 perccel a beoltás előtt 37 °C-os termosztátba helyeztük. Az alkalmazott törzseket a kísérlet előtt véres agar lemezekben tartottuk fenn, majd fiziológiás sóoldatban baktérium szuszpenziókat készítettünk melynek turiditását 1 McFarland sztenderdre állítottuk be. Ezt követően a baktérium szuszpenziókkal inokuláltuk a különböző szénhidrát forrásokat tartalmazó csöveket, azonos induló csíraszámmal a probiotikus baktériumok tiszta és a probiotikus és potneciálisan patogén baktériumok kevert tenyszeiténél egyaránt. A csöveket parafilmmel zártuk le és anaerob körülmények között 37 °C-on 48 órán keresztül inkubáltuk. Mintákat vettünk 0, 8, 24 és 48 óra elteltével mikrobiológiai csíraszám meghatározás céljából. 30 µl mintákat vettünk az egyes csövekből, melyekből 270 µl hígító folyadékban tízes alapú hígítási sort készítettünk mikrop lét lemezekben. Az egyes hígításokból meghatároztuk a csíraszámokat szelektív agar lemezekben való tenyésztés során, a *Lactobacillus*-okat MRS agaron (de Man, Rogosa and Sharpe agar), *Bifidobacterium*-okat BSM agaron Bifidus Selective Medium Agar), *Clostridium*-ot TSC agaron (Tryptose Sulphite Cycloserine Agar), *Bacteroides*-t BEA agaron (Bile Esculin Agar). Az agar lemezeket 48 órán keresztül anaerob körülmények között inkubáltuk, majd megállapítottuk a csíraszám értékeket. A tenyszetek pH változásait szintén nyomon követtük 24 és 48 órás fermentációt követően.

4.4 Prebiotikus index (PI)

A fruktánok, rezisztens keményítők és kombinációik prebiotikus hatásának kvantitatív meghatározását a Prebiotikus index egyenletével számoltuk ki (Palframan et al. 2003).

A Prebiotikus index egy széles körben alkalmazott kvantitatív eszköz a különböző szénhidrátok prebiotikus hatásának meghatározására. A módszer feltételezi, hogy a növekedés a *Bifidobacterium* és/vagy *Lactobacillus* populációkban pozitív hatás, míg a növekedés a *Bacteroides* és *Clostridium* populációkban negatív hatás.

A prebiotikus index egyenlete:

$$PI = (Bif/Total) - (Bac/Total) + (Lac/Total) - (Clos/Total)$$

ahol Bif a *Bifidobacterium* csíraszám a mintavétel / az inokuláció időpontjában, Bac a *Bacteroides* csíraszám a mintavétel / az inokuláció időpontjában, Lac a *Lactobacillus* csíraszám a mintavétel / az inokuláció időpontjában, Clos a *Clostridium* csíraszám a mintavétel / az inokuláció időpontjában. A baktériumok csíraszám értékei log₁₀ értékekben lettek bevezetve a PI egyenletbe.

4.5 Növekedési ráta

Az egyes baktérium törzsek növekedési rátáit a következő egyenlet segítségével számoltuk ki (Olano-Martin et al. 2002):

$$\mu = (\log_{10} X_{t2} - \log_{10} X_{t1})$$

ahol, X_{t2} a csíraszám a mintavétel időpontjában, X_{t1} csíraszám az inokuláció időpontjában.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 pH értékek

5.1.1 pH értékek a probiotikus baktériumok tiszta tenyészeiből

A pH értékeket a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 (2. Ábra), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (3. Ábra)(4. Táblázat), *Lactobacillus casei* DSM 20011 (4- Ábra) és *Lactobacillus reuteri* (5. Ábra) (5. Táblázat) tiszta tenyészeiből 24 és 48 órás fermentációt követően határoztuk meg

4. Táblázat *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 tiszta tenyészetek pH értékei különböző szubsztrátok jelenlétében 0, 24 és 48 órás fermentációt követően

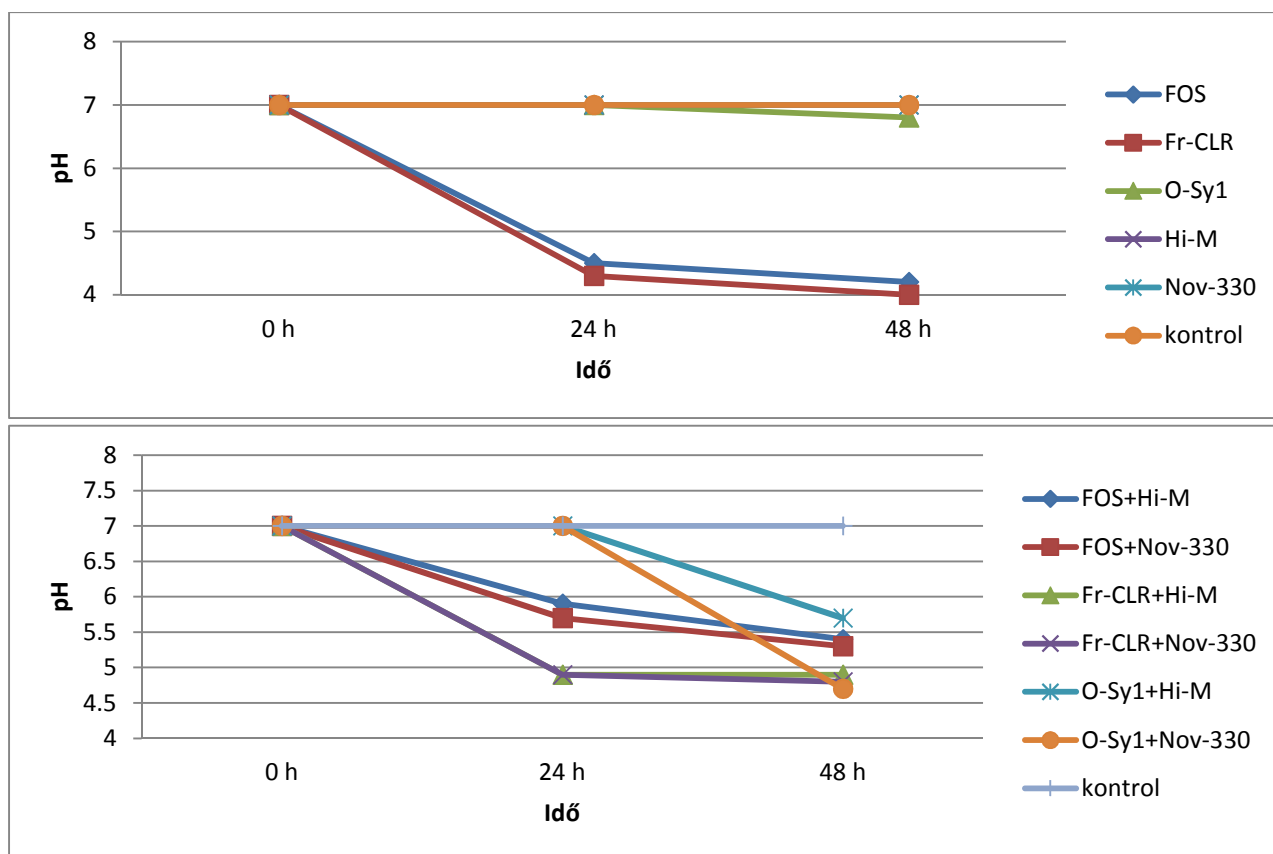
szubsztrát	pH					
	<i>Bifidobacterium DSM 20088</i>			<i>Bifidobacterium BB12</i>		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Fruktooligoszacharid	7,0	4,5	4,2	7,0	6,8	6,6
Frutafit-CLR	7,0	4,3	4,0	7,0	6,7	6,3
Orafti Synergy 1	7,0	7,0	6,8	7,0	7,0	7,0
Hi-Maize 260	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Novelose-330	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	5,3
Fruktooligoszacharid+Hi-Maize 260	7,0	5,9	5,4	7,0	7,0	7,0
Fruktooligoszacharid+Novelose-330	7,0	5,7	5,3	7,0	7,0	7,0
Frutafit-CLR+Hi-Maize 260	7,0	4,9	4,9	7,0	7,0	7,0
Frutafit-CLR+Novelose-330	7,0	4,9	4,8	7,0	6,9	7,0
Orafti Synergy 1+Hi-Maize 260	7,0	7,0	5,7	7,0	6,9	6,7
Orafti Synergy 1+Novelose-330	7,0	7,0	4,7	7,0	6,9	7,0
kontroll	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

5. Táblázat *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus reuteri* tiszta tenyészetek pH értékei különböző szubsztrátok jelenlétében 0, 24 és 48 órás fermentációt követően

szubsztrát	pH					
	<i>Lactobacillus DSM 20011</i>			<i>Lactobacillus reuteri</i>		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Fruktooligoszacharid	7,0	5,7	5,5	7,0	7,3	7,1
Frutafit-CLR	7,0	7,3	7,2	7,0	7,4	7,1

Orafti Synergy 1	7,0	7,3	7,1	7,0	7,2	7,0
Hi-Maize 260	7,0	8,0	7,6	7,0	7,8	7,6
Novelose-330	7,0	5,2	4,9	7,0	7,5	7,4
Fruktooligoszacharid+Hi-Maize 260	7,0	7,9	7,5	7,0	7,5	7,3
Fruktooligoszacharid+Novelose-330	7,0	7,5	7,3	7,0	7,5	7,0
Frutafit-CLR+Hi-Maize 260	7,0	7,7	7,5	7,0	7,5	5,6
Frutafit-CLR+Novelose-330	7,0	7,4	7,3	7,0	7,4	7,4
Orafti Synergy 1+Hi-Maize 260	7,0	7,6	7,3	7,0	7,6	7,1
Orafti Synergy 1+Novelose-330	7,0	5,6	5,0	7,0	7,5	7,0
kontroll	7,0	7,5	7,4	7,0	7,5	7,4

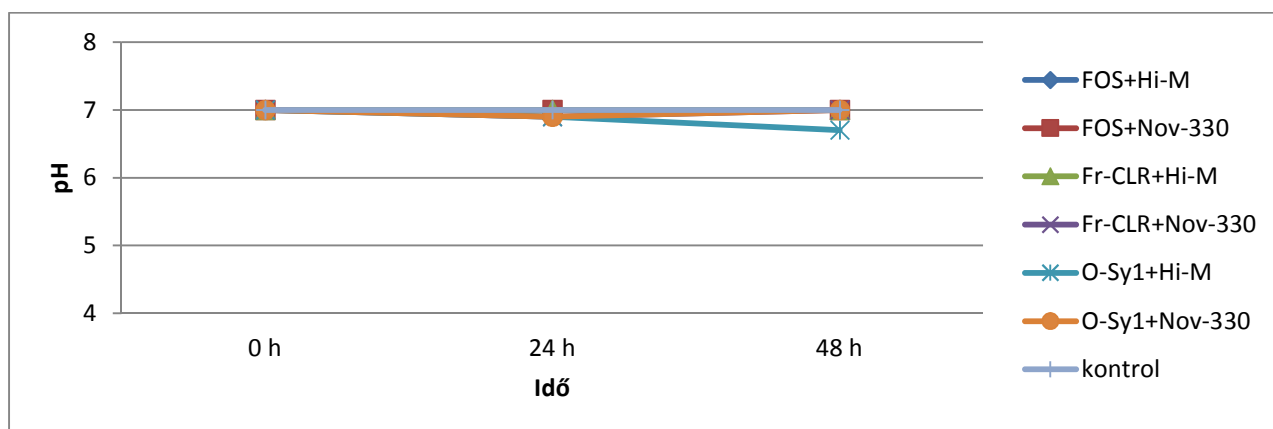
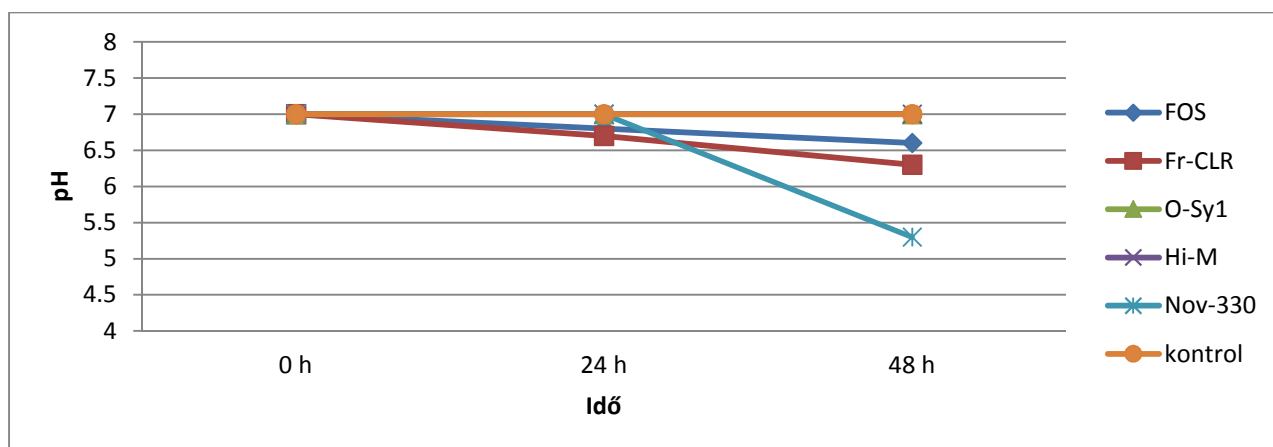
2. **Ábra** pH értékek a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 tiszta tenyészeiből különböző szubsztrátokon 24 és 48 óra elteltével.



A tiszta anyagokat tartalmazó tenyészetek pH-ja két fruktán mintán a Frutafit-CLR és a Fruktooligoszacharid esetében csökkent. A rezisztens keményítők és az Orafti Synergy 1 szubsztrátokon nem csökkent. A keverékeknél mindenhol számottevő mértékben csökken a pH. Legnagyobb mértékben a két Frutafit-CLR tartalmú mixben, majd a két Fruktooligoszacharid

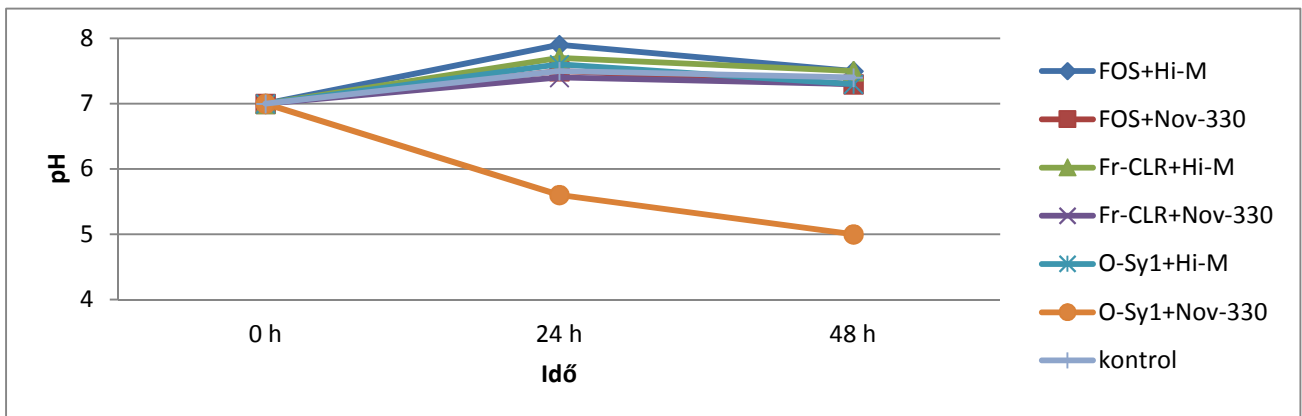
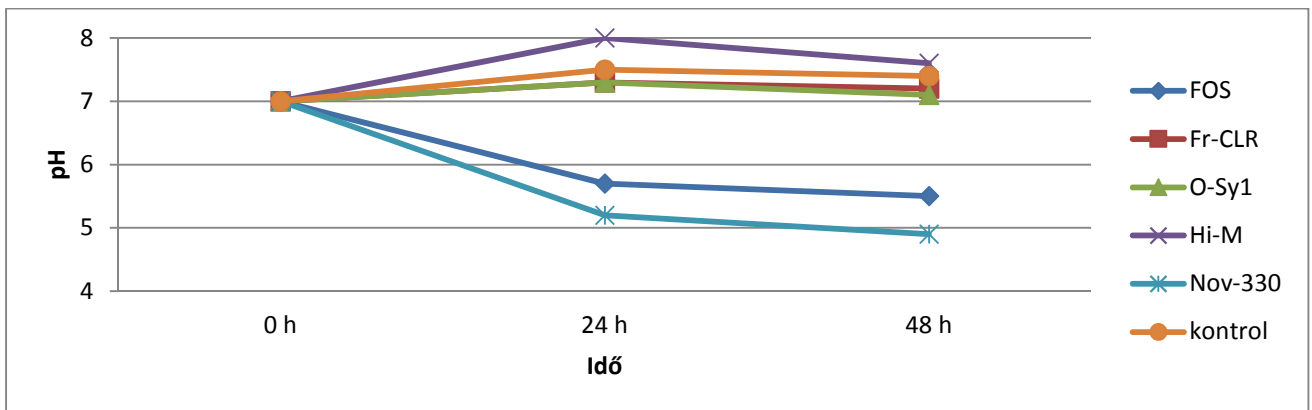
tartalmú keverékben. Az Orafiti Synergy 1 szubsztrát tartalmú kombinációkban 24 órás fermentációt követően nem tapasztaltunk változást, azonban 48 órára itt is lecsökkent a pH.

3. Ábra pH értékek a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 tiszta tenyészeiből különböző szubsztrátokon 24 és 48 óra elteltével.



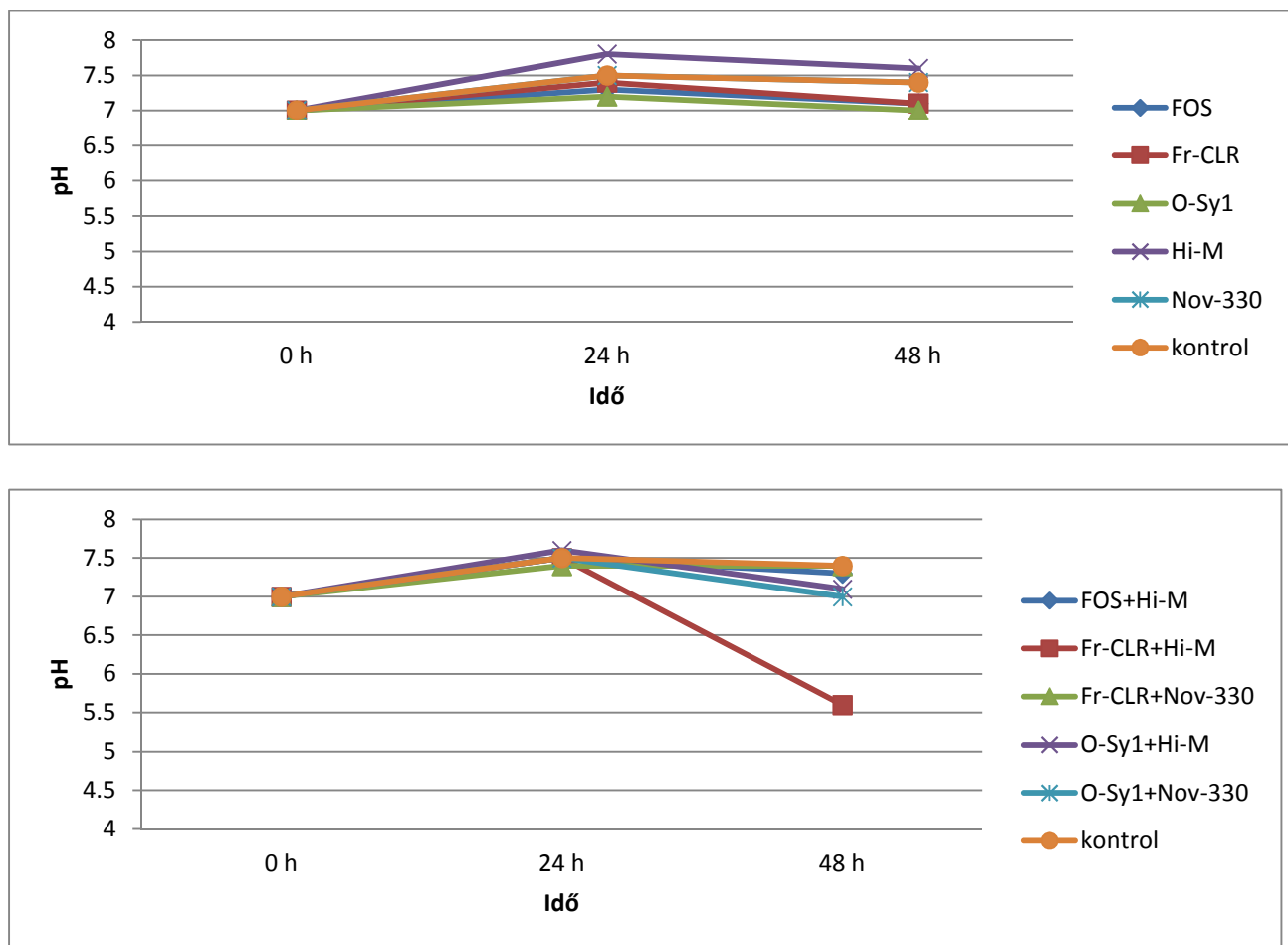
A BB12 baktériumnál nem volt olyan nagymértékű pH csökkenés, mint a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 esetében. A tiszta anyagok hatékonyabban csökkentették a pH-t mint a mixek.

4. Ábra pH értékek a *Lactobacillus casei* DSM 20011 tiszta tenyészetéből különböző szubsztrátokon 24 és 48 óra elteltével.



A *Lactobacillus casei* DSM 20011 baktériumnál a Novelose-330, Fruktooligoszacharid illetve az Orafiti Synergy 1 és a Novelose-330 keveréke csökkentette nagy mértékben a pH-t.

5. Ábra pH értékek a *Lactobacillus reuteri* tiszta tenyészeiből különböző szubsztrátokon 24 és 48 óra elteltével.



A *Lactobacillus reuteri* baktériumnál egy esetben volt számottevő csökkenés tapasztalható a 48 órás fermentációt követően a Frutafit-CLR és a Hi-Maize 260 keverékében.

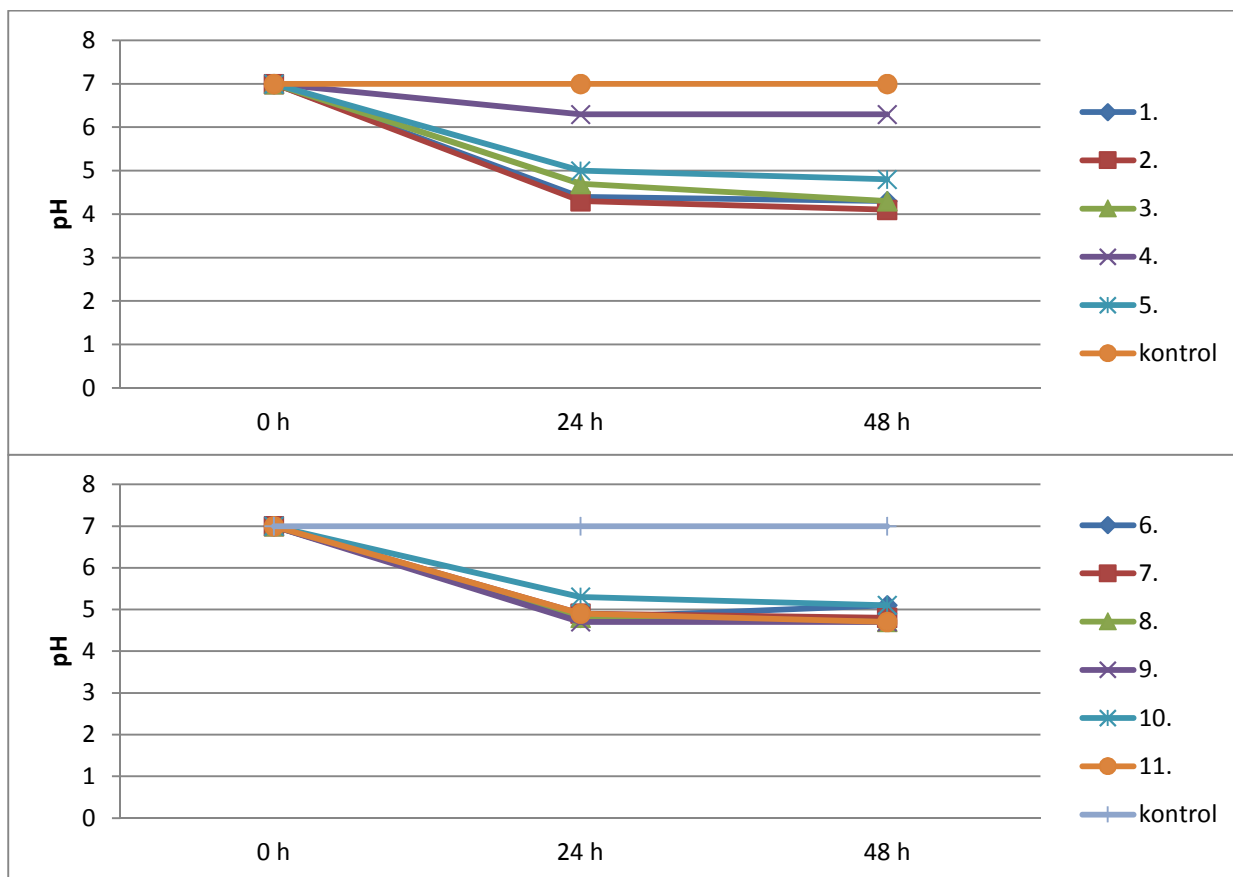
5.1.2 pH értékek a probiotikus és potenciálisan patogén baktériumok kevert tenyészeiből

A pH értékeket a kevert tenyészetes fermentációk során 24 és 48 óra elteltével mértük meg. A kapott eredmények a 6. Táblázatban és 6. Ábrán láthatóak.

6. Táblázat Kevert tenyészetek pH értékei különböző szubsztrátok jelenlétében 0, 24 és 48 órás fermentációt követően

pH			
szubsztrát	<i>Bifidobacterium DSM 20088</i>		
	0 h	24 h	48 h
Fruktooligoszacharid	7,0	4,4	4,3
Frutafit-CLR	7,0	4,3	4,1
Orafti Synergy 1	7,0	4,7	4,3
Hi-Maize 260	7,0	6,3	6,3
Novelose-330	7,0	5,0	4,8
Fruktooligoszacharid+Hi-Maize 260	7,0	4,8	5,1
Fruktooligoszacharid+Novelose-330	7,0	4,9	4,8
Frutafit-CLR+Hi-Maize 260	7,0	4,8	4,7
Frutafit-CLR+Novelose-330	7,0	4,7	4,7
Orafti Synergy 1+Hi-Maize 260	7,0	5,3	5,1
Orafti Synergy 1+Novelose-330	7,0	4,9	4,7
kontroll	7,0	7,0	7,0

6. Ábra pH értékek a kevert tenyészetekből különböző szubsztrátokon 24 és 48 óra elteltével.



A csak rezisztens keményítőt tartalmazó tenyészték pH-ja csökkent a legkisebb mértékben, a Hi-maize maradt a legmagasabb értéken. Az inulin és rezisztens keményítő keverékek pH-ja szinte egyforma mértékben csökkent, kivéve az Orafit Synergy 1 és Hi-maize 260 tartalmú mintát ahol kevésbé volt tapasztalható a pH csökkenés.

5.2 Csíraszám változások és Növekedési ráta értékek

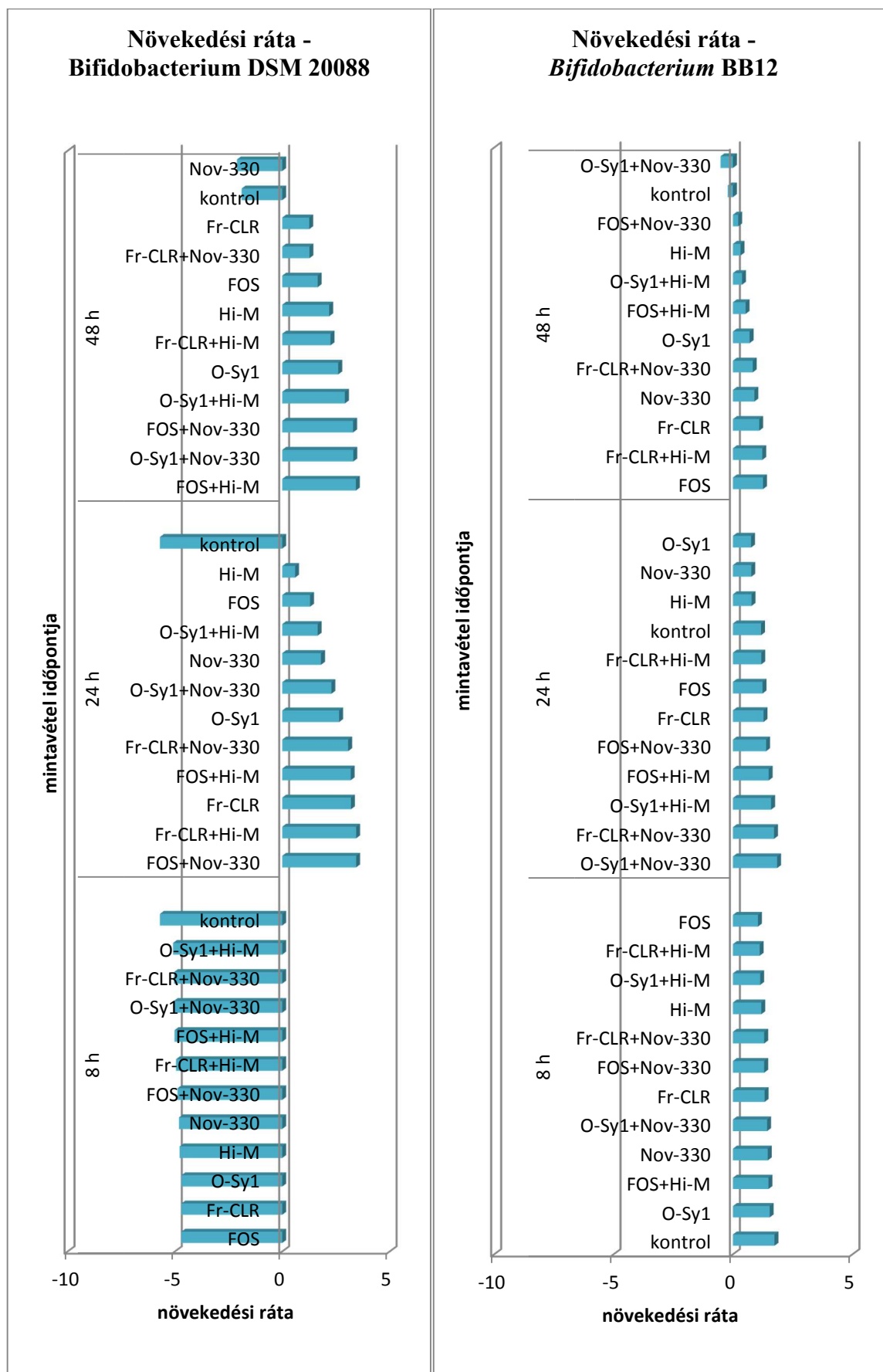
5.2.1 Csíraszám változások és Növekedési ráta értékek a probiotikus baktériumok tiszta tenyészeiből

A probiotikus baktériumok tiszta tenyszeiből a csíraszám változásokat 7. és 8. Táblázatban a Növekedési ráta értékeket a 7. és 8. Ábrán tüntettük fel.

- 6 **Táblázat** *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 és *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 csíraszám értékei a tiszta tenyészetekből (lg CFU/ml) különböző szubsztrátok jelenlétben, beoltás után (0h), 8, 24 és 48 órás fermentációt követően.

Baktérium szám (lg CFU/ml)								
szubsztrát	<i>Bifidobacterium DSM 20088</i>				<i>Bifidobacterium BB12</i>			
	0 h	8 h	24 h	48 h	0 h	8 h	24 h	48 h
Fruktooligoszacharid	4,70	0	6,00	6,35	6,09	7,14	7,33	7,35
Frutafit-CLR	4,70	0	7,90	5,95	6,11	7,44	7,39	7,22
Orafti Synergy 1	4,70	0	7,35	7,31	5,85	7,38	6,60	5,15
Hi-Maize 260	4,78	0	4,18	6,97	5,97	7,16	6,75	6,29
Novelose-330	4,81	0	3,00	2,70	5,93	7,39	6,70	6,83
Fruktooligoszacharid+Hi-Maize 260	5,02	0	8,21	8,45	5,83	7,32	7,33	6,36
Fruktooligoszacharid+Novelose-330	4,88	0	8,31	8,18	6,01	7,32	7,40	6,23
Frutafit-CLR+Hi-Maize 260	4,95	0	8,40	7,20	6,05	7,18	7,24	7,28
Frutafit-CLR+Novelose-330	5,04	0	8,11	6,31	6,04	7,35	7,76	6,87
Orafti Synergy 1+Hi-Maize 260	5,19	0	6,85	8,11	5,93	7,07	7,53	6,31
Orafti Synergy 1+Novelose-330	5,06	0	7,35	8,37	5,85	7,27	7,69	5,33
kontroll	5,70	0	0	3,81	5,74	7,48	6,92	5,53

7. **Ábra** *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 és *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 növekedési ráta értékei a tiszta tenyészetekből különböző szubsztrátok jelenlétében 8, 24 és 48 órás fermentációt követően



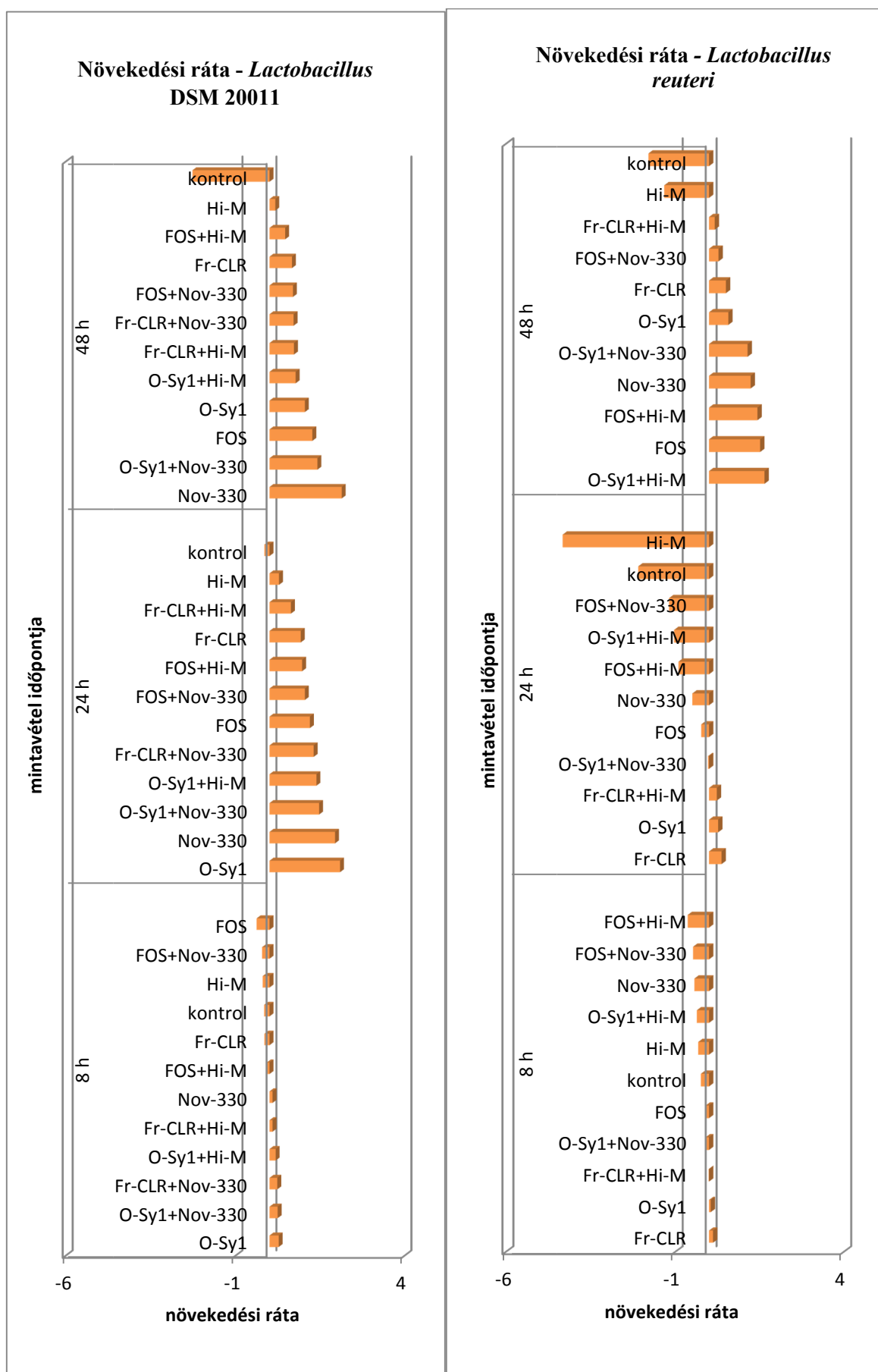
***Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088.** A 8 órás mintavétel csíraszámait alapján nem volt növekedés tapasztalható ennél a baktériumnál, minden növekedési ráta érték a negatív tartományban van. A 24 órás fermentációt követően, a fruktánok és rezisztens keményítők keverékeinek eredményei egyértelműen jobbak. Legmagasabb csíraszám értékek a Fruktooligoszacharid + Novelose-330 és a Frutafit-CLR + Hi-Maize mintákban voltak. A 48 órás mintavétel során a legmagasabb csíraszámokat szintén a keverék mintákban mértük (Fruktooligoszacharid + Hi-Maize, Orafit Synergy 1+ Novelose-330, Fruktooligoszacharid + Novelose-330, Orafit Synergy 1 + Hi-Maize), a legalacsonyabbakat a tiszta anyagokban (Novelose-330, Frutafit-CLR).

***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12.** A 8 órás mintavétel során minden szubsztráton növekedés volt tapasztalható, az eredmények között nem volt számottevő különbség. 24 órára kombinációkon (Orafit-Synergy 1 + Novelose-330, Frutafit-CLR + Novelose-330, Orafit-Synergy 1 + Hi-Maize), érte el a legnagyobb csíraszámokat a BB12, alacsonyabbak voltak a növekedési ráta érték a tiszta anyagokon. 48 óra elteltével nem hoztak egyértelműen magasabb csíraszámokat a kombinációk, legmagasabb csíraszámok a Fruktooligoszacharid, Frutafit-CLR + Hi-Maize és a Frutafit-CLR mintákban voltak mérhetőek.

8. Táblázat *Lactobacillus casei* DSM 20011 és *Lactobacillus reuteri* csíraszám értékei a tiszta tenyészetekből (lg CFU/ml) különböző szubsztrátok jelenlétben, beoltás után (0h), 8, 24 és 48 órás fermentációt követően.

Baktérium szám (lg CFU/ml)								
	<i>Lactobacillus DSM 20011</i>				<i>Lactobacillus reuteri</i>			
	0 h	8 h	24 h	48 h	0 h	8 h	24 h	48 h
Fruktooligoszacharid	5,61	5,23	6,80	6,86	4,44	4,35	4,21	5,95
Frutafit-CLR	5,71	5,56	6,63	6,37	4,47	4,59	4,84	4,97
Orafti Synergy 1	5,41	5,69	7,50	6,46	4,65	4,70	4,92	5,22
Hi-Maize 260	5,41	5,21	5,69	5,58	4,32	4,00	0	3,00
Novelose-330	5,51	5,59	7,44	7,64	4,57	4,14	4,08	5,80
Fruktooligoszacharid+Hi-Maize 260	5,47	5,39	6,42	5,93	4,58	3,95	3,68	6,01
Fruktooligoszacharid+Novelose-330	5,55	5,33	6,59	6,24	4,56	3,87	3,98	6,34
Frutafit-CLR+Hi-Maize 260	5,41	5,50	6,03	6,13	4,48	4,01	3,30	4,76
Frutafit-CLR+Novelose-330	5,30	5,53	6,61	6,01	4,44	4,42	4,67	4,60
Orafti Synergy 1+Hi-Maize 260	5,57	5,76	6,95	6,34	4,66	4,30	3,63	6,30
Orafti Synergy 1+Novelose-330	5,44	5,68	6,90	6,84	4,56	4,45	4,52	5,70
kontroll	5,45	5,29	5,30	3,18	4,79	4,55	2,70	3,00

7 **Ábra** *Lactobacillus casei* DSM 20011 és *Lactobacillus reuteri* növekedési ráta értékei a tiszta tenyészetekből különböző szubsztrátok jelenlétben 8, 24 és 48 órás fermentációt követően



***Lactobacillus casei* DSM 20011.** 8 órás fermentációt követően nem volt számottevő növekedés, legmagasabb csíraszámok az Orafit Synergy 1, Orafit Synergy 1 + Novelose-330, Frutafit-CLR + Novelose-330 mintákban voltak mérhetőek. A 48 órás mintavétel során a legnagyobb mértékű növekedést az Orafit Synergy 1, Novelose-330, Orafit Synergy 1 + Novelose 330 és az Orafit Synergy 1 + Hi-Maize mintákban tapasztaltuk. 48 óra elteltével szintén a Novelose-330 és az Orafit Synergy 1 + Novelose-330 mintákban voltak a legmagasabb növekedési ráta értékek mérhetőek. A *Lactobacillus casei* tehát egyértelműen az Orafit Synergy 1 fruktán és a Novelose 330 rezisztens keményítőt illetve a két anyag keverékét hasznosította a legjobb mértékben.

***Lactobacillus reuteri* (Reuflor).** A 8 órás mintavétel során két fruktán a Frutafit-CLR és az Orafit Synergy 1 mintában és a Frutafit-CLR + Hi-M keverékében volt növekedés tapasztalható. 24 óra elteltével sem volt számottevő szaporodás, a legnagyobb csíraszámokat szintén az előbb említett három mintában mértük: Frutafit-CLR, Orafit Synergy 1, Frutafit-CLR + Hi-Maize. 48 órás fermentációt követően a négy legmagasabb növekedési rátát produkáló szubsztrát sorrendben az Orafit Synergy 1 + Hi-Maize, Fruktooligoszacharid, Fruktooligoszacharid + Hi-Maize, Novelose-330, Orafit Synergy 1 + Novelose-330 voltak.

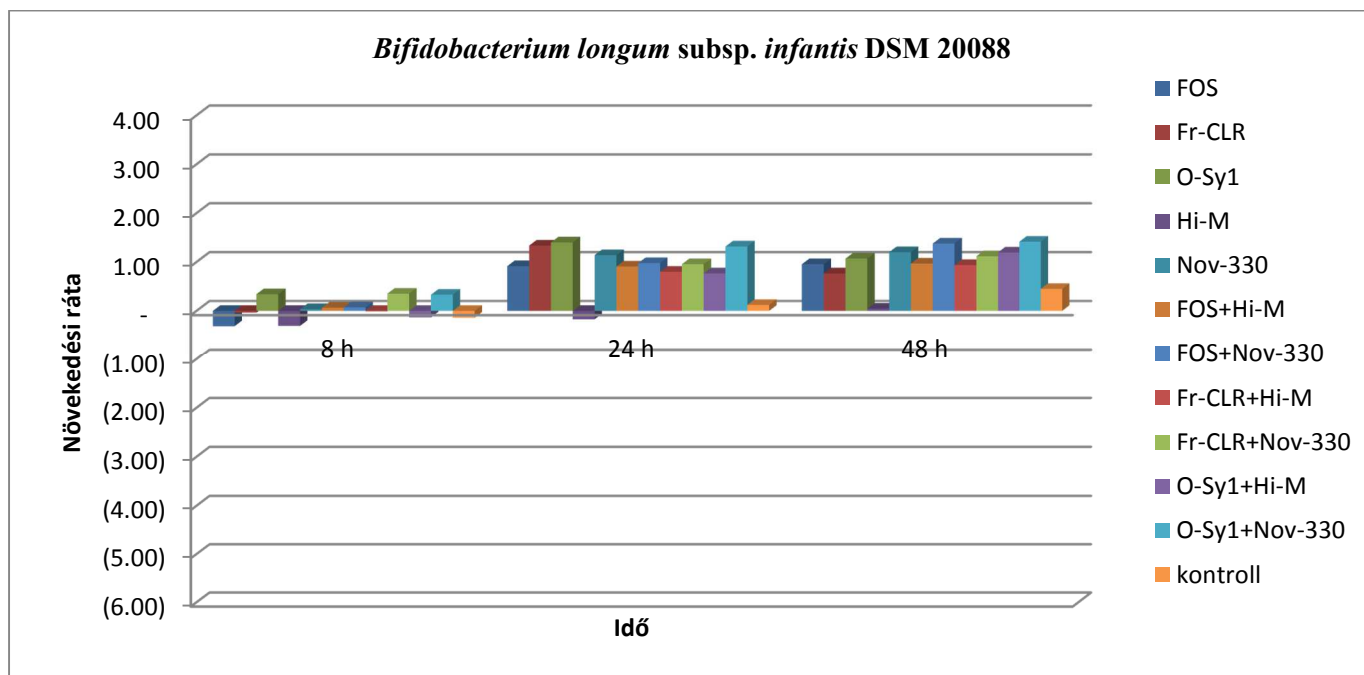
5.2.2 Csíraszám változások és Növekedési ráta értékek a probiotikus és potenciálisan patogén baktériumok kevert tenyészeiből

A csíraszám változásokat a probiotikus és potenciálisan patogén baktériumok kevert tenészeiből a 9. Táblázatban, a Növekedési ráta értékeket a 9., 10., 11 és 12. Ábrán követhetjük nyomon.

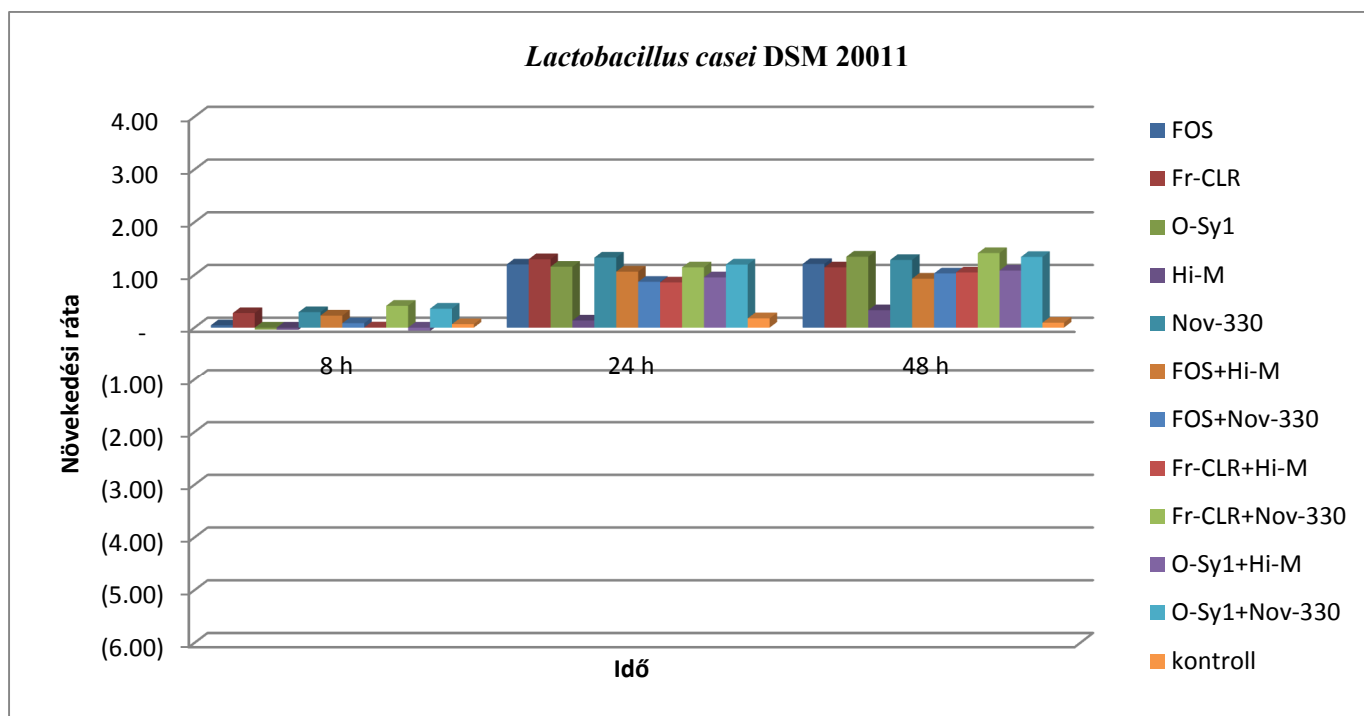
9. Táblázat Probiotikus és patogén baktériumok csíraszám értékei a kevert tenyészetekből (lg CFU/ml) különböző szubsztrátok jelenlétében, beoltás után (0h), 8, 24 és 48 órás fermentációt követően.

Baktérium szám (lg CFU/ml)								
szubsztrát	<i>L. casei</i> DSM 20011				<i>B. longum</i> DSM 20088			
	0 h	8 h	24 h	48 h	0 h	8 h	24 h	48 h
Fruktooligoszacharid	5,85	5,89	7,05	7,05	6,12	5,81	7,04	7,08
Frutafit-CLR	5,73	6,01	7,03	6,88	6,00	5,96	7,33	6,76
Orafti Synergy 1	6,05	6,01	7,20	7,39	5,90	6,24	7,30	6,97
Hi-Maize 260	5,82	5,78	5,95	6,15	6,13	5,82	5,96	6,18
Novelose-330	5,86	6,16	7,19	7,15	5,91	5,95	7,05	7,11
Fruktooligoszacharid+Hi-Maize 260	5,68	5,90	6,74	6,61	5,92	5,99	6,83	6,89
Fruktooligoszacharid+Novelose-330	5,84	5,92	6,71	6,87	5,76	5,83	6,74	7,14
Frutafit-CLR+Hi-Maize 260	5,81	5,82	6,67	6,86	5,88	5,87	6,68	6,81
Frutafit-CLR+Novelose-330	5,76	6,18	6,90	7,18	5,77	6,12	6,73	6,89
Orafti Synergy 1+Hi-Maize 260	5,80	5,64	5,96	5,29	6,76	6,53	6,73	7,18
Orafti Synergy 1+Novelose-330	5,73	6,09	6,93	7,07	5,68	6,01	7,00	7,10
kontroll	5,74	5,80	5,91	5,83	5,74	5,60	5,86	6,19
	<i>Bact. fragilis</i>				<i>C. perfringens</i>			
	0 h	8 h	24 h	48 h	0 h	8 h	24 h	48 h
Fruktooligoszacharid	5,47	5,70	-	-	5,03	6,45	7,19	-
Frutafit-CLR	5,57	6,01	-	-	4,95	6,23	6,68	2,70
Orafti Synergy 1	5,56	6,19	-	-	4,97	6,19	7,04	-
Hi-Maize 260	5,42	5,34	6,16	6,79	4,85	5,02	7,33	7,39
Novelose-330	5,56	6,04	7,20	-	4,80	6,17	7,81	6,66
Fruktooligoszacharid+Hi-Maize 260	5,52	5,48	6,55	-	4,88	4,94	7,70	6,74
Fruktooligoszacharid+Novelose-330	5,53	5,65	6,23	-	4,88	6,26	7,45	6,48
Frutafit-CLR+Hi-Maize 260	5,53	5,41	5,90	-	5,03	5,18	7,30	5,94
Frutafit-CLR+Novelose-330	5,62	6,13	-	-	5,10	6,24	7,81	6,44
Orafti Synergy 1+Hi-Maize 260	5,74	5,30	5,83	5,24	6,89	3,95	7,16	6,86
Orafti Synergy 1+Novelose-330	5,22	5,90	6,57	-	5,05	5,95	7,85	6,70
kontroll	5,44	4,65	4,44	6,29	4,74	5,21	7,53	7,02

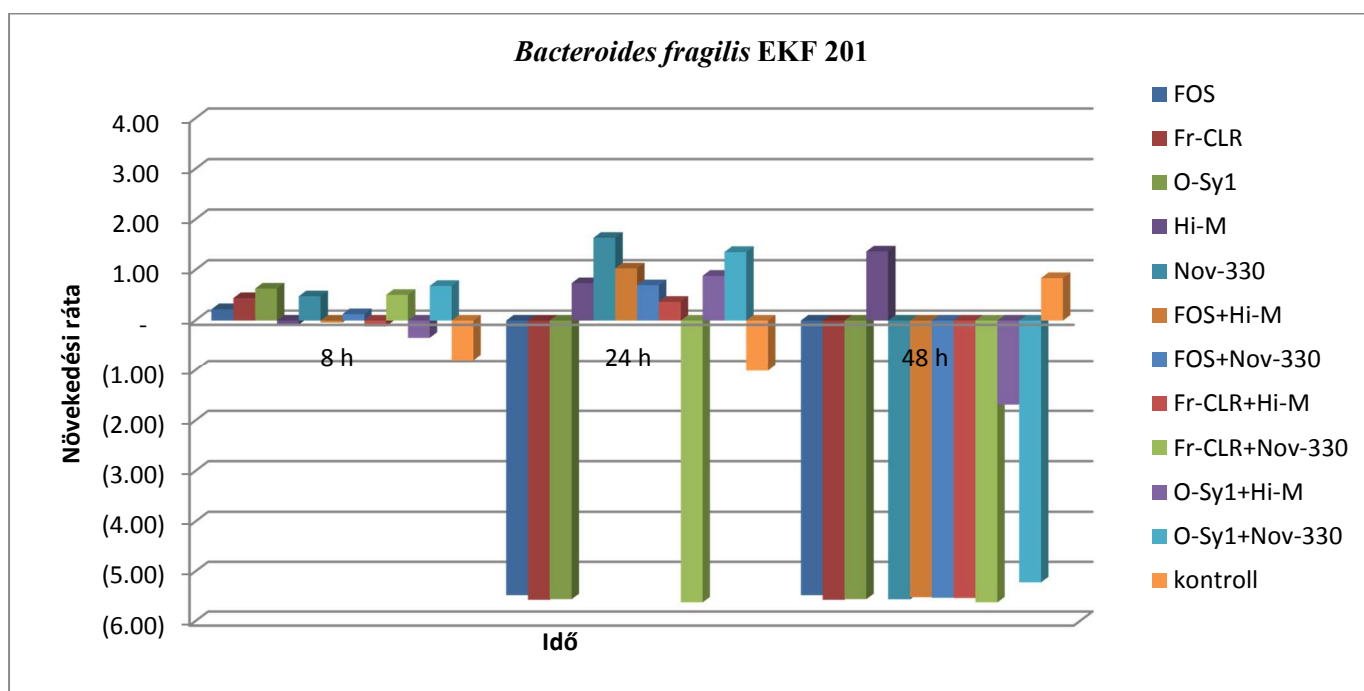
- 8 **Ábra** *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 Növekedési rátái a kevert tenyészetekből különböző szubsztrátok jelenlétben 8, 24 és 48 órás fermentációt követően



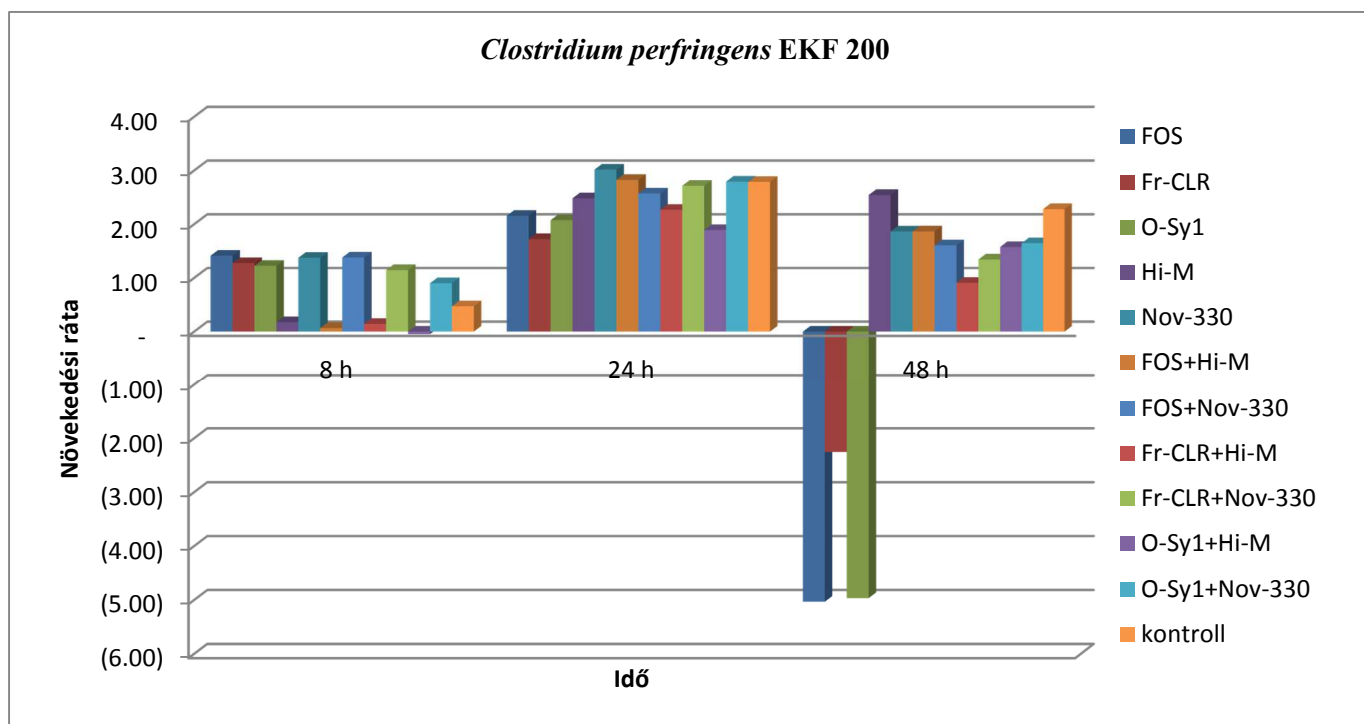
- 9 **Ábra** *Lactobacillus casei* DSM 20011 Növekedési rátái a kevert tenyészetekből különböző szubsztrátok jelenlétben 8, 24 és 48 órás fermentációt követően



10 **Ábra** *Bacteroides fragilis* EKF 201 Növekedési rátái a kevert tenyészetekből különböző szubsztrátok jelenlétben 8, 24 és 48 órás fermentációt követően



11 **Ábra** *Clostridium perfringens* EKF 200 Növekedési rátái a kevert tenyészetekből különböző szubsztrátok jelenlétben 8, 24 és 48 órás fermentációt követően



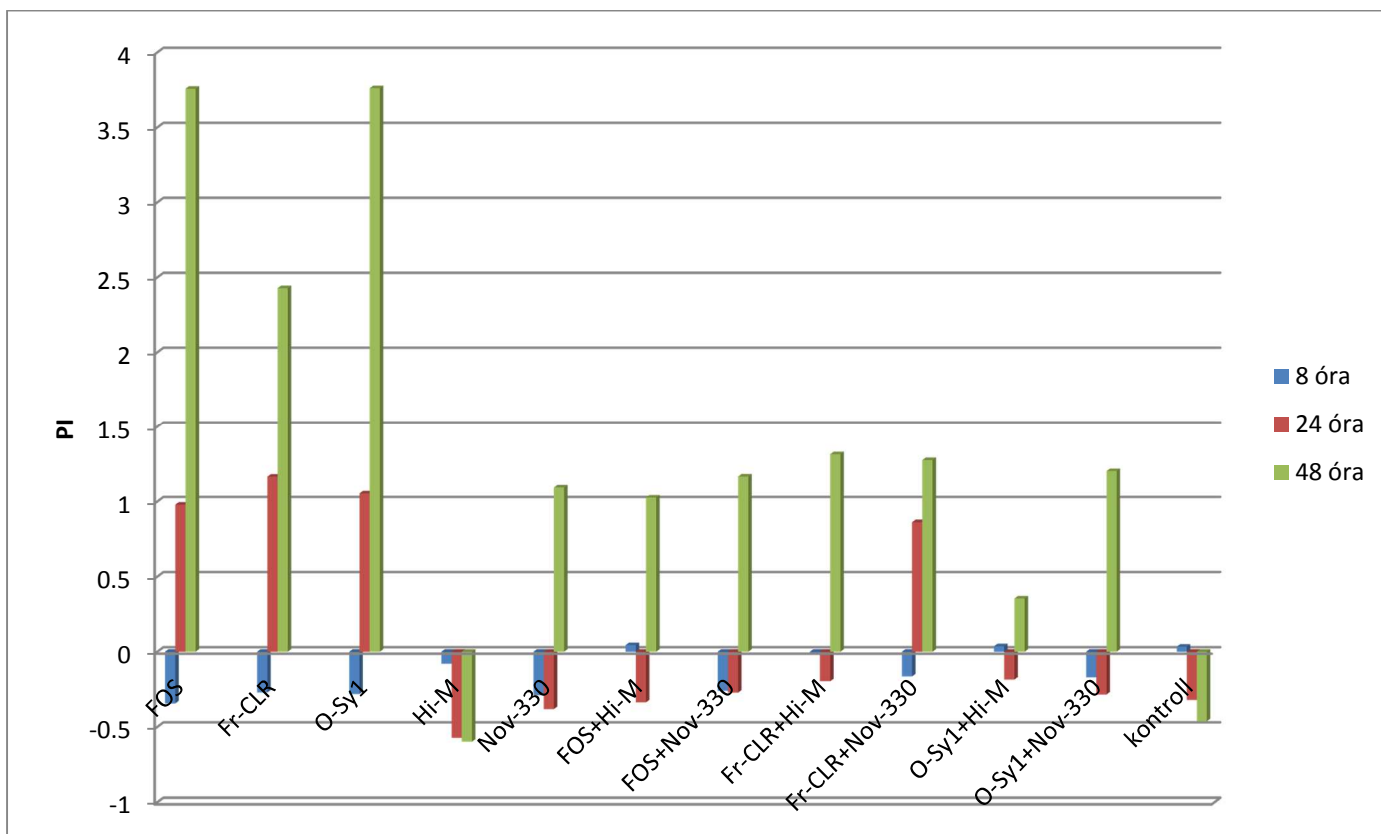
Tiszta anyagok. A *Bacteroides fragilis* csíraszama 24 és 48 óra elteltével mindhárom fruktán mintán lecsökkent, annyira, hogy nem is volt kimutatható a baktérium jelenléte. A rezisztens keményítő minták közül folyamatos növekedést mutatott a Hi-maize-en, a Novelose-on azonban szintén nagymértékben lecsökkent a csíraszama a 48 órás mintavételre. A *Clostridium perfringens* a 8 és 24 órás mintavételi időpontokban folyamatosan növekvő mennyiségben volt jelen minden szubsztrát esetében. A 48 órás mintavételre az fruktán mintákon csíraszama szignifikánsan csökken, a Novelose rezisztens keményítőn szintén csökken, a Hi-maize keményítő mintán azonban folyamatos növekedés volt megfigyelhető. A *Bifidobacterium longum* magas csíraszámában volt jelen a fruktán mintákban és a Novelose rezisztens keményítőn a fermentáció során folyamatosan. A *Lactobacillus casei* alacsony növekedést mutatott a Hi-maize rezisztens keményítő jelenlétében, a többi mintán azonban magas számban mutattuk ki.

Fruktán és rezisztens keményítő minták kombinációi. A *Bacteroides fragilis* 48 órára egyik inulin és rezisztens keményítő kombinációt tartalmazó csőben sem volt jelen. 24 órára mindenhol növekedett a baktérium csíraszama, kivéve a Frutafit CLR és Novation 330 mixet tartalmazó csövet, ahol a *Bacteroides* ebben a mintavételi időpontban sem volt kimutatható. A *Clostridium perfringens* minden kevert szubsztrátot tartalmazó tenyészetben 24 órás fermentációnál éri el a maximumát, majd 48 órára lecsökken a csíraszám. A *Bifidobacterium longum* és a *Lactobacillus casei* egyenletesen és folyamatosan növekedett minden inulin és rezisztens keményítő keveréken.

5.3 Prebiotikus index értékek

A 13. Ábrán láthatjuk a probiotikus és potenciálisan patogén baktérium kevert tenyészetes vizsgálatait során számolt Prebiotikus index értékeket.

12 **Ábra** Kevert tenyészetek *Prebiotikus index* értékei különböző szubsztrátok jelenlétében 8, 24 és 48 órás fermentációt követően



A legmagasabb Prebiotikus index értékek 24 és 48 óra elteltével is az inulin mintákon voltak mérhetők. A rezisztens keményítőknék a Hi-maize mindhárom mintavételi időpontban negatív indexet adott. A Novelose 330 keményítő PI értéke 48 óra elteltével viszonylag magas. Az Orafit Synergy 1 és a Hi-maize 260 keveréke mutatta a kombinációk közül a legalacsonyabb prebiotikus hatást. Legmagasabb PI értéket a keverékek közül a a Frutafit CLR és Novation 330 mixben mértünk, itt a többi mintától eltérően már a 24 órás mintavételenél magas prebiotikus aktivitás volt megállapítható.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

4 probiotikus és 2 kórokozó baktériumot vizsgáltunk 3 fruktán és 2 rezisztens keményítő mintán illetve ezek 6 keverékén. Kiszámoltuk a baktériumok növekedési ráta és az egyes anyagok PI értékeiket.

A **tiszta tenyészeteknél** a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088 baktérium vizsgálata során 8 órás fermentációt követően nem volt csíraszám növekedés. Legmagasabb csíraszám értékek 24 és 48 óra elteltével is a mixeken volt mérhető illetve a pH is a kevert szubsztrát tartalmú csövekben csökken a legnagyobb mértékben. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 baktérium a legmagasabb csíraszámokat az Orafit Synergy 1 és a Frutafit-CLR tartalmú kombinációkban illetve a tiszta inulin mintákon érte el. A tiszta anyagok hatékonyabban csökkentették a pH-t mint a keverékek. *Lactobacillus casei* DSM 20011 az Orafit Synergy 1 fruktán és a Novelose-330 rezisztens keményítőt illetve a két anyag keverékét hasznosította a legjobb mértékben. A Novelose-330, Fruktooligoszacharid illetve az Orafit Synergy 1 és a Novelose 330 keveréke csökkentette nagy mértékben a pH-t. *Lactobacillus reuteri* (Reuflor) tenyésztése során 48 órás fermentációt követően volt számottevő növekedés. A négy legmagasabb növekedési rátát produkáló szubsztrát sorrendben az Orafit Synergy 1 + Hi-Maize 260, Fruktooligoszacharid, Fruktooligoszacharid + Hi-Maize, Novelose-330, Orafit Synergy 1 + Novelose-330 voltak. A *Lactobacillus reuteri* baktériumnál egy esetben volt számottevő csökkenés tapasztalható a 48 órás fermentációt követően a Frutafit-CLR és a Hi-Maize 260 keverékében.

A 4 tiszta tenyészetben vizsgált probiotikus baktérium közül kiválasztottuk azt a 2 törzset, amelyek az általunk felhasznált szubsztrátokat leghatékonyabban fermentálták: *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088.

A kevert tenyészetekben a probiotikus baktériumok a rezisztens keményítő mintákon alacsony növekedési rátákat mutattak. A három fruktán mintán magas Prebiotikus index értékeket mértünk és a probiotikus baktériumok is nagy csíraszámokban voltak jelen ezekben a tenyészetekben. A rezisztens keményítők közül a Hi-maize nem serkentette a jótékony baktériumok szaporodását. A legmagasabb Prebiotikus Index értékeket a három fruktán mintán tapasztaltuk: Fruktooligoszacharid, Frutafit-CLR, Orafit Synergy1. A tiszta rezisztens keményítő mintákat általában jobban hasznosították a patogén baktériumok: Hi-Maize, Novelose.

A fruktánok és rezisztens keményítők 3:7 arányú kombinációja hatékonyan nyomta el a patogén törzsek növekedését és szelektíven serkentette a probiotikus törzsek szaporodást. A leghatékonyabb kombinációk Frutafit CLR + Hi-Maize 260, Frutafit CLR + Novelose-330 keverékei voltak.. Így

megállapítható, hogy fruktánokkal kombinálva a rezisztens keményítők prebiotikus hatása intenzívebben érvényesül. Magasabb arányú rezisztens keményítő hozzáadásával is megfigyelhető a 2 szénhidrát additív hatása. A Hi-maize vagy a Novelose rezisztens keményítőkkal jelentős arányban lehet helyettesíteni a drága fruktánokat funkcionális élelmiszerfejlesztés során.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Prebiotic effects: metabolic and health benefits (2010) M. Roberfroid, G. R. Gibson, L. Hoyles, A. L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl, F. Guarner, F. Respondek, K. Whelan, V. Coxam, M.J. Davicco, L. Le'otoing, Yo. Wittrant, N. M. Delzenne, P. D. Cani, A. M. Neyrinck and A. Meheust, British Journal of Nutrition, Volume 104, Supplement 2

Bifidobaktériumok Izolálása, Azonosítása, Fiziologiai, Biokémiai és Funkcionális Jellemzésük (2004) Doktori Értekezés, Mayer Ágnes

Overview of gut flora and probiotics (1998) Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U & Huis in't Veld JH, International Journal of Food Microbiology 41, 85–101.

Prebiotic digestion and fermentation (2001) Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HM, American Journal of Clinical Nutrition, 73 (suppl): 415S-20S

Short chain fatty acids and colonic health (2007) Hijova E, Chmelarova A, Bratisl Lek Listy 108 (8): 354-358

Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics (1995) Gibson GR & Roberfroid MB, Journal of Nutrition 125, 1401–1412.

A Probiotikumok alkalmazásának lehetőségei emésztőszervi betegségekben (2005) Demeter P. LAM-Tudomány

Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002) Joint FAO/WHO Working Group Report

A Consumer Guide for Making Smart Choices Developed by the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (www.ISAPP.net)

Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract (1998a) Charteris WP, Kelly PM, Morelli L and Collins JK, Journal of Applied Microbiology 84, 759-768

Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics (2004) Gibson GR, Probert HM, Van Loo JAE, et al. Nutritional Research Reviews 17, 259–275.

ISAPP (2008) 6th Meeting of the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, London, Ontario.

Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel (1996) Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN, British Journal of Nutrition 75, 733-747

Butyrylated starch protects colonocyte DNA against dietary protein-induced damage in rats (2008), Bajka BH, Clarke JM, Cobiac L, Topping DL, Carcinogenesis vol. 29 no. 11, pp. 2169-2174

Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics (2010), Bird AR, Conlon MA, Christophersen CT, Topping DL, Beneficial Microbes 1(4): 423-431

Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis (2003), Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisie CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ and Champ MJM, British Journal of Nutrition, 90, 75-85

Ileal recovery of starch from whole diets containing resistant starch measured in vitro and fermentation of ileal effluent (1995), Silvester KR, Englyst HN, Cummings JH, American Journal of Clinical Nutrition 62, 403-411

Utilization of orally administered D- [¹⁴C] mannitol via fermentation by intestinal microbes in rats (2010) Hongo R., Nakamura S., Oku T. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 56, 385-395

Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose (2002) Roberfroid M, Gibson GR, British Journal of Nutrition 87, S139–S311

Inulin and oligofructose: proven health benefits and claims (2007) Roberfroid M., Buddington R.K. Journal of Nutrition 137, S2489–S2597

Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition (2001), Schrezenmeir J, de Vrese M., American Journal of Clinical Nutrition. Feb;73(2 Suppl):361S-364S

The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats (2010), Rodríguez-Cabezas ME, Camuesco D, Arribas B, Garrido-Mesa N, Comalada M, Bailón E, Cueto-Sola M, Utrilla P, Guerra-Hernández E, Pérez-Roca C, Gálvez J, Zarzuelo A, Clinical Nutrition 29, 832-839

In vitro investigation of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens (2002), Fooks LJ, Gibson GR, FEMS Microbiology Ecology 39, 67-75

In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (amylomaize) starch granules by human colonic bacteria (1999,) Wang X, Conway PL, Brown IL, Evans AJ, Appl. Environmental Microbiology Vol.65, p. 4848-4854

Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides (2003), Palframan R, Gibson GR, Rastall RA, Letters in Applied Microbiology, 37, 281-284

Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectinc-oligosaccharides (2002), Olano-Martin E, Gibson GR, Rastall RA, Journal of Applied Microbiology, 93, 505-511

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni az Eszterházy Károly Főiskola, Élelmiszertudományi Intézet minden dolgozójának, hogy lehetővé tették számomra a munkájukba történő bekapcsolódást és a kísérletek elvégzését.

Köszönöm Dr. habil. Kiss Attila Tanár Úrnak, az EKF Élelmiszertudományi Intézet intézetvezetőjének és Dr. Naár Zoltán Tanár Úrnak, az EKF Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék tanszékvezetőjének, hogy az Egerfood Regionális Tudásközpont Mikrobiológiai laboratóriumában dolgozhattam.

Köszönöm Fejes Zsuzsannának, az Egerfood Regionális Tudásközpont mikrobiológiai laboratórium asszisztensének, hogy munkámban segítségemre volt és hasznos tanácsaival ellátott.

Végül köszönöm Kalóczkai Katának, az EKF Mikrobiológiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék tudományos segédmunkatársának a dolgozat elkészítéséhez nyújtott támogatását.

9. NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ

Alulírott Gál Viktor nyilatkozom, hogy a jelen dolgozatban szereplő eredmények saját munkámon alapulnak. A más forrásból származó adatokat, tényanyagot egyértelműen megjelöltem és a forrásokat az Irodalomjegyzékben feltüntettem.

Eger, 2012. december 27.

Gál Viktor