

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék



Különböző anyagokkal bevont *Lactobacillus salivarius* mikrokapszulák összehasonlító jellemzése és életképességük vizsgálata

TDK dolgozat

Készítette: **Markó Dorottya**
ABBXJF
Biomérnöki alapképzés
nappali tagozat
Budai Campus

Témavezető: **Szécsi Anett, mestertanár;** Biomérnök és
Erjedéssipari Technológia Tanszék
Dr. Bujna Erika, egyetemi docens; Biomérnök és
Erjedéssipari Technológia Tanszék

Budapest
2022.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	1
2.	MUNKA CÉLJA.....	2
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1.	Az emberi mikrobiom áttekintése	3
3.1.1.	Az emberi mikrobiom származása	3
3.1.2.	A mikrobiom kölcsönhatása az emberi szervezettel	4
3.1.3.	A táplálkozás és a mikrobiom kapcsolata	6
3.1.4.	Az antibiotikum és a bélmikrobióta kapcsolata	8
3.2.	Funkcionális élelmiszerek	9
3.3.	Probiotikumok	10
3.3.1.	Lactobacillus nemzetség	11
3.4.	Prebiotikumok	11
3.5.	Probiotikus baktériumtörzsek mikrokapszulázása	12
3.5.1.	Kapszulázási technikák	12
3.5.2.	Kapszulázóanyagok	14
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1.	Alkalmazott mikroorganizmus	17
4.2.	Felhasznált anyagok és oldatok összetétele.....	17
4.2.1.	Alkalmazott oldatok	17
4.2.2.	Az extrúziós mikrokapszulázás során alkalmazott anyagok.....	18
4.2.3.	Az emésztőrendszer modellezéséhez alkalmazott oldatok	20
4.3.	Alkalmazott módszerek.....	21
4.3.1.	<i>Lactobacillus salivarius</i> HA-118 sejtek felszaporítása.....	21
4.3.2.	Extrúziós sejt kapszulázási módszer	21

4.3.3.	Kapszulázás hatékonyságának meghatározása	22
4.3.4.	Emésztési vizsgálatok	22
4.3.5.	Hőkezelési vizsgálat.....	23
4.3.6.	Szilvalé fermentáció és tárolási vizsgálata.....	24
4.3.7.	pH meghatározás.....	24
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	25
5.1.	Probiotikumok mikrokapszulázása extrúziós technikával	25
5.1.1.	Különböző kapszulák morfológiai tulajdonságai.....	25
5.1.2.	Mikroszkópikus felvételek.....	26
5.1.3.	Kapszulázási hatékonyság.....	27
5.2.	Emésztési vizsgálatok eredményei	28
5.3.	Hőkezelési vizsgálat eredményei	31
5.4.	Szilvalé fermentáció és tárolási vizsgálat eredményei	33
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	37
7.	IRODALMI HIVATKOZÁS	39
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	47

1. BEVEZETÉS

Ma már tudományosan bizonyított tény, hogy az emberi gyomor- és bélrendszerben élő mikroorganizmusok jelentős szerepet játszanak a szervezet fiziológiás folyamataiban, ugyanis a mikrobiom állapota, illetve összetétele hatással van az immunrendszer működésére, méregtelenítésre, a gyulladásos folyamatokra, a neurotranszmitterek működésére, a tápanyagok felszívódására, valamint a zsírok hasznosulására. A gyulladásos folyamatok megnövekedett szintje pedig olyan krónikus megbetegedések kialakulásához vezethet, mint például az elhízás, a cukorbetegség, a szív- és érrendszeri megbetegedések, az immunrendszer károsodása, és egyéb agyi- és idegrendszeri károsodások.

A fent említett indokok miatt a fogyasztói társadalomban folyamatosan növekszik az olyan funkcionális élelmiszerek iránti igény, amelyek pro- és/vagy prebiotikumokat tartalmaznak. Az ilyen élelmiszerek fogyasztása nemcsak az antibiotikumos kezelés után felborult, diszbióz mikrobiom visszaállítására ajánlott, hanem számos betegség megelőzésére is.

A probiotikus baktériumtörzseknek igazoltan jótékony hatása van a szervezetre nézve, többek között segítenek fenntartani a bélnyálkahártya épségét, szabályozzák a szervezet pH-ját, valamint növelik az immunitást és csökkentik a gyulladásos folyamatokat. Továbbá természetes antibiotikumként is szolgálnak; olyan anyagokat termelnek, amelyek gátolják a patogén baktériumok, vírusok, gombák elszaporodását a szervezetben.

Azonban ahhoz, hogy a probiotikum tartalmú élelmiszerek jótékony hatásukat kifejtsék, megfelelő mennyiségű sejtnek (10^6 - 10^7 TKE/ml) kell eljutnia a felhasználási helyre. Erre a problémára nyújthat megoldást a baktériumsejtek mikrokapszulázása, amely védelmet biztosít a probiotikum számára mind az élelmiszerek előállítása és tárolása során, mind a gyomor-béltraktus extrém körülményei ellen. Egyik legelterjedtebb kapszulázási módszer az extrúziós mikrokapszulázás, amely során a sejteket hidrokolloid oldatba szuszpendálják, majd egy fecskendőn keresztül térhálósító oldatba csepegtetik az elegyet.

Szakdolgozatom során extrúziós technikát alkalmazva különböző kapszulázó anyagokba zárt probiotikus sejtek életképességét vizsgáltam különböző környezeti hatások mellett (emésztőrendszeri körülmények, 60 °C-os hőkezelés), valamint fermentált szilvalében való tárolás során.

2. MUNKA CÉLJA

Életünk során folyamatosan kölcsönhatásban vagyunk a környezetünkkel, amely néha drámai következményekkel jár, ha káros hatások érik. A bélmikrobióta nagyon érzékenyen reagál a külső környezeti változásokra (például antibiotikum kezelés, helytelen táplálkozás), a mikrobiom pedig az egész szervezetünk működését befolyásolja. A bélmikrobióta összetétele, az ott bekövetkező változások hatással vannak a szervezetben lezajló gyulladásos folyamatokra, kóros elváltozásokra. Ilyen változásokhoz köthető az elhízás, a 2-es típusú cukorbetegség, az élelmiszer allergia, asztma, rák és egyéb neurológiai megbetegedések (Perlmutter, 2017).

A probiotikumok képesek helyreállítani a bél mikrobiom összetételét és jótékony tulajdonságaikkal hozzájárulnak a bél mikrobaközösségének megfelelő működéséhez. A probiotikus baktériumfajok többsége a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* nemzetségbe sorolható (Guarner és mtsai., 2017).

A kutatómunkám során az alábbi feladatokat terveztem megvalósítani:

- *Lactobacillus salivarius* HA-118 törzs különböző hidrokolloid anyagokkal való kapszulázása extrúziós módszer segítségével, és a kapszulázási hatékonyság meghatározása.
- A kapszulázott mikroorganizmusok életképességének vizsgálata emésztőrendszeri körülmények között.
- A kapszulázott sejtek életképességének vizsgálata 60°C-os hőkezelés során.
- A kapszulázott probiotikumok vizsgálata szobahőmérsékleten, szilvalében történő 5 hónapos tárolási folyamat során.

A kísérleteimet a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszéken végeztem.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az emberi mikrobiom áttekintése

A szervezetünkben található mikroorganizmusokat összefoglaló néven mikrobiomnak nevezzük, amely elsősorban baktériumokat tartalmaz, de találhatóak közöttük élesztőgombák, vírusok és eukarióta sejtek is. Ha számszerűsítve szeretnénk megadni, akkor azt mondhatjuk el, hogy tízezerszer több, szemmel nem látható mikroorganizmus található szervezetünkben, mint ahány sejtünk van. Megtalálhatóak az emberi szervezeten belül: a bőrön, a szájüregben, a gyomor-bélrendszerben és a nemi szervekben is (Perlmutter, 2017). A bélmikrobiomban élő jótékony baktériumok hatalmas szerepet töltenek be az emberi szervezetben lejátszódó folyamatok (vérkeringés, légzés, anyagcsere, idegrendszeri funkciók) megfelelő működésében; ha pedig megbomlik az egyensúly, az számos egészségügyi problémát vonhat maga után.

3.1.1. Az emberi mikrobiom származása

Az első baktériumainkat a szülőcsatornán áthaladva, a bőrünkre tapadva szerezzük. A hüvelyi *Lactobacillus* fajok aránya a terhesség során megnő, és ugyanez jellemző a természetes úton született csecsemőkre is. Azaz elmondható, hogy az újszülött mikrobiota összetételét nagymértékben meghatározza az anya-utód mikrobiota cseréje. Az anyatejes táplálás során az anya folyamatosan ellátja saját baktériumaival az újszülött szervezetét (Turroni és mtsai., 2014). Az ember, mint az emlősök evolúciósan alkalmazkodtak a hüvelyi úton való szüléshez és az anyatejes szoptatáshoz, ezért ezek kulcsfontosságú szerepet játszanak az csecsemők egészségre és fejlődésére nézve. Azonban az olyan külső beavatkozások, mint a császármetszés, tápszeres etetés vagy a terhesség alatti antibiotikus kezelés megváltoztatja a csecsemők bélmikrobióta kolonizációját (Mueller és mtsai., 2015).

Az újszülött csecsemők szervezetében előforduló két legjelentősebb baktérium a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* nemzetségbe sorolható. A *Lactobacillus* enyhén savas közeget alakít ki, ami megakadályozza a potenciálisan kórokozó baktériumok elszaporodását, továbbá a tejcukrot (laktóz) képes bontani és hasznosítani, ezzel biztosítja a csecsemő szervezetének az anyatejből származó tápanyagot (Perlmutter, 2017). A *Bifidobacterium* szintén jótékony hatású baktérium, amely az anyatejben lévő oligoszacharidok hasznosításában játszik szerepet (Stuivenberg és mtsai., 2022).

3.1.2. A mikrobiom kölcsönhatása az emberi szervezettel

Az emberi szervezetben élő mikroorganizmusok alapvető hatással vannak a szervezetünkre (Sullivan, 2021). A testünkben élő kb. 100 billió mikroorganizmus mindegyikének saját DNS-e van, így nemcsak a mikrobával, hanem annak örökítőanyagával és élettevékenységeivel is kölcsönhatásban vagyunk.

A mikrobiom állapota nagymértékben hatással van az emberi egészségre, élettevékenységeivel biztosítja a szervezet homeosztázisát, ezért a tudomány élvonalába tartozó kutatások szerint különálló szervnek kellene tekinteni. Perlmutter (2017) szerint „az egészségünkkel kapcsolatban minden a mikrobiom állapotától függ, ez határozza meg, hogy hogyan érezzük magunkat érzelmileg és fizikailag”. Az emésztőrendszerben előforduló baktériumok mindegyike más-más hatással van a szervezetünkre.

A bélmikrobiótával kapcsolatos kutatásokat csíramentes (germ-free, GF) laboratóriumi rágcsálókön végzik. Ezeket az egereket úgy tenyésztik, hogy az emésztőrendszerükben semmilyen baktérium ne legyen. Ez teszi lehetővé a kutatók számára, hogy felmérjék a mikrobiom hiányának következményeit, illetve, hogy az egyes mikrobatorzsek milyen hatással vannak a szervezetre. A csíramentes egerek esetében akut szorongást, tartós stresszt, krónikus emésztőrendszeri és egyéb gyulladásos folyamatokat írtak le, azonban probiotikus *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* baktériumtorzsek hozzáadásával ezek a tünetek megszűntek (Perlmutter, 2017).

Az újabb kutatási eredmények szerint a következő élettani funkciókban játszanak szerepet az emésztőrendszerben élő mikroorganizmusok (Perlmutter, 2017):

- Elősegítik a táplálék felszívódását és megemésztését.
- Fizikai akadályt képeznek a kóros, patogén baktériumok, vírusos, paraziták ellen.
- Biológiai folyamatokban létfontosságú enzimeket, vitaminokat, neurotranszmittereket (ingerületátvivő anyagokat) termelnek.
- Méregtelenítő rendszerként semlegesítik a táplálék által bekerülő toxinokat.
- Az immunrendszer megfelelő működésében kulcsfontosságú szerepet töltenek be (a bélrendszer a legnagyobb immunszervünk).
- Mérséklék a gyulladásos folyamatok kialakulását.
- Hatással vannak a stressz kezelésében az endokrit (humorális) rendszerre kifejtett hatásával.

A napi B₁₂-vitamin szükségletünk nagy részét a vékonybélben található baktériumok (*Pseudomonas* és *Klebsiella* fajok (Albert és mtsai., 1980)) biztosítják. A B₁₂-vitamin (cianokobalamin) számos enzim kofaktoraként működik, és kulcsszerepet tölt be az agy és az idegrendszer megfelelő működésében, a vörösvértestek képzésében és a testi sejtek anyagcseréjében (Mulvihill, 2004). Ha a szervezet nem jut megfelelő mennyiségű B₁₂-vitaminhoz, akkor kialakul a vészes vérszegénység, továbbá óriási kockázati tényezőt jelent a demenciára és egyéb idegrendszeri problémákra (pl: depresszió) nézve. Az emberi szervezet ezen vitaminhoz csak állati eredetű táplálékkal (pl: hal, hús, tojás) jut hozzá.

Ahogy az ember öregszik, úgy a bélmikrobiom összetétele is folyamatosan változik. A felnőtt szervezetében a *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* és *Verrucomicrobiai* baktériumok dominálnak. Az összsejtszám ~90%-át a Gram-negatív *Bacteroidetes* és a Gram-pozitív *Firmicutes* teszi ki. A szervezet megfelelő működéséhez igen fontos a bélmikrobiom sokszínűsége és a törzsek egymáshoz viszonyított aránya. A bélrendszerben élő mikroorganizmusok befolyásolják a tápanyagok felszívódását, lebontását és tárolását, ezzel potenciálisan hozzájárulnak a gazdaszervezet fiziológiájához (Aoun és mtsai., 2020).

Az arány megváltozásával a szervezetben lefolyó genetikai információ kifejeződése (génexpresszió) is megváltozik, ezenkívül megnövelheti az elhízás, a cukorbetegség, szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázatát (Kumar és mtsai., 2014; Magne és mtsai., 2020). Ha nem megfelelő a baktériumok aránya, akkor egy alapvetően pozitív hatásokkal rendelkező baktérium is kárt okozhat a szervezetre nézve. Például az *Escherichia coli* a szervezet számára K-vitamint termel, azonban, ha túlsúlyba kerül, akkor súlyos betegségeket okozhat (Perlmutter, 2017).

Emésztőrendszerünk a nyelőcsőtől egészen a végbélnyílásig tart, amelyet egy egyrétegű hámszövet borít. A bélnyálkahártya a szervezetünk legnagyobb nyálkahártya felülete mely három alapvető funkciót lát el. Elsősorban ezen keresztül történik a tápanyagok felszívódása. Másodszor, akadályt képez azon molekulák, vegyületek, mikroorganizmusok ellen, amelyek a véráramba kerülve káros hatásokkal lehetnek a szervezetre. Harmadszor, immunglobulinokat (antitesteket) tartalmaz, amelyek hozzákötődnek az idegen baktériumokhoz, fehérjékhez, ezzel megakadályozzák, hogy a bélnyálkahártyához tapadjanak (Perlmutter, 2017).

Az egészséges bélhártya nem engedi át a lipopoliszacharid (LPS) komponenst. Ez a Gram-negatív baktériumok külső membránjának fontos sejtfal alkotója, amely ahogy a neve is utal rá lipidből (zsír) és cukor molekulákból épül fel. Az LPS, mint endotoxin erős gyulladásos reakciókat vált ki a véráramba kerülve. Az alacsony fokú gyulladást számos betegséggel hozták kapcsolatba: elhízás, cukorbetegség, nem-alkoholos zsírmáj, krónikus vesebetegség, szív- és érrendszeri megbetegedés, valamint gyulladásos bélbetegségek. Az LPS és a gyulladásos bélbetegség között kétirányú kapcsolat áll fenn. A bélgyulladás során megváltozik a bél permeabilitása és kialakul az úgynevezett „szivárgó bél”, ez pedig elősegíti az LPS véráramba való jutását (Candelli és mtsai., 2021). Tehát az LPS emelkedett szintje a vérben nemcsak a gyulladásos folyamatok jelenlétére utal, hanem arra is, hogy a bélnyálkahártya átteresztővé vált. Természetesen mindannyiunk szervezetében van bizonyos mennyiségű LPS, ugyanis ez a bélrendszerünkben élő Gram-negatív baktériumok strukturális összetevője, azonban a magas zsírtartalmú élelmiszerek fogyasztása megnöveli a bélmikrobióta Gram-negatív baktériumai arányát a Gram-pozitív fajok rovására (Salguero és mtsai., 2019).

3.1.3. A táplálkozás és a mikrobiom kapcsolata

Az ember egészségét és a mikrobiom egészségét nagymértékben meghatározza az elfogyasztott táplálék minősége és változatossága, azonban jelenlegi, nyugati étrendünket magas zsír- és cukortartalom, alacsony rost-, gyümölcs és zöldség bevitel jellemzi, amely hátrányosan befolyásolja a gazdaszervezet immunitását (Zheng és mtsai., 2020). A bélbaktériumok számára a növényi rost jelenti a tápanyagforrást. Eric és Justin Sonnenburg (2014) Stanford Egyetem Orvosi Karán végzett kutatásaik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a nyugati növényi rostban szegény étrend drámai hatással van az egészségünkre, mivel nem tartalmazza az egészséges bélmikrobióta kialakításához és fenntartásához szükséges tápanyagokat, és ezért sokféle betegség kockázatát rejti magában.

Kutatások megállapították (Li és mtsai., 2020), hogy a rostban gazdag étrend és a 2-es típusú cukorbetegség között fordított arányosság áll fenn; a több növényi rost bevitel javítja a cukorbetegség kezelését és növeli a rövid szénláncú zsírsavakat (short-chain fatty acid, SCFA) termelő mikroorganizmusok mennyiségét. SCFA közé tartozik a butirát, acetát és propionát, amelyek az élelmi rostok bakteriális fermentációja során keletkeznek. A rövid láncú zsírsavak közvetlenül befolyásolják a máj glükóz metabolizmusát, csökkentve a glikolízist és a glükoneogenezist. (Cunningham és mtsai., 2021).

A *Firmicutes* nemzetségről kimutatták, hogy ezek az úgynevezett "zsírkedvelő" baktériumok nagyobb mennyiségben termelik az összetett szénhidrátokat bontó enzimeket, azaz számukra hatékonyabban megy végbe a táplálék energiává való átalakítása, továbbá a zsírfelszívódás növelésében szintén fontos szerepet játszanak (Carmody és Turnbaugh, 2012; Semova és mtsai., 2012). A bélmikrobiom összetételét a táplálkozási szokásaink is erősen befolyásolják. Akik tipikusabb nyugati étrendet követnek (magas zsír- és szénhidráttartalom), azokban a *Firmicutes* relatív mennyisége megnő a *Bacteroidetes* rovására (Davis, 2016). Manapság a *Firmicutes/Bacteroidetes* arányt tekintik az „elhízás biomarkerének” (Magne és mtsai., 2020). Összeségében elmondható, hogy a bélmikrobióta összetétel erősen korrelál az étrenddel, aminek megváltozása biológiai változást eredményez az emberi szervezetben. Az 1. táblázat szemlélteti, hogy a különböző étkezési szokások hogyan befolyásolják a mikrobiom összetételét.

1. táblázat: Az étrend hatása a mikrobiom összetételére (Aoun és mtsai., 2020; Brown és mtsai., 2012 nyomán)

Étrend	Mikrobiom változása	Forrás
Nyugati étrend	↓ Mikrobiális diverzitás ↑ <i>Firmicutes</i> és <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ <i>Bacteroidetes</i>	(Davis, 2016; Ismail és mtsai., 2011; Magne és mtsai., 2020; Simpson és Campbell, 2015; Turnbaugh és mtsai., 2009)
Mediterrán étrend	↑ <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Clostridium</i> klaszterek ↓ <i>Proteobacteria</i> ↓ <i>Bacillaceae</i>	(Walker és mtsai., 2011; Zhang és mtsai., 2018)
Vegetáriánus étrend	↑ <i>Bacteroidetes</i> ↓ Pathobionták ↓ <i>Bacteroides fragilis</i> ↓ <i>Escherichia coli</i>	(Baohman és mtsai., 2016)
Rostban gazdag étrend	↑ Mikrobiális diverzitás ↑ <i>Bifidobacteria</i>	(Pokusaeva és mtsai., 2011; Simpson és Campbell, 2015)
Magas zsírtartalmú étrend	↓ <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Firmicutes</i>	(Simpson és Campbell, 2015; Zhang és mtsai., 2009)

Mozgásban gazdag életmód	↑ Mikrobiális diverzitás ↓ <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> arány	(Santacruz és mtsai., 2009)
--------------------------	---	-----------------------------

3.1.4. Az antibiotikum és a bélmikrobióta kapcsolata

Az antibiotikumok mikroorganizmusok által termelt, más mikrobák életfolyamatait gátló szekunder metabolitok. Ezeket az anyagokat a humán gyógyászatban elsősorban antimikrobás anyagként (baktérium okozta fertőzések ellen) alkalmazzák. Alexander Fleming nevéhez fűződő antibiotikum felfedezése a 20. század egyik legnagyobb találmánya, számos súlyos baktériumok okozta megbetegedés kezelését tette lehetővé. Azonban mára az antibiotikumok túlzott használata számos komoly egészségügyi problémát vont maga után.

Az antibiotikum túlzott használatával kapcsolatos problémák:

- Túlérzékenység és allergiás reakciók.
- A bélmikrobióta összetételének megváltozása.
- A starterkultúrák gátlása a tejiparban. Az antibiotikumok a feldolgozási folyamat (pasztörözés, szárítás, fagyasztás) után is megtalálhatók a tejben; maradványaik részben vagy teljesen gátolják a baktérium starterkultúrák savtermelését.
- Antibiotikum-rezisztencia kialakulása.

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) szerint a 21. század legnagyobb egészségügyi kihívása az antibiotikum-rezisztencia (Internet 1).

Mint említettem a különböző antibiotikumokat a szervezetben zajló kóros bakteriális fertőzések ellen használják, azonban ezek a szerek a szervezetünkben élő jótékony mikroorganizmusokra is hatással vannak. Az antibiotikum bizonyos baktériumtörzsek pusztulását okozza, ezzel más törzsek elszaporodását elősegíti. Megváltozik a bélmikrobiom összetétele, diszbiózis következik be. A *Clostridium difficile* okozta fertőzés is antibiotikummal megzavart mikrobiom következménye. A betegség kimenetele az enyhe hasmenéstől a halálig terjedhet. A bélben található hasznos baktériumok kiirtása teszi lehetővé a *C. difficile* elszaporodását (Patangia és mtsai., 2022). A *Clostridium* fajok a rövid szénláncú zsírsavak közül elsősorban propionsavat termelnek, mely nagy mennyiségben toxikus a szervezetre nézve. A vérárammal az agyba jutva szerepet játszik az autizmus kialakulásában; megnöveli a bélnyálkahártya áteresztőképességét, ezzel gyulladási folyamatokat indít el (Perlmutter, 2017).

Számos tanulmány összefüggést mutat a túlzott antibiotikum-használat és az elhízás között. Állatkísérletekből kiderült, hogy az antibiotikum kúra után a haszonállatok bélflórájának összetétele nagyon gyorsan megváltozik. A kezelés során az egyensúly úgy borul fel, hogy az elhízásért felelős baktériumok (pl: *Firmicutes*) dominálnak, amely súlygyarapodást vált ki (Perlmutter, 2017). Az antibiotikummal kezelt táplálék elfogyasztásával ezek az antimikrobás vegyületek felhalmozódnak, bioakkumulálódnak az emberi szervezetben, ezzel megváltoztatva a bélmikrobióta összetételét. Az Európai Unióban szigorú szabályokkal korlátozzák a haszonállatok esetében alkalmazható antibiotikumokat; az Unión belül tilos az antibiotikumok hozamfokozóként való használata (Internet 2), amely célja az antibiotikum-rezisztencia kialakulásának visszaszorítása.

3.2. Funkcionális élelmiszerek

A táplálkozás és az egészség kapcsolatának egyre mélyebb ismeretében a fogyasztói társadalomban megjelent az olyan élelmiszerek iránti igény, amely a krónikus betegségek megelőzését teszi lehetővé. Ezek az úgynevezett funkcionális élelmiszerek. A fogalom 1999-ben érkezett meg Európába; a Functional Food Science in Europe (FUFOSE) a következőképpen definiálta: “Az élelmiszer akkor tekinthető funkcionálisnak, ha a megfelelő táplálkozás-élettani hatásokon túlmenően, a szervezetben egy, vagy több cél-funkcióra kimutatható pozitív hatása van úgy, hogy jobb egészségi állapot vagy kedvezőbb közérzet és/vagy a betegségek kockázatának csökkenése érhető el. Funkcionális élelmiszer kizárólag élelmiszer formájában kínálható, nem, mint tablettá, vagy kapszula. A hétköznapi táplálkozási magatartás integrális részét képezze, és hatását már a szokásos fogyasztási mennyiségénél fejtse ki” (Min, 1999; Roberfroid, 2002). A funkcionális élelmiszereknek két alapvető csoportja van: az egyik a természetben előforduló táplálékok, a másik a jótékony hatás eléréséhez módosított élelmiszerek. Legtöbbször vitaminokkal, pre- és probiotikumokkal vagy egyéb esszenciális anyagokkal dúsítják az élelmiszereket.

3.3. Probiotikumok

Fuller 1989-es definíciója szerint a probiotikumok olyan élő mikrobiális élelmiszer alkotók, amely jótékony hatással van a gazdaszervezetre, azáltal, hogy javítják a bélmikrobióta egyensúlyát (Fuller, 1989). Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (Food and Agriculture Organization, FAO) és az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) meghatározása szerint a probiotikumok „élő mikroorganizmusok, amelyeket, ha megfelelő mennyiségben fogyasztunk, pozitív élettani hatást fejtenek ki a gazdaszervezetre” (Joint FAO/WHO Working Group, 2002).

A probiotikumok antimikrobás szereket (tejsav, ecetsav, bakteriocin) és elsődleges anyagcsere termékeket (hidrogén-peroxid, szén-dioxid, diacetil) termelnek, amelyek elnyomják más mikroorganizmusok növekedését (Mishra és Lambert, 1996). A szerves savak termelése pH csökkenéssel jár, ezzel megakadályozzák a patogén baktériumok szaporodását. Továbbá a bélnyálkahártyán elhelyezkedő receptorokért és kötőhelyekért való versengéssel megakadályozzák a kórokozó mikrobák megtapadását (Hemarajata és Versalovic, 2013).

Bizonyos feltételeknek teljesülnie kell ahhoz, hogy egy mikroorganizmust probiotikumnak tekintsünk (Mitropoulou és mtsai., 2013):

1. Biztonsági kritériumok: alapvető fontosságú, hogy a probiotikum az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatósága (US Food and Drug Administration, FDA) szerint "általánosan biztonságos" ("generally recognized as safe", GRAS) legyen az emberi szervezet számára. Az alkalmazott mikroorganizmus nem patogén, nem okoz emésztési zavarokat, nincs antibiotikum rezisztenciája.
2. A funkcionális kritériumok között szerepel, hogy mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgálatokkal kell igazolni, hogy a mikroorganizmus az egészségügyi előnyök biztosítása érdekében túléli a felső gyomor-bél traktus savas körülményeit és képes elszaporodni a bélben.
3. Technológiai kritériumok: az élelmiszer előállítás, feldolgozást megfelelő mennyiségű, 10^6 - 10^7 TKE/g sejtnek (telepképző egység) kell túlélnie.

A baktériumok közül a leginkább alkalmazott probiotikumok a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* fajokba sorolhatók.

3.3.1. *Lactobacillus* nemzetség

A *Lactobacillus* nemzetség az emberi mikrobiom fontos tagja, mennyisége az életkor és a bélben való elhelyezkedés függvényében változik. A gazdaszervezetre gyakorolt jótékony hatásai miatt széles körben alkalmazzák: a probiotikus *Lactobacillus* törzsek elősegítik a bélgát integritását (Hemarajata és Versalovic, 2013), és másodlagos metabolitként szintetizálnak, amely a *Clostridium*-ok ellen hatásos bakteriocin.

A *Lactobacillus* taxonómiaiilag a Baktériumok országában, a Firmicutes törzsbe, a Bacilli osztályba és a Lactobacillales rendbe tartozik. Gram-pozitív, endospórát nem képző, pálcá alakú, fakultatív anaerob baktériumok (Zhang és mtsai., 2018). Kataláz és oxidáz enzimmel nem rendelkeznek, azonban a keletkező peroxid bontására képesek pszeudokataláz enzimük révén. A tejsavbaktériumok szénhidrát lebontó anyagcseréje alapvetően kétféle mechanizmus szerint menet végbe. A homofermentatív tejsavas erjesztés az Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, glikolízis) útvonalat követi; a lebontás fő metabolitja a tejsav. A heterofermentatív tejsavas erjesztés során a tejsav mellett szén-dioxid, etanol és/vagy ecetsav is keletkezik. A heterofermentatív baktériumok a pentóz-foszfát útvonalon nyerik az energiát, ugyanis nem rendelkeznek a glikolízishez szükséges aldoláz enzimmel.

Lactobacillus salivarius

Az emberi bélrendszerben megtalálható *Lactobacillus salivarius* bizonyítottan jótékony hatású probiotikus baktérium. Anti-*Staphylococcus* fehérjéket termel, amelyek mind a plankton sejtek, mind a biofilmet képző *Staphylococcus aureus* ellen hatásosnak bizonyultak (Kang és mtsai., 2017). Gram-pozitív sejtfaik peptidoglikán réteget tartalmaz, a peptidláncainak specifikus aminosavszekvenciája befolyásolja a baktériumok kölcsönhatását a gazdaszervezettel. A *L. salivarius* egyik sajátos aminosavlánca az Ls33, amely összefüggésbe hozható a gyulladásgátló tulajdonságaival (Chapot-Chartier és Kulakauskas, 2014; Fernandez és mtsai., 2011).

3.4. Prebiotikumok

A prebiotikumok a bélmikrobióta tápanyagforrásai, alapvető szerepet játszanak a szervezet egészségének fenntartásában. A prebiotikumok olyan nem emészthető természetes élelmiszer-összetevők, amelyekre a szervezet gyomor-bélrendszer felső szakaszában található emésztőenzimek nem hatnak. Éppen ezért képesek változatlan formában a vastagbélbe jutni,

ahol szelektív tápanyagot biztosítanak a probiotikus mikroorganizmusoknak, serkentve ezzel szaporodásukat. A *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* baktériumok számának emelése mellett a bélcsatornán belüli enzimatikus, biokémiai folyamatokat is szabályozzák; csökkentik a potenciálisan rákkeltő vegyületek keletkezésének esélyét a vastagbélben, enyhítik a metabolikus szindróma kialakulásának kockázatát (Nilegaonkar és Agte, 2010; Váli, 2016).

3.5. Probiotikus baktériumtörzsek mikrokapszulázása

A probiotikumot tartalmazó terméknek megfelelő módon és mennyiségben el kell érnie a szervezetben a felhasználás helyét, ahhoz, hogy a mikroorganizmusok az élettevékenységükkel pozitív hatásukat ki tudják fejteni. Az elmúlt években a probiotikumok mikrokapszulázása nagy figyelmet kapott, azáltal, hogy megfelelő módszernek bizonyult a probiotikus törzsek szállítására és védelmére; a sejtek életképességének megőrzésére kedvezőtlen környezeti körülmények mellett (de la Cruz Pech-Canul és mtsai., 2020). A mikrokapszulázás egy olyan technológia, amely során a szilárd, folyadék vagy gáznemű anyagokat miniatűr kapszulákba zárják. A mikrokapszula egy vékony, féligáteresztő hártya, amely megvédi a sejteket a károsodástól, valamint visszatartja őket a sejtvész elkerülése érdekében (Anal és Singh, 2007; Krasaekoopt és mtsai., 2003). A legelterjedtebb mikrokapszulázási módszerek közé tartoznak a gélbezárásos technikák, mint az extrúziós és emulziós technika, valamint a szárításon alapuló módszerek, mint a porlasztva szárítás és a fagyasztva szárítás. A kutatások nagy részét extrúziós és emulziós módszerekkel hajtják végre, ahol általában polimer oldat térhálósítása történik térhálósító oldatba való csepegtetéssel vagy olajba való szuszpendálással (Cook és mtsai., 2012).

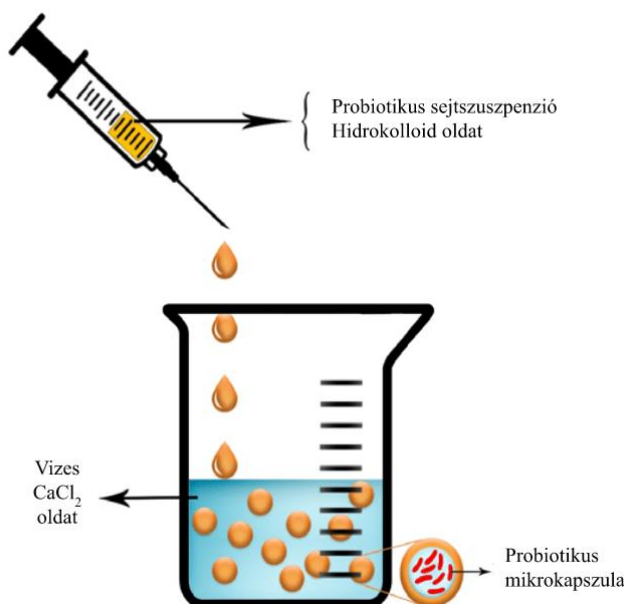
3.5.1. Kapszulázási technikák

Extrúziós technika

A mikrokapszula fizikai és/vagy kémiai tulajdonságait nagymértékben meghatározza a kapszulázási módszer, a probiotikus mikroorganizmus és a kapszulázóanyag típusa. Fontos azonban megemlíteni, hogy az élelmiszeriparban a gyártás során alkalmazott módszer kiválasztásának fő szempontjai a költség és a hatékonyság (de la Cruz Pech-Canul és mtsai., 2020). A legrégebbi és leggyakrabban alkalmazott módszer az extrúziós technológia, az alacsony költsége, egyszerű alkalmazhatósága, enyhe feldolgozási körülményei és magas sejt

túlélési arányának (80-95%) köszönhetően. A módszer hátránya viszont, hogy viszonylag nagy, 1-5 mm átmérőjű kapszulák kialakítását teszi lehetővé (Krasaekoopt és mtsai., 2003; Misra és mtsai., 2021).

Az extrúziós technika során először elkészítik a hidrokolloid oldatot (leggyakrabban alkalmazott bevonóanyag a nátrium-alginát), majd ehhez hozzáadják a baktériumtörzset. Az elegyet egy fecskendőbe töltik és injekciós tű segítségével egy többértékű kationt tartalmazó szilárdító oldatba (általában CaCl_2) csepegtetik. A folyadékba érve az alginát térhálósított gélgyöngyvé alakul, ezzel magába zárja a sejteket (1. ábra). A folyamat során a keletkező kapszulák méretét számos tényező befolyásolja, mint például a tű átmérője, a csepegtetés sebessége, illetve a tű távolsága a szilárdító oldattól (Krasaekoopt és mtsai., 2003).



1. ábra: Mikrokapszulázás extrúziós módszerrel (Riseh és mtsai., 2021 nyomán)

Emulziós technika

Az emulziós technika szintén kedvelt módszer a mikroorganizmusok kapszulázására, amely során kis mennyiségű sejt-polimer szuszpenziót (szakaszos fázis) adnak nagy mennyiségű növényi olajhoz (folyamatos fázis). Homogenizálva az oldatot víz-olaj (V/O) emulziót kapnak, amelyet általában felületaktív anyagokkal (pl: Tween 80) stabilizálnak. Az emulzió kialakulását követően a polimert oldhatatlanná kell tenni, hogy az olajfázisban apró gélrészecskéket képezzenek. Általában külső gélesítést alkalmaznak, amely során az alginátot CaCl_2 hozzáadásával gélesítik (Cook és mtsai., 2012). A képződött gyöngyöket később szűrő

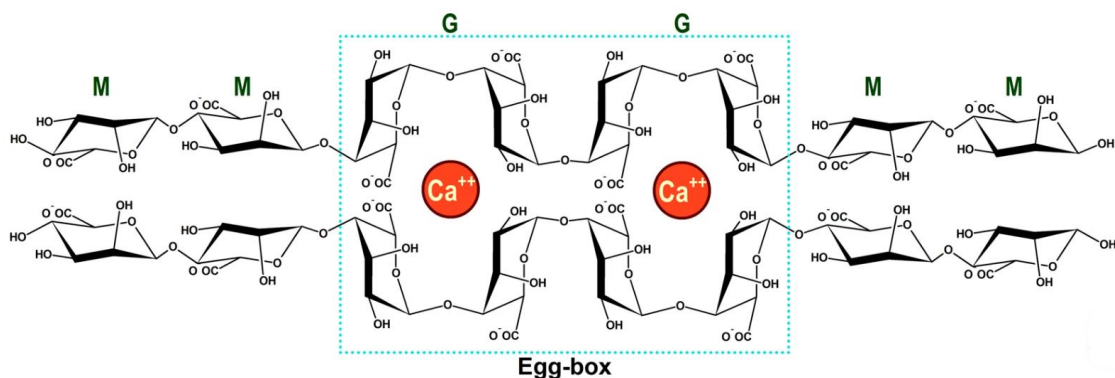
segítségével gyűjtik össze. A kapszulák mérete 25 μm – 2 mm között mozog a keverés sebességétől és az alkalmazott emulgeálószer típusától függően. A módszer előnye, hogy szintén magas (80-95%) mikroba túlélési arányt mutat és könnyen bővíthető (scale-up) nagyüzemi gyártáshoz, azonban a növényi olaj igénye miatt költségesebb, mint az extrúziós technika (Krasaekoopt és mtsai., 2003).

3.5.2. Kapszulázóanyagok

A mikrokapszulák elkészítéséhez különböző polimer anyagokat, például poliszacharidokat (alginát, keményítő, kitozán, cellulóz, κ -karragén, növényi gumi), fehérjéket (zselatin, tejfehérje) és zsírokat építenek be (Misra és mtsai., 2021). A poliszacharidok vagy poliglikánok monoszacharid egységekből felépülő biopolimerek; a monomerek száma és a kötések elrendeződése befolyásolja a polimerek viselkedését. A probiotikumok kapszulázására használt poliszacharidokat általában töltésük alapján különböztetjük meg: anionos, kationos, nem-ionos, amfoter (de la Cruz Pech-Canul és mtsai., 2020).

Anionos poliszacharidok:

Az **alginátot** széles körben használják, mint kapszulázóanyag. Szerkezetét tekintve egy el nem ágazó heteropoliszacharid, amelyet a barna algák (*Laminaria* spp.) sejtfalából vonnak ki. Változó arányú β -D-mannuronsav és α -L-guluronsav monomerekből épül fel, amelyeket β -1,4-glikozidos kötések kapcsolnak össze (de la Cruz Pech-Canul és mtsai., 2020). Az alginát guluronsav része kétértékű fémekkel (pl: kalciummal) érintkezve keresztkötést alakít ki (2. ábra). A hidrogél képződése azonnal megtörténik az alginát és a fémkation oldatának összekeverésével (Bruchet és Melman, 2015; Cook és mtsai., 2012).



2. ábra: Kalcium-ionokkal térhálósított alginát szerkezete (M: mannuronsav monomer; G: guluronsav monomer) (Lee és mtsai., 2019 nyomán)

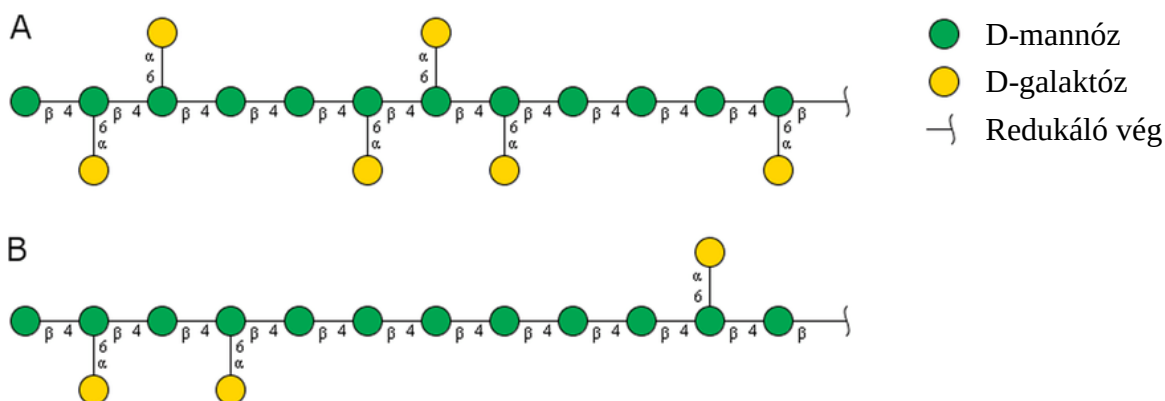
A **karragént** a vörös hínárból (*Rhodophyta*) vonják ki; kémiai szerkezetük és tulajdonságaik alapján három típust (κ -, ι - és λ -karragén) különböztetünk meg. A κ - (monoszulfatált) és ι - (biszulfatált) karragén típusok vízmentes hidakkal rendelkeznek, amelyek bizonyos kationok (K^+ , Ca^{2+}) jelenlétében lehetővé teszik a gélesedést. Az ι -karragén egy puha, elasztikus gél, míg a κ -karragén erős, masszív tulajdonságokkal rendelkezik és könnyű más anyagokkal elegyíteni (de la Cruz Pech-Canul és mtsai., 2020; Setijawati és mtsai., 2018). A szentjánoskenyér-gumival képzett elegye kohéziós, rugalmas gél eredményez, ugyanis a két polimer lánc között specifikus kapcsolódási zónák jönnek létre, ami megnöveli a gélzilárdságot és a rugalmasságot (Chronakis és mtsai., 1999; Dionísio és Grenha, 2012; Krasaekoopt és mtsai., 2003).

Nem-ionos poliszacharidok:

A **keményítő** lágy, fehér, ízetlen por. A felépítésében résztvevő glükózmonomerek tekintetében homopolimer; a glikozidos kötések révén azonban két eltérő szerkezetű polimer: amilóz és amilopektin. Az amilóz el nem ágazó lineáris molekulákból áll, amelyek α -1,4-glikozidos kötéssel kapcsolódnak össze, míg az elágazó amilopektin az α -1,4-kötések mellett α -1,6 és α -1,3-glikozidos kötések is tartalmaz. A keményítőben lévő amilóz/amilopektin aránya a forrástól függően változik, meghatározza annak belső tulajdonságait. A magas amilóztartalmú keményítők erős és rugalmas filmeket képeznek; gyakori példa az úgynevezett rezisztens keményítő, amely magas amilóz tartalmú kukoricakeményítő (de la Cruz Pech-Canul és mtsai., 2020). A keményítőt potenciális vegyületként írták le a különböző probiotikumok mikrokapszulázására. A rezisztens keményítő beépítése javítja a kapszulák stabilitását az alginát polimerekkel való kölcsönhatás révén, ezzel további védelmet nyújt a mikrokapszulának a szimultán emésztőrendszeri vizsgálatok és a különböző tárolási hőmérsékletek ellen (Iyer és mtsai., 2005; Mandal és mtsai., 2014).

A **guar gumi** a *Cyanopsis tetragonolobus* guar növény magjából származik. Kémiaiilag egy galaktomannán, amelynek szerkezetét β -1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolt D-mannóz egységekből felépülő gerinc és α -1,6-kötésekkel felépülő D-galaktóz oldallánc alkotja (de la Cruz Pech-Canul és mtsai., 2020). Széles pH tartományban biztosít stabil viszkozitást, gyakorlati stabilitási tartomány pH 4 és 10,5 között mozog (Thombare és mtsai., 2016). Ameeta és munkatársai (2013) alginát-keményítő alapú kapszulákhoz hozzáadva megfigyelték, hogy javította a mikrokapszulázott *Lactobacillus acidophilus* LA1 probiotikumok túlélését szimultán emésztőrendszeri modellben és hőkezelés (75 °C és 85 °C) során.

A **szentjánoskenyér-gumit** (Locust bean gum, LBG) a *Ceratonia siliqua* magjából vonják ki. Kémiai szintén egy galaktomannán, amely β -1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolt D-mannóz egységekből felépülő gerincből és α -1,6-kötésekkel felépülő D-galaktóz oldallánc alkotja. A különböző galaktomannánok esetében eltérő az mannóz-galaktóz arány (M/G); a szentjánoskenyér-gumi esetében 4:1, míg a guar guminál 2:1 a galaktóz egységek eloszlása a mannóz gerincen belül (3. ábra).



3. ábra: Guar gumi (A) és szentjánoskenyér-gumi (B) szerkezeti felépítése (von Freiesleben és mtsai., 2019)

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Alkalmazott mikroorganizmus

A kísérletem során a *Lactobacillus salivarius* HA-118 probiotikus baktériumtörzzsel dolgoztam, amely a Lallemand Health Solutions cégtől került beszerzésre fagyasztva szárított formában.

4.2. Felhasznált anyagok és oldatok összetétele

4.2.1. Alkalmazott oldatok

MRS (de Man, Rogosa és Sharpe) tápleves és tápagar

A *L. salivarius* felszaporításához, fenntartásához az MRS táplevest használtam (2. táblázat). Tápagar készítése esetén 15 g/L agart adtam az oldathoz; melyet lemezöntéses technika során alkalmaztam a sejtszám meghatározáshoz. Az egyes komponensek kiméréséhez táramérleget használtam, majd mágneses keverő segítségével homogenizáltam az oldatot. Az elkészített táplevest és tápközeget autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem. A tápagart felhasználás előtt felolvasztottam és 45 °C-os vízfürdőben folyékony halmazállapotban tartottam.

2. táblázat: MRS tápleves és tápagar összetétele

Összetevők	Mennyiség
Tripton	10 g
Húskivonat	8 g
Élesztőkivonat	4 g
Glükóz	20 g
Nátrium-acetát	5 g
Triammónium-citrát	2 g
MgSO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MnSO ₄	0,05 g
Tween 80	1 g
Desztillált víz	1000 ml

Fiziológiás sóoldat

A sejtszámlálás során tizedelő hígítási sort készítettem, amihez 0,85%-os fiziológiás sóoldatot használtam (3. táblázat). Az oldatot mágneses keverővel homogenizáltam, majd kémcsövekbe mértem 4,5-4,5 ml-t, végül autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem.

3. táblázat: 0,85%-os fiziológiás sóoldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
NaCl	8,5 g
Desztillált víz	1000 ml

4.2.2. Az extrúziós mikrokapszulázás során alkalmazott anyagok

0,1% peptonvíz

A 0,1%-os peptonvíz oldatot (4. táblázat) a keletkezett mikrokapszulák átmosására és tárolására használtam. Az elkészített oldatot 121 °C-on 15 percig autoklávban steriliztem.

4. táblázat: 0,1% peptonvíz összetétele

Összetevők	Mennyiség
Trypton	1 g
NaCl	9 g
Desztillált víz	1000 ml

0,1 M foszfát puffer (pH 6,8)

A sejtszám meghatározás során a kapszulák feloldásához használtam a 0,1 M foszfát puffer oldatot. A 5. táblázat feltüntetett összetevőket táramérlegen kimértem, majd 1000 ml-re hígítottam desztillált vízzel. Az oldat elkészítése után 0,1 N HCl oldat segítségével a pH értéket 6,8-ra állítottam, végül autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem.

5. táblázat: 0,1 M foszfát puffer összetétele

Összetevők	Mennyiség
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	17,9 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11,4 g
Desztillált víz	1000 ml

0,1 M CaCl₂ oldat

A 0,1 M CaCl₂ oldat (6. táblázat) a kapszulák kialakulását szolgálja az extrúziós technika alkalmazása során. Autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem az oldatot.

6. táblázat: 0,1 M CaCl₂ oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
CaCl ₂	14,7 g
Desztillált víz	1000 ml

0,3 M KCl oldat

A 0,3 M KCl oldat (7. táblázat) a kapszulák kialakulását szolgálja az extrúziós technika alkalmazása során. Autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem az oldatot.

7. táblázat: 0,3 M KCl oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
KCl	22,35 g
Desztillált víz	1000 ml

Hidrokolloid oldatok

A mikrokapszulázás során 2%-os Na-alginát oldatot (8. táblázat), Na-alginát – rezisztens keményítő oldatot (9. táblázat), guar gumi – rezisztens keményítő oldatot (10. táblázat), κ-karragén – rezisztens keményítő oldatot (11. táblázat) és szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő oldatot (12. táblázat) állítottam össze. Majd a Na-alginát – rezisztens keményítő oldatot a guar gumi – rezisztens keményítő oldattal 1:1 arányban elegyítettem, míg a κ-karragén – rezisztens keményítő oldatot 2:1 arányban elegyítettem a szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő oldattal (Ta, 2021; Ta és mtsai., 2021).

8. táblázat: 2%-os Na-alginát összetétele

Összetevők	Mennyiség
Na-alginát	2 g
Desztillált víz	100 ml

9. táblázat: 2%-os Na-alginát - rezisztens keményítő oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
Na-alginát	2 g
Rezisztens keményítő	2 g
Desztillált víz	100 ml

10. táblázat: 2%-os guar gumi - rezisztens keményítő oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
Guar gumi	2 g
Rezisztens keményítő	2 g
Desztillált víz	100 ml

11. táblázat: 2%-os κ -karragén - rezisztens keményítő oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
κ -karragén	2 g
Rezisztens keményítő	2 g
Desztillált víz	100 ml

12. táblázat: 2%-os szentjánoskenyér-gumi - rezisztens keményítő oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
Szentjánoskenyér-gumi	2 g
Rezisztens keményítő	2 g
Desztillált víz	100 ml

4.2.3. Az emésztőrendszer modellezéséhez alkalmazott oldatok

Gyomorsav modell oldat

Az emberi gyomor körülményeit modellező oldat összetétele a 13. táblázatban található. A 0,2%-os NaCl oldatot 0,1 N HCl oldat segítségével a megfelelő pH 2 értékre állítottam be, majd

autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem. Végül lamináris fülke alatt hozzáadtam a pepszint.

13. táblázat: Gyomorsav modell oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
NaCl	0,2 g
Pepszin	0,3 g
Desztillált víz	100 ml

Epesav modell oldat

Az emberi vékonybél környezeti körülményeit modellező oldat összetétele a 14. táblázatban található. A KH_2PO_4 oldatot 1 N NaOH oldattal a megfelelő pH 7,43 értékre állítottam be, majd autoklávban 121 °C-on 15 percig steriliztem. Végül lamináris fülke alatt hozzáadtam az epesót.

14. táblázat: Epesav modell oldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
KH_2PO_4	0,68 g
Epesó	0,6 g
Desztillált víz	100 ml

4.3. Alkalmazott módszerek

4.3.1. *Lactobacillus salivarius* HA-118 sejtek felszaporítása

A kapszulázás előtt a liofilizált sejteket 10 ml MRS táplevesben 24 órán át, 37 °C-on inkubáltam. A felszaporított sejteket 10 000 rpm-en (fordulat per perc, 10 percig, 4 °C-on lecentrifugáltam, majd az atmoszt követően a sejteket visszaszuszpendáltam 25 ml peptonvizes oldatba.

4.3.2. Extrúziós sejtkapszulázási módszer

Az extrúziós kapszulázás Krasaekoopt és munkatársai (2003) által leírt eljárás szerint történt. A kísérletem során a *Lactobacillus salivarius* HA-118 sejteket extrúziós technikával különböző

összetételű gélbe zártam. 30 ml hidrokolloid oldatokhoz 3 ml sejtszuszpenziót adtam, majd homogenizálás után fecskendő és 0,6 mm átmérőjű steril injekciós tű segítségével CaCl_2 vagy KCl oldatba csepegtettem az elegyet a kapszulák megszilárdulása érdekében. A folyamat során arra ügyeltem, hogy a kapszulák egyforma méretűek legyenek és a megszilárdulásuk előtt ne tapadjanak össze. A teljes megszilárdulásig 30 percet vártam, majd átmosva és peptonvízbe rakva hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltam őket a további felhasználásig.

4.3.3. Kapszulázás hatékonyságának meghatározása

A kapszulázási hatékonyság megadja, hogy a kiindulási sejtszám hány százaléka lett sikeresen bezárva mikrokapszula formába. Ennek meghatározásához megközelítőleg 0,5 g kapszulát mértem ki és oldottam fel 5 ml foszfát pufferben (pH 6,8) vortex segítségével. Mind a kapszulákból feloldott sejtekből, mind a szabad sejtekből tizedelő hígítási sort készítettem, amely során 0,5 ml sejtet pipettáztam 4,5 ml fiziológiás sóoldatba. A megfelelő hígítási tagokból 100 µl-t pipettáztam Petri-csészébe, majd MRS tápagar felhasználásával lemezoöntést végeztem. Az inkubálás 48 órán át 37 °C-on történt. Az 1 g kapszulában lévő sejtszámot az alábbi összefüggés segítségével határoztam meg:

$$\text{Sejtszám (TKE/g)} = \frac{\text{telepszám} \times \text{hígítási fok} \times 10 \times \text{szuszpenzió térfogata}}{\text{feloldott kapszula valódi tömege}}$$

A kapszulázási hatékonyság a következő képlettel segítségével számolható ki:

$$\text{Kapszulázási hatékonyság (\%)} = \frac{\lg(\text{kapszulázott sejtszám})}{\lg(\text{szabad sejtek száma})} \times 100$$

4.3.4. Emésztési vizsgálatok

A *Lactobacillus salivarius* HA-118 sejtek túlélését *in vitro* körülmények között vizsgáltam a gyomor-bél traktust modellező közegekben. Kísérletem során külön-külön vizsgáltam a gyomorsav és epesav hatását a kapszulázott és szabad sejteken.

4,5 ml gyomorsav/epesavas oldathoz megközelítőleg 0,5 g kapszulázott sejtet adtam hozzá. A gyomorsavas kezelés pH 2 értéken 135 percig, míg az epesavas kezelés pH 7,43 értéken 150 percig tartott 37 °C-on. Az idő lejártá után leöntöttem az oldatot és a gyöngyöket 5 ml foszfát

pufferben (pH 6,8) feloldottam vortex segítségével. A szabad sejtek esetén 2 ml sejthez adtam hozzá a 4,5 ml gyomorsav/epesavas oldatot és a kezelés lejártaival 10 000 rpm-en, 10 percig, 25 °C-on centrifugáltam a sejteket és viaszszuszpendáltam őket peptonvízben. Ezt követően a fentiekben ismertetett módszer szerint lemezöntést végeztem az élősejtszám meghatározása érdekében.

4.3.5. Hőkezelési vizsgálat

A hőkezelési vizsgálat során 60 °C-on 5, 10, 15 és 20 percig vizsgáltam a *Lactobacillus salivarius* HA-118 törzs hőtűrési képességét, mind a kapszulázott, mind a szabad sejtek esetén. A *Lactobacillus* nemzetség a mezofil mikroorganizmusok közé tartozik, azaz hőmérsékleti optimumuk 30-40 °C között található; Monteiro és társai (2021) azt találták, hogy a *Lactobacillus salivarius* a legnagyobb mértékű növekedést 45°C-on éri el.

A kapszulázott sejtekből 0,5 g gyöngyöt adtam hozzá 1 ml peptonvízhez, míg a szabad sejtek esetén 1 ml sejtszuszpenziót pipettáztam 1 ml peptonvízbe steril körülmények között. A kísérlet során a 60 °C-ra felmelegített vízfürdőbe helyeztem a kémcsöveket, és fél perc felmelegedési idő után 5, 10, 15 és 20 percig kezeltem az egyes mintákat. Az időtartam lejárta után 10 másodpercig 4 °C-os jeges közegbe helyeztem a kémcsöveket, mivel ezalatt az idő alatt kellően lehűl a minta, azonban a sejtek még nem roncsolódnak. A vizsgálat végén a kapszulákból a sejteket 4 ml foszfát pufferben vortex segítségével felszabadítottam, majd tizedelő hígítási sort készítettem és MRS tápagon lemezöntést végeztem a sejtszám meghatározása érdekében a fentiekben ismertetett eljárás alapján.

Pusztulási kinetika

Az eredmények alapján meghatározható a pusztulási kinetika, amelyet az alábbi képlet ír le:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\log N_2 - \log N_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta \log N}{\Delta t} = -\frac{k}{2,303} = -\frac{1}{D}$$

Ahol az N_1 a kezdeti sejtszám, az N_2 a túlélő sejtek száma t idő eltelte után (TKE/ml). A túlélő sejtek logaritmusát az idő függvényében ábrázolva egyenest kapunk, amelynek meredeksége a pusztulási sebességi együtthatóval (k) arányos. A tizedelési idő (D) az az idő, amely alatt a túlélő sejtek száma a tizedére csökken, értéke független a kiinduló sejtszámtól és mindig állandó hőmérsékletre vonatkozik.

4.3.6. Szilvalé fermentáció és tárolási vizsgálata

A kapszulázott sejtek szilvalében való tárolását vizsgáltam szobahőmérsékleten. A kísérlethez Voelkel Care 100%-os szilvalevet használtam. Először a szilvalé pH-ját 6,3-ra állítottam 1 N NaOH segítségével, majd 50 ml szilvalébe 5-5 g kapszulázott sejtet mértem. A szabad sejtek esetén 5 ml-t pipettáztam szintén 50 ml gyümölcslébe. Az elegyeket 48 órán át 37 °C-on fermentáltam, majd a kezdeti sejt meghatározás után szobahőmérsékleten tároltam a mintákat öt hónapig. A vizsgálat során időközönként mintát vettem a kapszulázott és szabad sejtek túlélésének meghatározásához és a gyümölcsle pH értékének vizsgálatához.

4.3.7. pH meghatározás

A szilvalé és egyéb oldatok pH értékét Mettler Toledo pH-mérő alkalmazásával határoztam meg. A mérést megelőzően a műszeren két pontos kalibrációt hajtottam végre, ami ismert pH-jú standard oldatokkal történt.

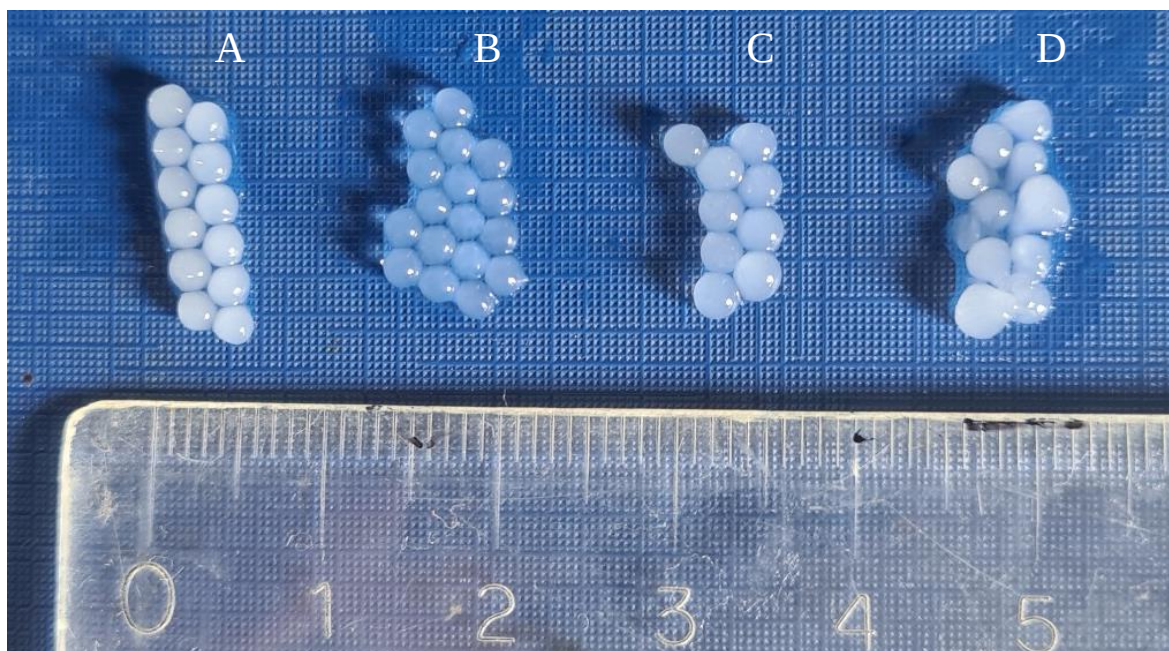
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Probiotikumok mikrokapszulázása extrúziós technikával

A kutatómunkám során a *Lactobacillus salivarius* HA-118 törzset különböző hidrokolloid oldat alapú gyöngyökbe kapszuláztam extrúziós technikával, majd vizsgáltam a kapszulák morfológiáját, méretét és meghatároztam a kapszulázási hatékonyságot.

5.1.1. Különböző kapszulák morfológiai tulajdonságai

A különböző összetételű kapszulák morfológiája a 4. ábrán látható. A négyféle kapszulázó anyag között főleg állag beli különbséget tapasztaltam. A Na-alginát alapú gélek esetén a CaCl_2 szilárdító oldatban egyből kialakultak a szabályos gyöngy alakú kapszulák. A κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő keverék gumisabb állagú volt, ezért a KCl szilárdító anyagba való csepegtetése során különösen ügyelni kellett arra, hogy amíg a kapszulák nem szilárdulnak meg, addig ne tapadjanak össze. Esetükben szabálytalan, vízcsepp formájú kapszulákat tudtunk elérni.



4. ábra Extrúziós technika alkalmazásával kialakított kapszulák morfológiája

(**A:** Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; **B:** Na-alginát alapú gyöngyök; **C:** Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; **D:** κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

A 15. táblázat mutatja be a különböző kapszulák átlagos átmérőjét, amelyet 10 kapszulát átlagolva határoztam meg. Az adatok alapján azt állapíthatjuk meg, hogy a rezisztens keményítőt tartalmazó kapszulák átlagos átmérője 2,4-2,5 mm, míg a Na-alginát alapú kapszulák átlagos átmérője csak 2,1 mm nagyságú volt. Eddigi kutatási eredmények alapján a mikrokapszulák mérete 0,5 mm – 2 mm közé tehető. Extrúziós technikát alkalmazva Krasaekoopt és munkatársai (2003) 2-5 mm közé tették a kapszulák átmérőjét, míg Gandomi és társai (2016) 0,5-3 mm mérettartományt állapítottak meg.

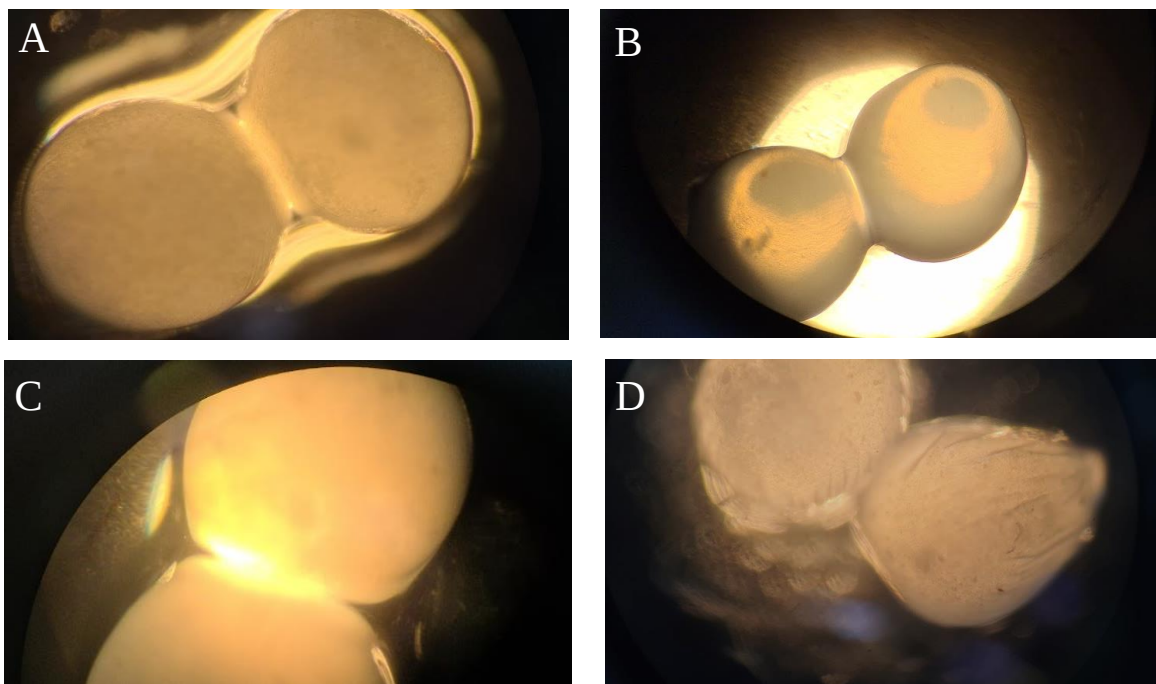
15. táblázat: Kapszulák átlagos mérete

Jelölés	Kapszula alap	Átlagos méret/kapszula
ALG	Na-alginát	2,1 mm
kALG	Na-alginát – rezisztens keményítő	2,5 mm
kALG-GUAR	Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő	2,4 mm
KARR-LBG	κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő	2,4 mm

A kapszulák mérete több szempontból is fontos. A gyöngynek megfelelően méretűnek kell lennie a probiotikus sejtek védelme érdekében, azonban nem ronthatja az élelmiszerek érzékszervi minőségét. Továbbá kritikus tényezőként meghatározza a kapszulázott anyag felszabadulási sebességét; a kisebb kapszulákból gyorsabban szabadulnak fel a gyógyszer hatóanyagok a megnövekedett felület/térfogat aránynak köszönhetően (Berkland és mtsai., 2004). Ezekből kifolyólag fontos kutatási terület lehet a jövőben a megfelelő kapszulaméret meghatározása.

5.1.2. Mikroszkópikus felvételek

A mikroszkópos felvételeket Olympus BX40 fénymikroszkóppal készítettem, 4x nagyítású objektív alkalmazásával. Megvizsgáltam a különböző összetételű gyöngyöket, melyek az 5. ábrán találhatóak. A felvételeken jól látszik a Na-alginát alapú gyöngyök szabályos gömb alakja, míg a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú kapszulák szabálytalan alakja és egyenetlen felülete.



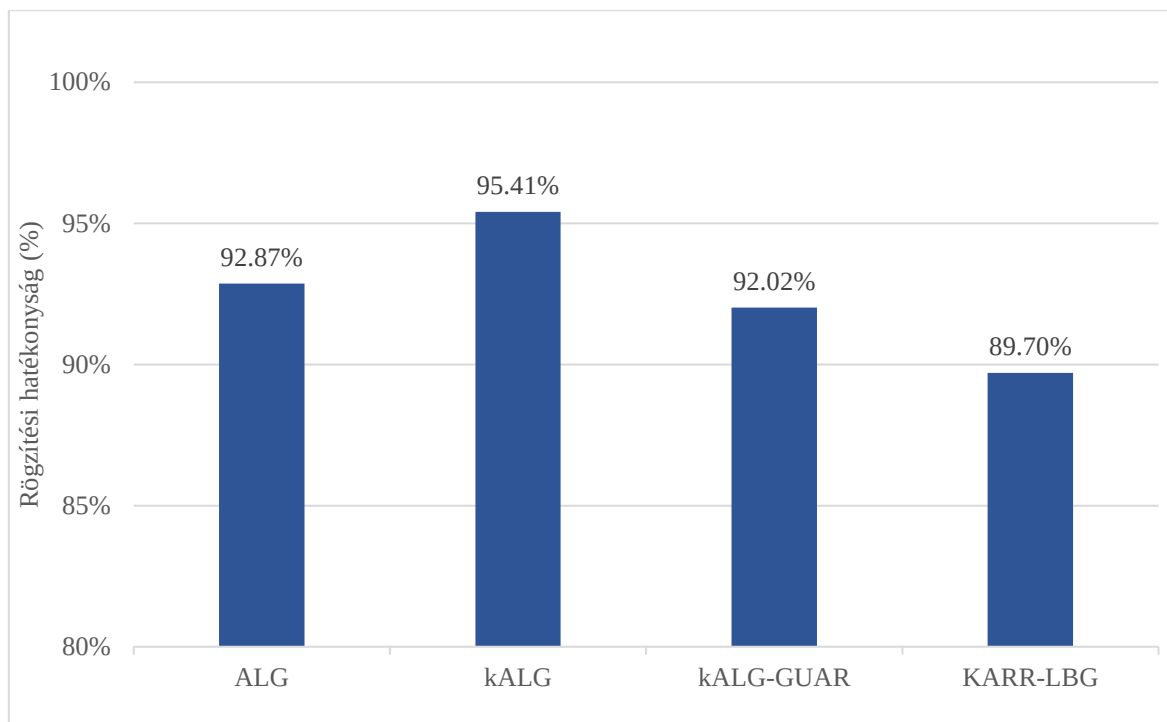
5. ábra: Extrúziós technika alkalmazásával kialakított kapszulák mikroszkópos képe

(**A:** Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; **B:** Na-alginát alapú gyöngyök; **C:** Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; **D:** κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

5.1.3. Kapszulázási hatékonyság

A kapszulázatlan *Lactobacillus salivarius* HA-118 esetén a 24 órás felszaporítást követően az átlagos sejtszám $2,33 \times 10^9$ TKE/ml volt. A kapszulázási hatékonyság meghatározása során ezt az értéket tekintettem a 100%-nak és ehhez viszonyítottam a kapszulázás során a gélbe zárt sejtek mennyiségét.

Általánosságban elmondható, hogy a kapszulázás sikeres volt, mivel minden esetben a sejtszám elérte a 10^8 TKE/g értéket. A 6. ábrán jól látható, hogy a kapszulázási hatékonyság minden esetben meghaladta a 85% feletti értéket. A legnagyobb kapszulázási hatékonyságot a Na-alginát – rezisztens keményítő mikrokapszulák esetén sikerült elérni (95,41%), míg a kiegészítés nélküli Na-alginát kapszulák esetén ez az érték 92,87% volt. A legkisebb kapszulázási hatékonyságot a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő elegynél tapasztaltam (89,70%).



6. ábra: A *L. salivarius* sejtek rögzítési hatékonysága különböző összetételű kapszulázó anyagok esetén

(ALG: Na-alginát alapú gyöngyök; kALG: Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; kALG-GUAR: Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; KARR-LBG: κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

Ta és munkatársai (2021) *Lactobacillus casei* törzs extrúziós technikával történő mikrokapszulázása során a Na-alginát esetén 64,4%-os, a Na-alginát – rezisztens keményítő eleggyel 77,0%-os, valamint a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi alapú gyöngyök esetén 71,6%-os kapszulázási hatékonyságot értek el. Tee és munkatársai (2013) *Lactobacillus plantarum* kapszulázása során a 3%-os κ -karragén 92,26%-os kapszulázási hatékonyságot mutatott.

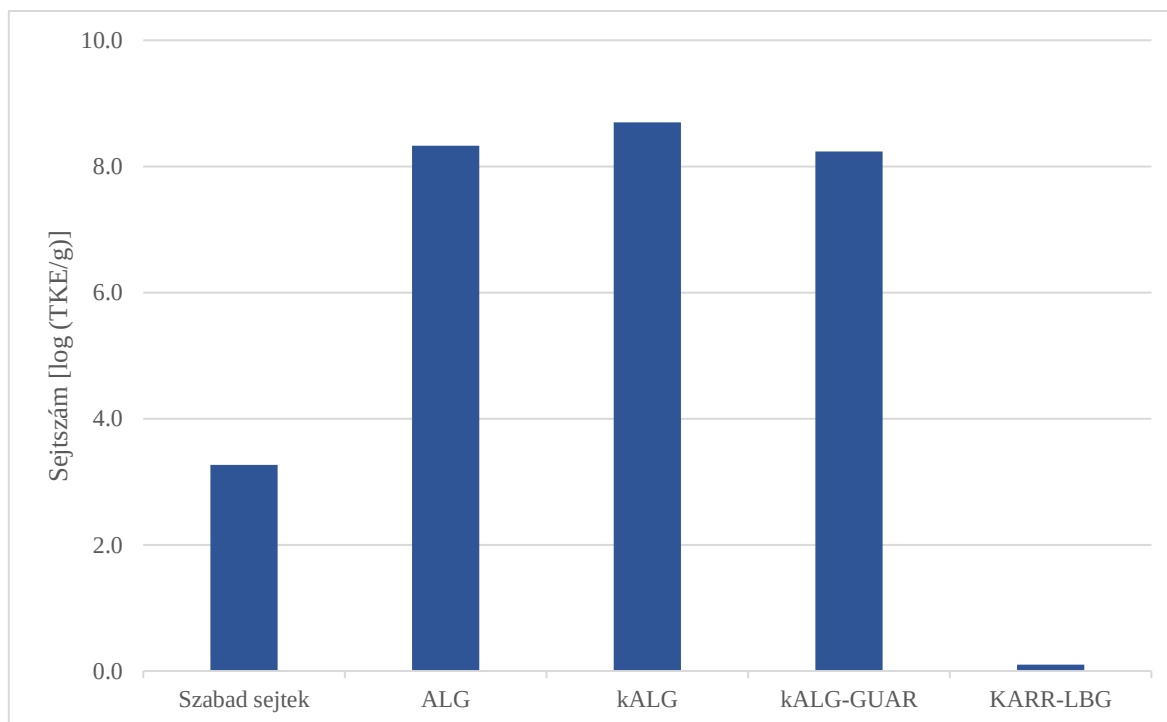
5.2. Emésztési vizsgálatok eredményei

Az emésztési modell kísérlet során azt vizsgáltam, hogy a különböző hidrokolloid anyagokba zárt sejtek milyen arányban élik túl az *in vitro* gyomorsavas és epesavas kezelést. A probiotikumok mikrokapszulázása ígéretes megoldást nyújt a gyomorban és a vékonybélben uralkodó környezeti körülmények ellen (Shori, 2017), így vizsgálataim során kontrollként szabad sejteket is alkalmaztam. Ahhoz, hogy a mikroorganizmusok ki tudják fejteni jótékony

hatásukat az emberi szervezetre, megfelelő mennyiségű sejtnak (10^6 - 10^7 TKE/g) életképesnek kell maradnia a gyomor-bél traktust követően is (Mitropoulou és mtsai., 2013).

Gyomorsavas kezelés

A 135 percig tartó gyomorsavas kezelést követően a szabad sejtek esetén $1,85 \times 10^3$ TKE/ml volt a sejtszám, azonban ez lényegesen kevesebb a probiotikus sejtektől elvált 10^6 - 10^7 TKE/g sejtszámhoz képest. A κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő elegyével bevont sejtek esetén egyik hígítási tagban sem volt kimutatható sejtszám, a sejtek nem éltek túl a gyomorsav pH 2 extrém környezeti körülményeit. Azonban a Na-alginátot tartalmazó kapszulák esetén nagy, átlagosan 95%-os túlélési hatékonyság volt megfigyelhető (7. ábra).



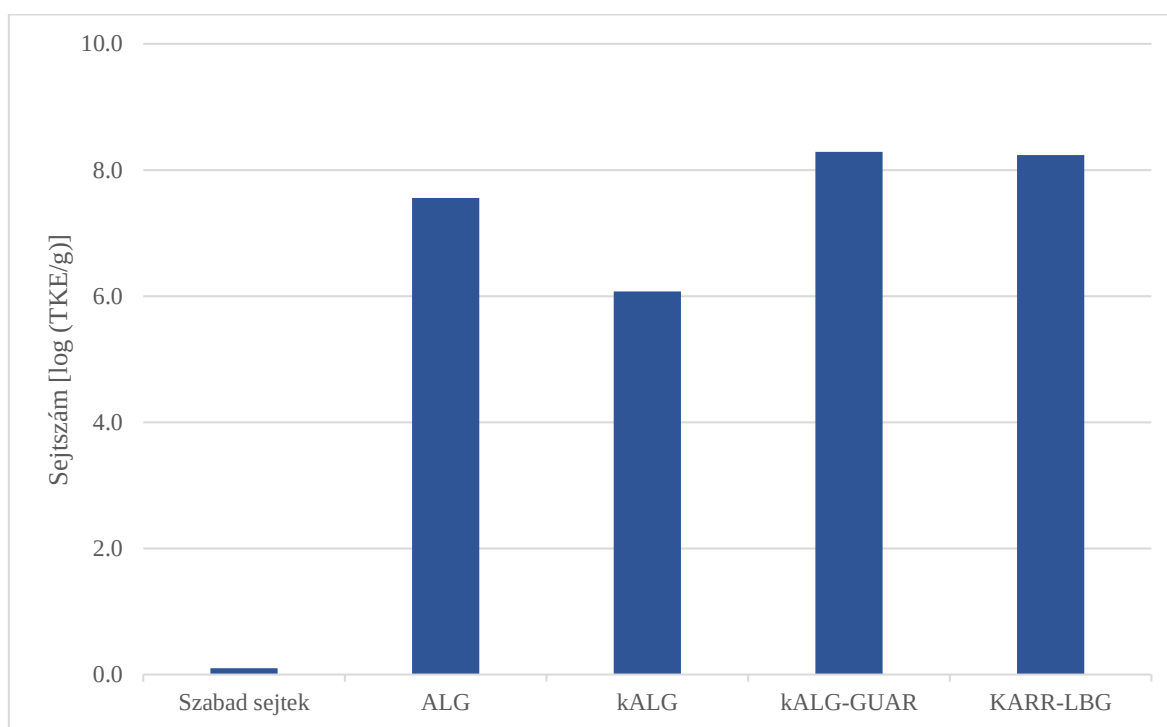
7. ábra: A *L. salivarius* sejtek túlélése a gyomorsavas kezelés során különböző kapszula anyagok alkalmazása mellett

(ALG: Na-alginát alapú gyöngyök; kALG: Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; kALG-GUAR: Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; KARR-LBG: κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

A 135 perces gyomorsavas kezelést követően hasonlóan alacsony túlélési arányt kapott Ta (2021), valamint Muthukumarasamy (2006) a κ -karragén és szentjánoskenyér-gumi elegy esetében. Következtetésképpen elmondható, hogy a keverék nem nyújtott nagyobb védelmet a sejteknek a Na-algináthoz viszonyítva a gyomor-bélrendszerben uralkodó pH 2 értéken.

Epesavas kezelés

A 150 percig tartó epesavas kezelés során a szabad sejtek elpusztultak, nem voltak képesek túlélni a vékonybelet modellező pH 7,43 környezeti körülményeket. A Na-alginát – rezisztens keményítő kapszulák esetén volt megfigyelhető a legkisebb sejtszám $1,18 \times 10^6$ TKE/g, ami még a határon belül van, ezért a kapszulázás sikeresnek mondható. A többi kapszulázó anyag esetén pedig átlagosan 90%-os túlélési hatékonyság volt megfigyelhető (8. ábra).



8. ábra: A *L. salivarius* sejtek túlélése az epesavas kezelés során különböző kapszula anyagok alkalmazása mellett

(ALG: Na-alginát alapú gyöngyök; kALG: Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; kALG-GUAR: Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; KARR-LBG: κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

A különböző probiotikus sejtek (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) Na-alginát – rezisztens keményítő alapú mikrokapszulák epesavas kezelés utáni sejtszám alakulásának eredményei korábbi tanulmányok alapján (Bodnár, 2019; Ecsedy, 2019) a 16. táblázatban kerültek összefoglalásra. Az adatok alapján az a következtetés vonható le, hogy az emulziós technikával kapszulázott sejteknek nagyobb volt a túlélési hatékonysága, de a témában további kutatások szükségesek a jobb kapszulázási módszer meghatározásához.

16. táblázat: Epesavas kezelés eredményeinek összehasonlítása korábbi kutatásokkal

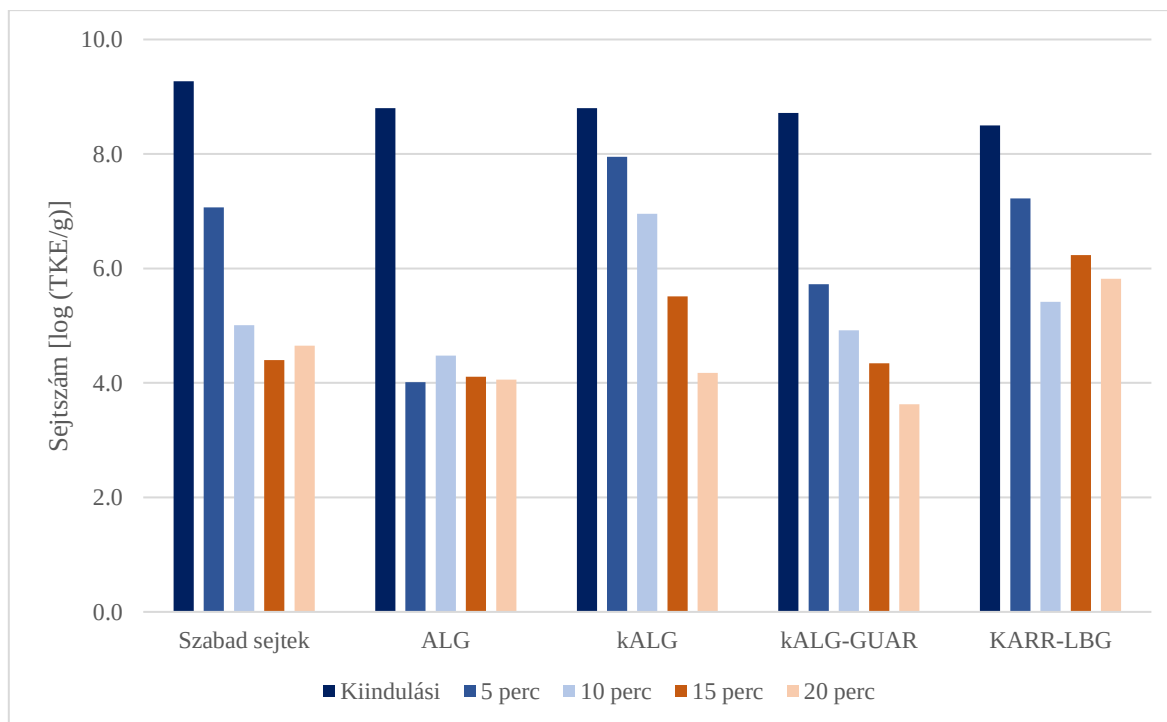
Baktériumtörzs	Kapszula alap, technika	Sejtszám (TKE/g)	Forrás
<i>Lactobacillus salivarius</i> HA-118	Na-alginát – rezisztens keményítő extrúziós mikrokapszulázás	$1,18 \times 10^6$	
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Na-alginát – rezisztens keményítő extrúziós mikrokapszulázás	$5,6 \times 10^5$	Ecsedy, 2019
<i>Lactobacillus casei</i> 01	Na-alginát – rezisztens keményítő emulziós mikrokapszulázás	$2,65 \times 10^7$	Bodnár, 2019
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Na-alginát – rezisztens keményítő emulziós mikrokapszulázás	$1,38 \times 10^6$	Bodnár, 2019

5.3. Hőkezelési vizsgálat eredményei

A kísérlet során a *Lactobacillus salivarius* törzset 60 °C-os hőmérsékletnek tettem ki 5, 10, 15 és 20 percen keresztül és vizsgáltam mind a szabad sejtek, mind a kapszulázott baktériumok túlélését (9. ábra).

A szabad sejtek esetén a kiindulási $1,87 \times 10^9$ TKE/ml sejtszámot követően az 5 perces hőkezelés után $1,16 \times 10^7$ TKE/ml sejt maradt életben, azonban a 10 perces kezelés végén már csak $1,02 \times 10^5$ TKE/ml volt az élőcsíraszám, ami viszont nem éri el a probiotikumtól elvárt 10^7 TKE/ml sejtszámot.

A Na-alginát és Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú kapszulák esetén az 5 perces hőkezelést követően már 10^6 TKE/g alá csökkent az életképes sejtek száma. A Na-alginát – rezisztens keményítő esetében a 10 perces kezelést követően $8,96 \times 10^6$ TKE/g volt a sejtszám. A legjobb eredményeket azonban a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő keverék mutatta, ahol a 15 perces hőkezelést követően is a kapszulák $1,72 \times 10^6$ TKE/g sejtet tartalmaztak.



9. ábra: A *L. salivarius* sejtek túlélése a 60 °C-os hőkezelés során különböző kapszula anyagok alkalmazása mellett

(ALG: Na-alginát alapú gyöngyök; kALG: Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; kALG-GUAR: Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; KARR-LBG: κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

A hőmérséklet fordítottan arányos a guar gumi oldat viszkozitásával; hőmérséklet emelkedésével a gumi molekulák közötti vízmolekulák elveszítik rendezettségüket és a konformáció felbomlik (Thombare és mtsai., 2016). A κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő kapszula által mutatott jobb hőtűrési tulajdonság előszörban a magasabb olvadási ponttal magyarázható, ugyanis mind a κ -karragén, mind a szentjánoskenyér-gumi 60-90 °C hőmérsékleten oldódik legjobban. Valamint a két poliszacharid között egy specifikus kölcsönhatás lép fel, amely megnöveli a gél szilárdságát (Dionísio és Grenha, 2012; Krasaekoopt és mtsai., 2003; Ta, 2021). Hő hatására a kapszulák egy összefüggő lemezt alkottak.

Pusztulási kinetika

A 17. táblázat tartalmazza a kapszulázott sejtekhez tartozó pusztulási sebességi együttható (k) és tizedelési idő (D) értékeit a 60 °C-os hőkezelés során. A pusztulási sebességi együttható és a tizedelési idő egymással fordítottan arányos.

A tizedelési idő értékéből arra a következtetésre jutunk, hogy a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő keverékbe kapszulázott sejtek túlélési hatékonysága volt a legnagyobb, míg a Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő esetében állt be a legnagyobb pusztulás a kiindulási sejtszámhoz képest.

17. táblázat: A *L. salivarius* sejtek pusztulási sebességi együtthatója (k) és tizedelési ideje (D) a 60 °C-os hőkezelés során

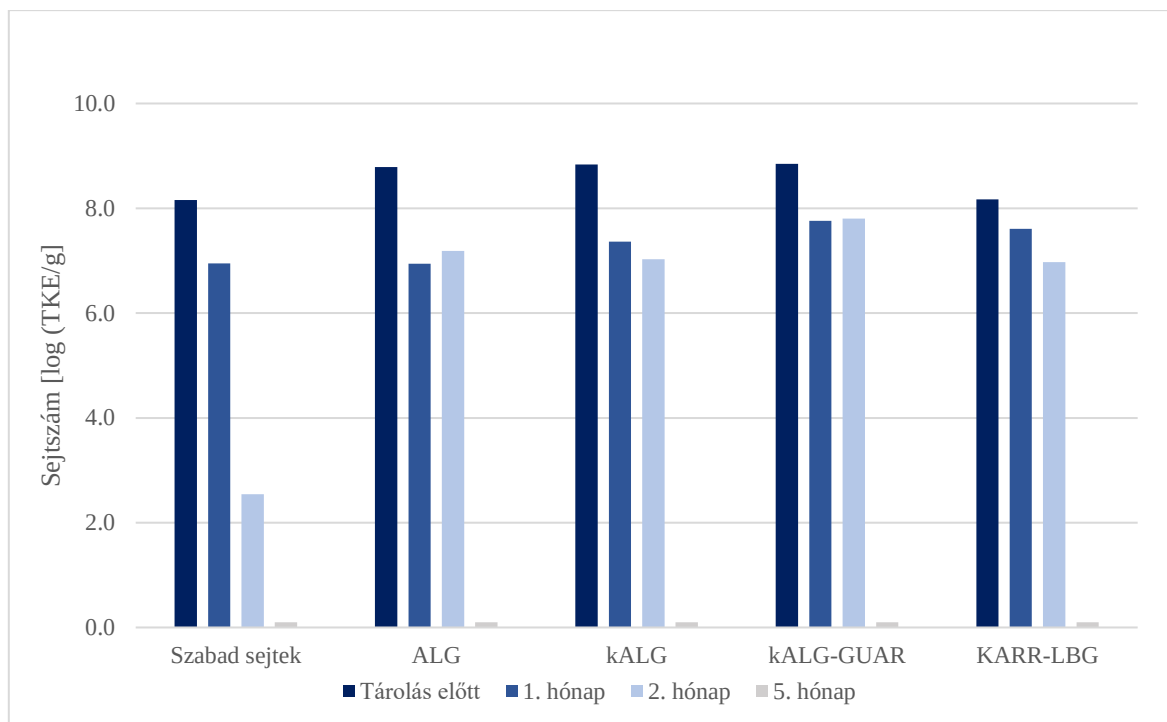
Jelölés	Kapszula alap	k ₆₀ (1/perc)	D ₆₀ (perc)
ALG	Na-alginát	0,55	4,22
kALG	Na-alginát – rezisztens keményítő	0,53	4,32
kALG-GUAR	Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő	0,59	3,83
KARR-LBG	κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő	0,31	7,46

5.4. Szilvalé fermentáció és tárolási vizsgálat eredményei

A tárolási kísérlet során vizsgálni kívántam, hogy élelmiszer-mátrixban a különböző prebiotikus kapszulázó anyagokkal bevont probiotikus mikroorganizmus túlélési aránya hogyan viszonyul a szabad sejtekhez képest. A vizsgálatot 5 hónapon át végeztem szobahőmérsékleten tárolt fermentált szilvalében.

A *Lactobacillus salivarius* HA-118 törzs szobahőmérsékleten történő szilvalében való tárolása során kapott eredményeket a 10-11. ábrán mutatom be. Az eredmények alapján elmondható, hogy a szabad sejtek esetében az 1. hónap után még nem történt jelentős mértékű csökkenés, azonban a 2. hónap végére a sejtszám lecsökkent $3,50 \times 10^2$ TKE/ml-re, valamint az 5. hónap végén egyetlen sejt sem élte túl a tárolás folyamatát.

A szobahőmérsékleten való tárolás során a 2. hónap végén vett minták alapján a mikrokapszulázás megfelelőnek módszernek bizonyult a probiotikus sejtek védelmére. Mind az első, mind a második hónap után a kapszulázott sejtek meghaladták az elvárt 10^6 - 10^7 TKE/g sejtszámot; a túlélési hatékonyság 78-87% közé esett. A legjobb arányt a Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő eleggyel kapszulázott sejtek mutatták, ahol a 2. hónap végén is $6,34 \times 10^7$ TKE/g volt a sejtszám (87%). Az 5. hónap végén vett minták esetén azonban egyetlen sejt sem volt kimutatható a sejtszámlálás során.

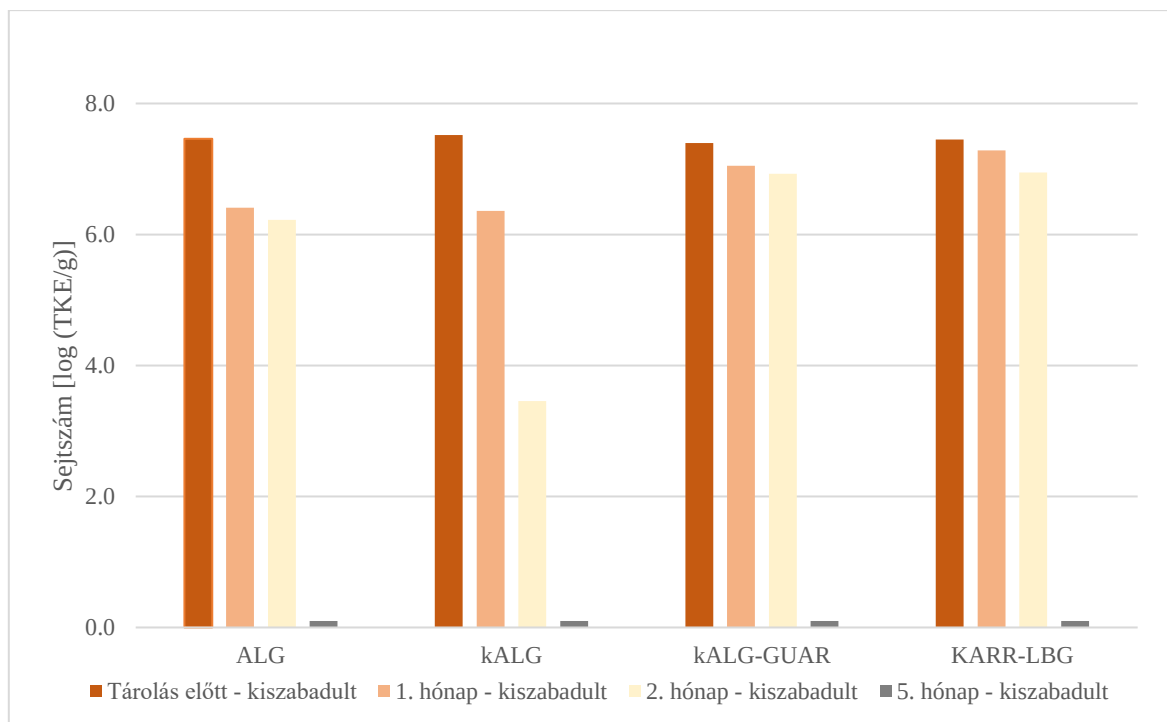


10. ábra: A *L. salivarius* sejtek túlélése az 5 hónapos szilvalében való tárolás során különböző kapszula anyagok alkalmazása mellett

(ALG: Na-alginát alapú gyöngyök; kALG: Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; kALG-GUAR: Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; KARR-LBG: κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

Ta (2021) korábbi kutatásai is azt mutatják, hogy az extrúziós technikával előállított kapszulákban a szobahőmérsékleten, gyümölcslemben való 5. hónap tárolást követően élő sejtszám nem volt kimutatható.

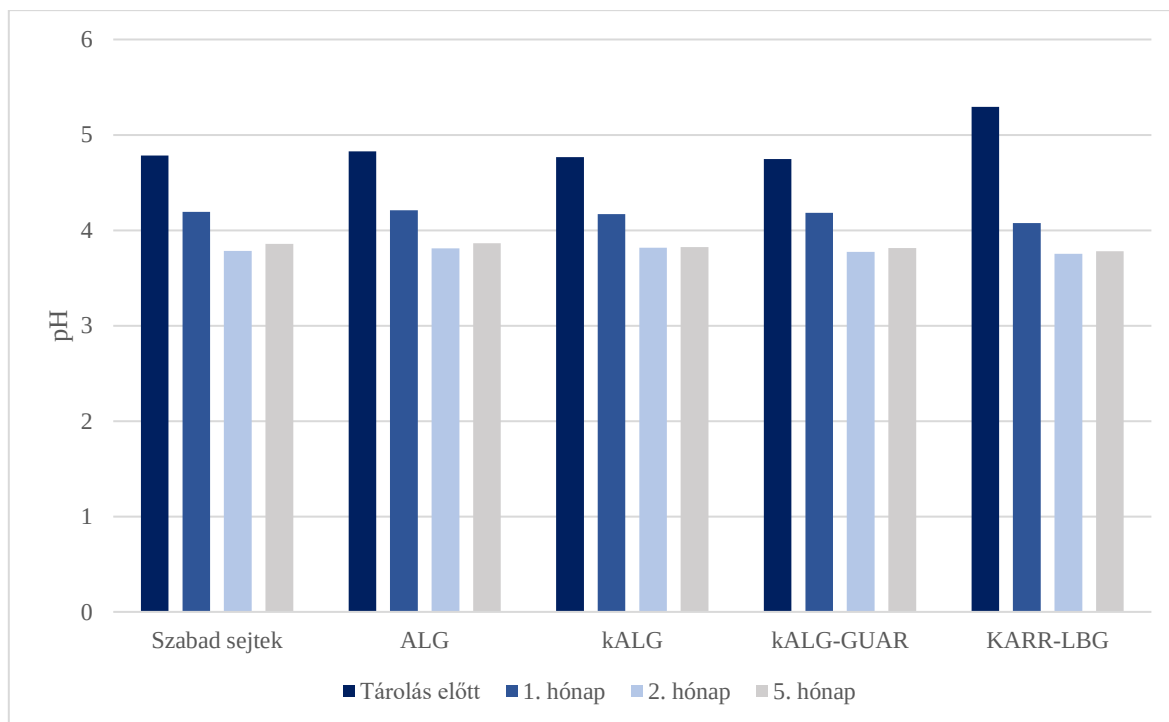
A tárolás folyamán a kapszulákból folyamatosan szabadultak ki a sejtek, azonban ezeknek a száma az idő előrehaladtával folyamatosan csökkent. Az Na-alginát – rezisztens keményítő anyagú kapszulák kivételével a kiszabadult sejtek a 2. hónap végén még elérték a 10^6 TKE/ml sejtszámot, azonban ahogy a kapszulázott sejtek, úgy a kapszulákból kiszabadult sejtek sem éltek túl a tárolást az 5. hónap végéig.



11. ábra: A *L. salivarius* kiszabadult sejtek túlélése az 5 hónapos szilvalében való tárolás során különböző kapszula anyagok alkalmazása mellett

(ALG: Na-alginát alapú gyöngyök; kALG: Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; kALG-GUAR: Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; KARR-LBG: κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

A tárolási vizsgálat alatti pH változást is figyelemmel kísértem. A 12. ábrán jól látható, hogy az idő előrehaladtával a pH értékek folyamatosan csökkentek. Általánosságban elmondható, hogy a 48 órás fermentációs pH-hoz viszonyítva mind a szabad sejtek, mind a kapszulázott sejtek esetében a szilvalevek pH-ja egy értékkel csökkent a 2. hónap után. A Na-alginát alapú gyöngyök tárolás előtti pH értéke 4,7 és 4,8 körül mozgott, míg a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő eleggyel kapszulázott sejtek 5,3 kezdeti pH értékkel rendelkeztek, valamint az 5. hónap végén vett minták pH-ja 3,8 körüli értékre csökkent.



12. ábra: Az 5 hónapos tárolási folyamat során mért pH értékek változása

(ALG: Na-alginát alapú gyöngyök; kALG: Na-alginát – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; kALG-GUAR: Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök; KARR-LBG: κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapú gyöngyök)

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A probiotikum tartalmú funkcionális élelmiszerek, azok igazolt jótékony hatásai miatt (pl: a bélmikrobióta egyensúlyának fenntartása, tápanyagok felszívódásának elősegítése, létfontosságú anyagcseretermékek előállítás) egyre inkább elterjedtebbé váltak. Fogyasztásuk olyan globális problémák ellen kínál megoldást, mint az elhízás, a cukorbetegség és egyéb gyulladásos folyamatok.

A probiotikus termékek esetén a pozitív hatásuk kifejtésének feltétele, hogy megőrizték életképességüket és a vastagbélben megtapadva elszaporodjanak. Ennek biztosítására megfelelő technológiai módszernek bizonyult a mikrokapszulázás, amely során a bevonóanyag védelmet nyújt a sejteknek a külső környezeti hatások ellen.

Az extrúziós mikrokapszulázást előszeretettel alkalmazzák a sejtek védelme érdekében. A munkám során a *Lactobacillus salivarius* HA-118 sejtek kapszulákba zárását végeztem extrúziós technikával és vizsgáltam a kapszulázott sejtek életképességét a szabad sejtekkel összehasonlítva. Valamint a különböző hidrokolloid oldatok hatékonyságát vizsgáltam emésztési-, hőkezelési- és tárolási vizsgálat során.

A kapszulázási hatékonyság vizsgálata során megállapítottam, hogy a Na-alginát gyöngyök esetén 92,87%-os, a Na-alginát – rezisztens keményítő esetén 95,41%-os, Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő esetén 92,02%-os, valamint κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő alapnál 89,70%-os volt a kapszulázási hatékonyság mértéke. Szakirodalmi adatokkal összehasonlítva hasonló eredményeket kaptam, a kapszulázás megfelelőnek bizonyult.

Továbbá tanulmányoztam a sejtek túlélőképességét gyomorsavat és epesavat modellező közegekben. Ennek eredményei azt mutatták, hogy a gyomorsavas kezelés során a Na-alginát alapú kapszulák hatékonyak bizonyultak (94-99%-os túlélési hatékonyság), míg a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő esetében a sejtek nem éltek túl a kezelést. Az epesavas kezelés során viszont a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő kapszulák érték el a legnagyobb túlélési hatékonyságot (97%) és a Na-alginát – rezisztens keményítő kapszulák esetén volt megfigyelhető a legkisebb hatékonyság, azonban még elérték az elvárt 10^6 TKE/g sejtszámot. Összeségében elmondható, hogy a legjobb ellenállóképessége a Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő kapszuláknak volt az emésztési vizsgálat

során. A guar gumi maximális viszkozitása pH 6-9 értékek között érhető el, a legalacsonyabb pedig 3,5 körüli értéken (Thombare és mtsai., 2016).

A *L. salivarius* sejtek hőtűrését vizsgáltam 60 °C-on 5, 10, 15 és 20 perces kezeléssel. Az eredmények alapján a Na-alginát gyöngyök nem biztosítottak megfelelő védelmet a sejteknek, 5 perces kezelés után 10^4 TKE/g értékre csökkent a sejtszám. A legjobb eredményt a κ -karragén – szentjánoskenyér-gumi – rezisztens keményítő kapszulák esetében lehetett elérni, ami a két makromolekula között fellépő specifikus kölcsönhatás következménye lehet, amely során a hőkezelés hatására a kapszulák még inkább összefüggő, rugalmas lemezt alkottak. Azonban a 20 perces kezelés után egyik kapszulaanyag sem biztosította a megfelelő sejtmennyiséget, a *Lactobacillus* sejtek esetében a 60 °C-os hőkezelés extrém körülménynek bizonyult.

Végül a kapszulázott probiotikumok eltarthatóságát vizsgáltam szobahőmérsékleten történő fermentált szilvalében történő tárolás során. A különböző kapszulák esetében a 2. hónap végén a túlélési hatékonyság 78-87%-ot mutatott; a legjobb kapszulázóanyagnak a Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő bizonyult. A tárolás során folyamatosan szabadultak ki a sejtek a kapszulákból, ezek a Na-alginát – rezisztens keményítő anyagú kapszulák kivételével a 2. hónap végén szintén elérték az elvárt 10^6 TKE/g értéket. Azonban az 5. hónap végén vett minták esetében sem a kapszulákba zárt, sem a kiszabadult sejtek esetén egyetlen élő sejt sem volt megfigyelhető.

A különböző kísérletek esetén különböző kapszulázóanyagok nyújtottak kiemelkedően jó eredményeket, azonban összességében elmondható, hogy a hőkezelési kísérlet kivételével a Na-alginát – guar gumi – rezisztens keményítő elegy bizonyult a legmegfelelőbbnek a *Lactobacillus salivarius* sejtek védelme érdekében.

Jövőbeli kutatásokra ad lehetőséget újabb kapszulázóanyagok keresése, kombinációjuk a jobb túlélési hatás elérése érdekében. A probiotikumok életképességének megőrzése mellett fontos a megfelelő kapszulaméret meghatározása, amely az ételkészítés érzékszervi tulajdonságokat nem befolyásolja. További kísérletek folyhatnak, hogy a fermentált gyümölcsleiben való tárolás során, miért pusztulnak el a sejtek az 5. hónap után, illetve hogyan lehetne a kiszabadult sejtek mennyiségét csökkenteni. Valamint jövőbeli kutatási terület lehet a mikrokapszulázott probiotikus sejtek hűtve tárolása, ami potenciálisan növelheti a sejtek túlélésének arányát.

7. IRODALMI HIVATKOZÁS

1. Albert, M. J., Mathan, V. I., & Baker, S. J. (1980). Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature*, 283(5749), 781–782. <https://doi.org/10.1038/283781A0>
2. Ameeta, S., Thompson, D. K., Kumar, M. H., & Latha, S. (2013). Prebiotics in microencapsulating matrix enhance the viability of probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA1. *International Journal of Fermented Foods*, 2(1), 33–45.
3. Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2007.01.004>
4. Aoun, A., Darwish, F., & Hamod, N. (2020). The Influence of the Gut Microbiome on Obesity in Adults and the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Weight Loss. *Preventive Nutrition and Food Science*, 25(2), 113. <https://doi.org/10.3746/PNF.2020.25.2.113>
5. Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J., & Abu-Farha, M. (2016). The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in Health and Disease* 2016 15:1, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12944-016-0278-4>
6. Berkland, C., Kipper, M. J., Narasimhan, B., Kim, K., & Pack, D. W. (2004). Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. *Journal of Controlled Release*, 94(1), 129–141. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2003.09.011>
7. Bodnár, A. (2019). Probiotikumok mikrokapszulázása emulziós technológiával és életképességük vizsgálata élelmiszer-mátrixokban. Szent István Egyetem, Budapest.
8. Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease. *Nutrients*, 4(8), 1095. <https://doi.org/10.3390/NU4081095>
9. Bruchet, M., & Melman, A. (2015). Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. *Carbohydrate Polymers*, 131, 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.05.021>
10. Candelli, M., Franza, L., Pignataro, G., Ojetti, V., Covino, M., Piccioni, A., Gasbarrini, A., & Franceschi, F. (2021). Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 22. <https://doi.org/10.3390/IJMS22126242>

11. Carmody, R. N., & Turnbaugh, P. J. (2012). Gut Microbes Make for Fattier Fish. *Cell Host & Microbe*, 12(3), 259–261. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.08.006>
12. Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
13. Chronakis, I. S., Borgström, J., & Piculell, L. (1999). Conformation and association of κ -carrageenan in the presence of locust bean gum in mixed NaI/CsI solutions from rheology and cryo-TEM. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(4), 317–328. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00050-1)
14. Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. v. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.06.003>
15. Cunningham, A. L., Stephens, J. W., & Harris, D. A. (2021). Gut microbiota influence in type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Gut Pathogens* 2021, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13099-021-00446-0>
16. Davis, C. D. (2016). The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutrition Today*, 51(4), 167. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000167>
17. de la Cruz Pech-Canul, A., Ortega, D., García-Triana, A., González-Silva, N., & Solís-Oviedo, R. L. (2020). A Brief Review of Edible Coating Materials for the Microencapsulation of Probiotics. *Coatings* 2020, 10(3), 197. <https://doi.org/10.3390/COATINGS10030197>
18. Dionísio, M., & Grenha, A. (2012). Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4(3), 175. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.99013>
19. Ecsedy, A. L. (2019). Különböző kapszulázási technikák alkalmazása *Bifidobacterium lactis* Bb-12 sejtek rögzítésére. Szent István Egyetem, Budapest.
20. Fernandez, E. M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I. G., & Grangette, C. (2011). Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 60(8), 1050–1059. <https://doi.org/10.1136/GUT.2010.232918>
21. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1989.TB05105.X>

22. Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 365–371. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.01.064>
23. Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A. G., Kim, N., de Paula, J. A., Ramakrishna, B., Shanhan, F., Szajewska, H., Thomson, A., & le Mair, A. (2017). Probiotics and prebiotics.
24. Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1177/1756283X12459294>
25. Ismail, N. A., Ragab, S. H., ElBaky, A. A., Shoeib, A. R. S., Alhosary, Y., & Fekry, D. (2011). Frequency of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Archives of Medical Science : AMS*, 7(3), 501. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2011.23418>
26. Iyer, C., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2005). Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in ex vivo porcine gastrointestinal contents. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 493–497. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2005.01778.X>
27. Joint FAO/WHO Working Group. (2002). Guidelines for evaluation of probiotics in food. Joint Food and Agriculture Organization and World Health Organization.
28. Kang, M. S., Lim, H. S., Oh, J. S., Lim, Y. J., Wuertz-Kozak, K., Harro, J. M., Shirtliff, M. E., & Achermann, Y. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease*, 75(2). <https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTX009>
29. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
30. Kumar, H., Lund, R., Laiho, A., Lundelin, K., Ley, R. E., Isolauri, E., & Salminen, S. (2014). Gut microbiota as an epigenetic regulator: pilot study based on whole-genome methylation analysis. *MBio*, 5(6). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02113-14>
31. Lee, H. R., Jung, S. M., Yoon, S., Yoon, W. H., Park, T. H., Kim, S., Shin, H. W., Hwang, D. S., & Jung, S. (2019). Immobilization of planktonic algal spores by inkjet printing. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48776-z>

32. Li, W.-Z., Stirling, K., Yang, J.-J., & Zhang, L. (2020). Gut microbiota and diabetes: From correlation to causality and mechanism. *World Journal of Diabetes*, 11(7), 293. <https://doi.org/10.4239/WJD.V11.I7.293>
33. Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The *Firmicutes/Bacteroidetes* Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/NU12051474>
34. Mandal, S., Hati, S., Puniya, A. K., Khamrui, K., & Singh, K. (2014). Enhancement of survival of alginate-encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(10), 1994–2001. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6514>
35. Min, A. D. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81(4), S1–S27. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
36. Mishra, C., & Lambert, J. (1996). Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asian Pacific J Clin Nutr*, 5, 20–24.
37. Misra, S., Pandey, P., Dalbhagat, C. G., & Mishra, H. N. (2021). Emerging Technologies and Coating Materials for Improved Probiotication in Food Products: a Review. *Food and Bioprocess Technology* 2021 15:5, 15(5), 998–1039. <https://doi.org/10.1007/S11947-021-02753-5>
38. Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/716861>
39. Monteiro, S. S., da Silva, W. P., Monteiro, S. S., Gomes, J. P., Pereira, E. M., Queiroz, A. J. de M., de Figueirêdo, R. M. F., Rocha, A. P. T., Silva, H. A., de Almeida, L. R. B., de Sena, M. R. S., & de Lima, A. G. B. (2021). Optimization of the Effects of Different Temperatures and Compositions of Filmogenic Solution on *Lactobacillus salivarius* Using Predictive Mathematical Models. *Foods*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/FOODS10010025>
40. Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z., & Dominguez-Bello, M. G. (2015). The infant microbiome development: mom matters. *Trends in Molecular Medicine*, 21(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2014.12.002>
41. Mulvihill, B. (2004). HUMAN NUTRITION | Micronutrients in Meat. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 618–623. <https://doi.org/10.1016/B0-12-464970-X/00236-1>

42. Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), M20–M24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12395.x>
43. Nilegaonkar, S., & Agte, V. V. (2010). Prebiotics. In *Comprehensive Food Fermentation Biotechnology* (o. 466–487). Asiatech Publishers. https://www.researchgate.net/publication/271833861_Prebiotics
44. Patangia, D. v., Anthony Ryan, C., Dempsey, E., Paul Ross, R., & Stanton, C. (2022). Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/MBO3.1260>
45. Perlmutter, D. (2017). Agyépítők (Z. Varga & Szalai Lilla, Szerk.). Kossuth Kiadó.
46. Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes and Nutrition*, 6(3), 285–306. <https://doi.org/10.1007/S12263-010-0206-6/TABLES/7>
47. Riseh, R. S., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Pour, M. M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20). <https://doi.org/10.3390/IJMS222011165>
48. Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. <https://doi.org/10.1079/BJN2002677>
49. Salguero, M., Al-Obaide, M. A. I., Singh, R., Siepmann, T., & Vasylyeva, T. L. (2019). Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(5), 3461. <https://doi.org/10.3892/ETM.2019.7943>
50. Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L. A., Veiga, O., Redondo-Figuero, C., Garagorri, J. M., Azcona, C., Delgado, M., García-Fuentes, M., Collado, M. C., & Sanz, Y. (2009). Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity*, 17(10), 1906–1915. <https://doi.org/10.1038/OBY.2009.112>
51. Semova, I., Carten, J. D., Stombaugh, J., MacKey, L. C., Knight, R., Farber, S. A., & Rawls, J. F. (2012). Microbiota Regulate Intestinal Absorption and Metabolism of Fatty Acids in the Zebrafish. *Cell Host & Microbe*, 12(3), 277–288. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.08.003>

52. Setijawati, D., Nursyam, H., & Salis, H. (2018). Carrageenan :the difference between PNG and KCL gel precipitation method as *Lactobacillus acidophilus* encapsulation material. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1), 012073. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/137/1/012073>
53. Shori, A. B. (2017). Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.HJB.2016.12.008>
54. Simpson, H. L., & Campbell, B. J. (2015). Review article: dietary fibre–microbiota interactions. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42(2), 158–179. <https://doi.org/10.1111/APT.13248>
55. Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2014). Starving our Microbial Self: The Deleterious Consequences of a Diet Deficient in Microbiota-Accessible Carbohydrates. *Cell Metabolism*, 20(5), 779–786. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.07.003>
56. Stuivenberg, G. A., Burton, J. P., Bron, P. A., & Reid, G. (2022). Why Are *Bifidobacteria* Important for Infants? *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020278>
57. Sullivan, B. (2021). Bemutatlak önmagadnak (N. Vágó & K. Molnár, Szerk.). Scolar Kiadó.
58. Ta, L. P. (2021). Evaluation of different microencapsulation techniques for improving the functional effectiveness of probiotic-containing foods. Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Budapest.
59. Ta, L. P., Bujna, E., Antal, O., Ladányi, M., Juhász, R., Szécsi, A., Kun, S., Sudheer, S., Gupta, V. K., & Nguyen, Q. D. (2021). Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1136–1144. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.04.170>
60. Tee, W. F., Nazaruddin, R., Tan, Y. N., & Ayob, M. K. (2013). Effects of encapsulation on the viability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* exposed to high acidity condition and presence of bile salts. <https://doi.org/10.1177/1082013213488775>
61. Thombare, N., Jha, U., Mishra, S., & Siddiqui, M. Z. (2016). Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 361–372. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.04.001>

62. Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*, 1(6). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3000322/SUPPL_FILE/3000322_TABLE_S_S1_S16.ZIP
63. Váli, B. E. (2016, április 14). Probiotikum és prebiotikum. <https://orvosilexikon.hu/cikkek/probiotikum-es-prebiotikum-egy-betu-kulonbseg>
64. von Freiesleben, P., Moroz, O., Blagova, E., Wiemann, M., Spodsberg, N., Agger, J. W., Davies, G. J., Wilson, K. S., Stålbrand, H., Meyer, A. S., & Krogh, K. B. R. M. (2019). Crystal structure and substrate interactions of an unusual fungal non-CBM carrying GH26 endo- β -mannanase from *Yunnania penicillata*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-38602-X>
65. Walker, A. W., Sanderson, J. D., Churcher, C., Parkes, G. C., Hudspith, B. N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., & Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiology*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-7/TABLES/2>
66. Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., Mao, Y., Zhang, X., Pang, X., Wei, C., Zhao, G., Chen, Y., & Zhao, L. (2009). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME Journal* 2010 4:2, 4(2), 232–241. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>
67. Zhang, N., Ju, Z., & Zuo, T. (2018). Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. *Nutrition*, 51–52, 80–85. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2017.12.005>
68. Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(19), 8135–8143. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9217-9/TABLES/1>
69. Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research* 2020 30:6, 30(6), 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

70. Internet 1: Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) SEAR/PR/1574 (2014 április 30.) WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health.
<https://www.who.int/southeastasia/news/detail/30-04-2014-who-s-first-global-report-on-antibiotic-resistance-reveals-serious-worldwide-threat-to-public-health>
71. Internet 2: Európai Bizottság IP/05/1687 (2005 december 22.) Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect.
https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/hu/IP_05_1687

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Szécsi Anettnek és Dr. Bujna Erikának a munkám során nyújtott segítségükért; kiemelkedő szakmai tudásukkal és hasznos tanácsaikkal nagyban hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez. Továbbá köszönöm a Tanszék minden dolgozójának, akihez felmerülő kérdéseimmel szintén nyugodtan fordulhattam.