

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

PÁPAI GRÉTA

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
KAPOSVÁRI CAMPUS

2021

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

KAPOSVÁRI CAMPUS

Élettani és Takarmányozástani Intézet

A doktori iskola vezetője:

Prof. Dr. SZABÓ ANDRÁS

MTA doktora

Témavezető:

VARGÁNÉ Dr. VISI ÉVA

PhD

PRO- ÉS PREBIOTIKUMOT TARTALMAZÓ SAVÓ
ALAPÚ, FERMENTÁLT TEJTERMÉKEK ÉLETTANI
HATÁSÁNAK ÉS A KÉSZTERMÉK FOGYASZTÓI
MEGFELELŐSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

DOI: 10.54598/000580

Készítette:

PÁPAI GRÉTA

KAPOSVÁR

2021

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1 Funkcionális élelmiszerek	10
2.1.1 A funkcionális élelmiszerek eredete	10
2.1.2 A funkcionális élelmiszerek megjelenési formái	10
2.1.3 A funkcionális élelmiszerek vásárlói köre	15
2.1.4 A joghurt	16
2.1 A felhasznált alapanyagokról	17
2.1.1 A savó.....	17
2.1.2 A tej.....	19
2.2 Prebiotikumok	21
2.2.1 Az oligoszacharidok felhasználási módjai	23
2.2.2 A prebiotikumok kedvező élettani hatásai	24
2.3 Élelmi rostok.....	26
2.3.1 Rostok meghatározása.....	26
2.3.2 A rostok kedvező élettani hatása	29
2.4 A rövid szénláncú zsírsavak keletkezése és humán élettani szerepük.....	30
2.5 Probiotikumok	33
2.6 A bél mikrobióta változása az életünk során	39
2.6.1 A születés módjának hatása a kialakuló mikrobiótára	39
2.6.2 Az anyatej hatása a mikrobiom alakulására	41
2.6.3 Különbőség anyatejjel és tápszerrel táplált csecsemők mikrobiótájában.....	42

2.6.4	A felnőttek és az idősek mikrobiótája	45
2.7	A GALT.....	49
2.7.1	A GALT védelmi vonalai.....	50
2.7.2	A GALT működése	52
2.8	A bél mikrobióta megváltozásával összefüggő betegségek	54
2.8.1	Gluténérzékenység	54
2.8.2	Gyulladásos bélbetegségek	56
2.8.3	Tejfehérje allergia	57
2.8.4	Diszbiózis	58
2.8.5	Bakteriális transzlokáció	59
2.9	A humán emésztőrendszer <i>in vitro</i> modellezése	60
2.9.1	Emésztési modellek.....	62
2.9.2	A bél epithelium <i>in vitro</i> modellezése.....	65
3.	A disszertáció célkitűzései	68
4.	Anyagok és módszerek.....	70
4.1	A vizsgált termékek előállítása, gyártása	70
4.2	Technológiai vizsgálatok.....	73
4.2.1	Mikrobiológiai vizsgálatok	73
4.2.2	Érzékszervi bírálat.....	73
4.2.3	A pH mérése, műszeres színmérés, és az alvadék szilárdságának vizsgálata	74
4.2.4	A kémiai összetétel meghatározása.....	75
4.3	Szimulált humán emésztés vizsgálat	76
4.3.1	Patogén gátlás vizsgálata.....	78
4.3.2	A szimulált humán emésztési vizsgálat során a csíraszám meghatározáshoz használt táptalajok	79
4.4	<i>In vitro</i> vizsgálatok.....	82

4.4.1	Intesztinális sejtvonalak (HT-29 és Caco-2) szaporítása és fenntartása	82
4.4.2	Baktériumok koinkubációja HT-29 sejtvonalban	83
4.4.3	TNF- α által indukált immunmodulációs vizsgálat HT-29 sejtvonalban.....	84
4.4.4	Adhéziós vizsgálat HT-29 és Caco-2 sejtvonalban.....	84
4.4.5	Adhéziós vizsgálat mucinnal.....	85
4.4.6	Hidrofobicitás vizsgálat.....	86
4.5	<i>In vivo</i> vizsgálatok, állatkísérlet	87
4.5.1	A bél makroszkópikus vizsgálata.....	89
4.5.2	<i>In vivo</i> bél permeabilitás vizsgálat	89
4.5.3	MPO aktivitás vizsgálat	90
4.6	Statisztikai elemzés.....	90
5.	Eredmények és értékelésük	92
5.1	Technológiai vizsgálatok eredményei	92
5.1.1	Probiotikus csíraszám alakulása a tárolás folyamán	92
5.1.2	A kísérleti termékek pH változása a tárolás során	98
5.1.3	A termékek színének változása a tárolás folyamán.....	101
5.1.4	Alvadék szilárdság vizsgálata a tárolás folyamán.....	104
5.1.5	Beltartalmi vizsgálat.....	105
5.1.6	Humán érzékszervi vizsgálat.....	109
5.2	Szimulált humán emésztési vizsgálat eredményei.....	114
5.2.1	<i>In vitro</i> Infogest emésztés	114
5.2.2	Patogén gátlás.....	123
5.3	<i>In vitro</i> vizsgálatok eredményei	126
5.3.1	Hidrofóbicitás és elektronakceptor képesség vizsgálata ..	126
5.3.2	Adhéziós vizsgálat.....	129

5.3.3	Immunválasz vizsgálat	134
5.4	<i>In vivo</i> vizsgálatok eredményei	140
6.	Következtetések és javaslatok	148
7.	Új tudományos eredmények	151
8.	Összefoglalás	153
	Summary	160
9.	Köszönetnyilvánítás	166
10.	Irodalomjegyzék	167
11.	A disszertáció témaköréből megjelent publikációk	184
12.	A disszertáció témakörén kívüli publikációk	186
13.	Rövid szakmai önéletrajz	187

Rövidítések jegyzéke:

AMP = (antimicrobial peptides) antimikrobiális peptidok

ATCC = (American Type Culture Collection) amerikai típusú sejt kultúra gyűjtemény

BALT = (bronchus associated lymphoid tissue) tüdőhöz kapcsolt limfoid szövet

DNBS = (dinitrobenzene sulfonic acid) dinitrobenzol szulfonsav

DP = (depolimerisation) polimerizációs fok

ECACC = (European Collection of Authenticated Cell Cultures)

hitelesített sejtenyészetek európai gyűjteménye

EFSA = (European Food Safety Authority) Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság

FDA = (Food and Drug Administration) az USA Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyezési Hivatala

FOS = (fructooligosaccharide) frukto oligoszacharid

FOSHU = (food for specified health use) különleges egészségügyi célú élelmiszer

GALT = (gut associated lymphoid tissue) bélhez kapcsolt limfoid szövet

GIT = (gastrointestinal tract) emésztőrendszer

GOS = (galactooligosaccharide) galakto oligoszacharid

GRAS = (generally recognized as safe) elismerten biztonságos

HMWDF = (high molecular weight dietary fiber) magas molekulásúlyú diétás rost

IBD = (inflammatory bowel disease) krónikus gyulladós bélbetegség

IBS = (irritable bowel syndrome) irritábilis bél szindróma

IEL = (intra epithelial lymphocita) intra epithelialis limfociták

IES = (irritable eye syndrome) irritábilis szem szindróma

Ig = (immunoglobulin) immunglobulin

IL = (interleukin) interleukin

IMS = (irritable mind syndrome) irritábilis elme szindróma

LMWDF = (low molecular weight dietary fiber) alacsony molekulásúlyú diétás rost

MATS = (microbial adhesion to solvents) mikróbák oldószeres adhéziója

MODS = (multiple organ dysfunction syndrome) több szervi működészavar

MOF = (multiple organ failure) több szervi elégtelenség

PAMP = (pathogen associated molecular pattern) patogén asszociált molekuláris mintázat

PBS = (phosphate buffered saline) foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat

PRR = (pattern recognition receptor) mintázatfelismerő receptor

RONS = (reactive oxygen, -nitrogene species) reaktív oxigén és nitrogén fajták

SCFA = (short chain fatty acid) rövid szénláncú zsírsav

SIRS = (systemic inflammatory response syndrome) szisztémás gyulladási válasz szindróma

Th = (T-helper) T-limfociták szubpopulációja

TLR = (toll-like receptor) toll-like receptor

TNF- α = (tumour necrosis factor alpha) tumor nekrozis faktor alfa

1. Bevezetés

„A bélflóra a földi életet általánosan jellemző ellentétpár igazi klasszikus példája. A vastagbél a legnagyobb harci terepe a jó és a rossz mikroorganizmusok szüntelenül folyó harcának.”

/Szakály Sándor/

A 20. század utolsó két évtizedében kezdtek behatóbban foglalkozni az Ilja Iljics Mecsnyikov által tett megállapítással, miszerint a bél mikrobióta jelenlétének hatása és az egészség között szoros összefüggés tapasztalható. Egy egészséges emberi bélsatornában, normál körülmények között 200-500 baktériumfaj található meg, illetve a külvilággal érintkező szerveken szintén nagy számban vannak jelen. Ezen jótékony baktériumok a szervezettel szimbiózisban, egy biológiai komplexet alkotnak (mikrobiom), ennél fogva tehát nem elhanyagolható, milyen törzsek, fajok alkotják, és mekkora számban vannak jelen életünkben. Valójában milyen hatásuk van az egészségünkre, hogyan befolyásolják mindennapi közérzetünket és milyen módon járulnak hozzá a jobb életminőség eléréséhez?

Sajnos napjainkban számos tényező veszélyezteti a bél kedvező mikrobiológiai összetételét, mint például a kevés bioaktív anyag fogyasztása, különböző stresszorok, fertőzések, antibiotikumok gyakori alkalmazása, stb. Az egyik kritikus időszak az anyatejes táplálásról a vegyes táplálkozásra történő áttérés. A kedvezőtlen életvitel kialakulása miatt a gyerekek és a felnőttek is veszélyeztetettek. A mai modern, rohanó életvitelt folytató, a természettől eltávolodott ember, a funkcionális termékek fogyasztásával sokat tehet az egészsége

megőrzéséért. A funkcionális termékek egyik fontos csoportját alkotják a pre- és a probiotikus élelmiszerek. A probiotikumok számos élettanilag kedvező hatással rendelkeznek, mint a patogének elleni védekezés elősegítése, előnyös immunmodulációs hatás, rövid szénláncú zsírsavak termelése, vitaminszintetizálás, laktóz lebontása, kedvező hatás a bélbetegségek enyhítésére, allergiás reakciók mérséklése, rák elleni védő hatás, vér lipid profiljának javítása, koleszterinszint csökkentés. A prebiotikumok fogyasztása hasonló élettani előnyökkel jár, mintegy kiegészítik, elősegítik ezen, kedvező hatások létrejöttét. Mindezen hatások mellett javítják a Ca és a Mg hasznosulását is és így hozzájárulhatnak a csontritkulás megelőzéséhez.

Napjainkban a tudatos vásárlók előnyben részesítik azokat az élelmiszeripari termékeket, amelyek elősegítik az egészség megőrzését és helyreállítását. A különböző élőflórás, fermentált tejtermékek az egyik legelterjedtebb képviselői ezeknek a készítményeknek. Az élőflóra emberi szervezetre gyakorolt kedvező hatása azonban nem minden esetben biztosított. A táplálékkal bevitt, jótékony baktériumoknak túl kell élniük az emésztő rendszer felső szakaszán való áthaladást, meg kell tapadniuk a bélfalon, és ki kell fejteniük az egészségre gyakorolt pozitív hatásaikat. Ezek a tulajdonságok *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerek segítségével egzaktul mérhetőek. További fontos szempont a tejtermékek előállításánál az élelmiszerbiztonság és a gazdaságosság. Az előállítás költségeit tejipari melléktermékek felhasználásával tarthatjuk alacsony szinten, mindemellett a környezeti terhelést is csökkenteni tudjuk a magas biológiai értékkel rendelkező hasznos alapanyag közvetlen, keletkezési helyén történő felhasználásával.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 *Funkcionális élelmiszerek*

2.1.1 A funkcionális élelmiszerek eredete

A funkcionális élelmiszerek alap gondolata a Távol-Keletről származik, ahol azt a szemléletet vallják, hogy az elfogyasztott táplálék egyben a gyógyszer szerepét is betöltheti. A keleti kultúra életmódja és étrendje magában hordozza az egészség megőrzését és a gyógyítást, ennek egyik példája a Nagy Kínai Gyógyszerkönyv a „Shinongbonchokyung”, melyben a betegségekre különböző állati, növényi és ásványi táplálékot javasolnak gyógyírként. Nem véletlen tehát az sem, hogy ez a felfogás továbbra is fennmaradt és napjainkban Kínában érik el a legmagasabb életkort (Hue & Kim, 1997). A Kárpát-medencében, a hagyományos magyar népi gyógyászat is előszeretettel alkalmazta a bioaktív komponenseket tartalmazó növényeket humán célokra és a háziállatok gyógyítására (Babulka, 1998). Megszívvelve őseink tapasztalati tudását, napjainkban újra beépítjük étrendünkbe az élettanilag aktív komponenseket tartalmazó élelmiszereket. Az elmúlt 30-40 évben a nyugati országokban is elterjedtek az egészségtudatos, funkcionális élelmiszerek, minden nemzet megpróbálta a saját hagyományaihoz, kultúrájához és étkezési szokásaihoz igazítani a termékek színes skáláját (Kwak & Jukes, 2001).

2.1.2 A funkcionális élelmiszerek megjelenési formái

A funkcionális élelmiszer a táplálkozás általi energia biztosításán túlmenően (elsődleges funkció) és a megfelelő, a fogyasztó által elvárt

érzékszervi tulajdonságain (másodlagos funkció) túl, egy vagy több olyan hatással rendelkezik, melyek hozzájárulnak egészségünk megőrzéséhez, helyreállításához (harmadlagos funkció). Az első két funkcióval a hagyományos élelmiszeripari termékek is rendelkeznek, tehát a funkcionális élelmiszer külső megjelenésében semmiben sem különbözik attól, ezért az úgymond láthatatlan harmadlagos funkciót a fogyasztó felé a terméken kommunikálni kell (nutrimarketing). Ezen élelmiszerek a normál étrend részét képezik, emellett valamilyen többlet funkció betöltésével hatást gyakorolhatnak egyes élettani folyamatokra, ez által fogyasztójukat egészségügyi előnyökhöz juttathatják (German és mtsai., 1999). Szerepük lehet egyes betegségek megelőzésében (omega-3 zsírsavak – koleszterinszint, gyulladásos folyamatok csökkentése), elősegíthetik a már kialakult betegségből való felgyógyulást (kolin – Alzheimer-kór), erősíthetik a védekező mechanizmust (fermentált tejtermékek – immunrendszer stimulálása), befolyásolhatják a fizikai-szellemi teljesítőképességet (taurin), lassíthatják az öregedési folyamatokat (koenzim Q10 – antioxidáns hatás) (Vass és mtsai., 2008). A funkcionális élelmiszerekkel szemben támasztott követelmények alapján bizonyítottan javítaniuk kell az egészségre kifejtett kedvező hatást. Táplálkozási hasznosságuknak a szokásos napi beviteli mennyiség elfogyasztása esetén, a késztermék szintjén ki kell fejeződnie. A fentebb felsoroltakat tudományosan igazolni kell tudni, továbbá a funkcionális összetevőknek számszerűsíthetőnek kell lennie és garantálni kell a biztonságot, valamint a természetes eredetet. A pozitív táplálkozási élettani hatásokon kívül egyéb kedvező hatást is gyakorolnak a szervezetre, mégpedig növelik a szubjektív egészségérzetet, javítják a

közérzetet és az életminőséget, valamint csökkentik bizonyos betegségek kialakulásának valószínűségét (Csiki, 2012).

A funkcionális élelmiszerek önmagukban nem alkalmasak a gyógyhatás kiváltására, gyógyhatás csak gyógyszertől, illetve gyógyszernek nem minősülő gyógyhatású készítményektől várható (Csiki, 2008). Azonban hozzájárulnak a kedvező egészségi állapot kialakításához, tulajdonképpen egy képzeletbeli határvonalat képeznek a gyógyszer és az élelmiszer között. Az érdeklődés a termékek iránt fokozódik, ezért egyre szélesebb termékskálából választhatunk: hústermékek, fermentált tejtermékek, gabonaalapú termékek, bébiételek, tápszerek, sport- és energiatalok és édességek (Gibson & Williams, 2000). Az élelmiszer funkcionálissá tételének lehetséges módjai a következőek lehetnek. Eltávolíthatóak belőle olyan anyagok, melyek a termék természetes mivoltában jelen vannak, azonban a fogyasztókra vagy azok bizonyos csoportjára károsak, ide tartoznak például azok a termékek, melyeket a potenciálisan allergén fehérjék, vagy a laktóz eltávolításával állítanak elő. A funkcionális élelmiszerek előállításának másik módja az egészségügyileg kedvező hatású komponensek mennyiségének növelése, dúsítása. A termékben eredendően jelen lévő előnyös hatású komponensek, például nyomelemek, vitaminok, ballasztanyagok, szintjük ésszerű mértékű növelését követően fokozottan fejthetik ki hatásukat. Ezen kívül új komponenseket, például pre- és probiotikumokat is hozzáadhatunk, melyek eredetileg nincsenek jelen a termékben, de az adott élelmiszerhez hozzáadva, megnövelik annak egészségre gyakorolt jótékony hatását. További mód az élelmiszer funkcionálissá tételéhez egyes szükségtelenül nagy mennyiségben jelen lévő komponensek arányának csökkentése, például fogyókúra céllal készített alacsony szénhidrát- vagy zsírtartalmú

termékek előállítása (Roberfroid, 1999). A funkcionális élelmiszerekben szerepet játszó összetevők, csoportosításának példái az 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat A funkcionális élelmiszerek összetevők szerinti csoportosítása és azok egészségügyi előnyeik (Holm, 2003 nyomán)

Funkcionális élelmiszer összetevője	Példa	Egészségügyi hatás
Probiotikumok	Tejsavbaktériumok, bifidobaktériumok	Patogének elleni védekezés, immunmodulációs hatás, rövid szénláncú zsírsavak termelése (SCFA), vitamin termelés, laktóz bontás, kedvező hatás a bélbetegségekre, allergiákkal szembeni kedvező hatás, rák ellenes hatás, vér lipidprofiljának javítása, koleszterinszint csökkentés
Prebiotikumok	Oligoszacharidok, rezisztens keményítők, pektinek	A probiotikumokkal megegyező egészségügyi hatás, valamint a Ca és Mg jobb hasznosulása, ezzel a csontritkulás megelőzése
Vitaminok	Folsav, B6, B12	Várandósság idején (embrió gerinc záródás)
Ásványi anyagok	Ca, Mg, Zn	Csontritkulás megelőzése, sejtmembrán integritásának fenntartása, anyagcserefolyamatok
Antioxidánsok	E-vitamin, C-vitamin, karotinoidek, flavonoidok, polifenolok	Reakcióképes szabad gyökök hatástalanítása (lebontási folyamatok)
Fehérjék, aminosavak	Tripeptidek a tejfehérjéből	Regeneráció, növekedés, izomszövet fejlődése
Zsírsavak	Omega-3, CLA (konjugált linolsav), GLA (gamma-linolsav)	Rákellenes hatás, plazma-lipid szintjének csökkentése, vércukorszint csökkentés
Fitokemikáliák	Fitoszterinek, béta-glükán, izoflavonok, lignánok	Antioxidánsok, hormonszerű hatás

2.1.3 A funkcionális élelmiszerek vásárlói köre

Az egészségtámogató termékek vásárlói közé tartoznak a kezelésre szoruló, már kialakult krónikus betegséggel rendelkezők, illetve egy köztes átmenetet képező réteg, akik ugyan nem vesznek igénybe gyógyszeres kezelést, ők az úgynevezett „fél-egészség” állapotában vannak, és időszakonként megjelenő tünetekkel is rendelkeznek, ilyen például a puffadás, gyomor diszkomfort érzés, bél irritáció, fáradtság, levertség (Kwak & Jukes, 2001). A harmadik vásárlói kör a preventívek csoportja, ők az egyre növekvő számú, egészségtudatos étrendet követők, akik tudatosan, a megelőzés érdekében választják a funkcionális élelmiszereket. Az ACNielsen piackutató vállalat szerint, Magyarországon és világszerte az egészséges étkezésre való törekvés az egyik fő fogyasztási trend, ehhez viszont szorosan hozzá kell kapcsolni a nutrimarketinget a fogyasztás optimalizálása érdekében (Szakály, 2008). A nutrimarketing (táplálkozási előny marketing) egy olyan reklám, mely oktatja, felkészíti a vásárlót, a termék élettanilag előnyös hatásainak tudatosításának céljából. A funkcionális élelmiszerek piacán létfontosságú az alkalmazása, ha a potenciális vásárlók körének minél nagyobb százalékához el akarjuk juttatni a termék előnyös hatásának üzenetét.

Ahogy Japán tekinthető a funkcionális élelmiszerek szülőhazájának, a pontos törvényi szabályozást is ott fogalmazták meg először a termékekkel kapcsolatban. A FOSHU (Foods For Specified Health Use) termékeknek meg kell felelniük a japán élelmiszertörvényben leírtaknak (Roberfroid, 2000). Magyarországon a funkcionális termékek piacán, a hazai törvényi szabályozás is előírja, hogy csak akkor lehet egy terméket funkcionálisnak tekinteni, ha annak kedvező, egészségre előnyös hatása tudományosan bizonyított (Figler és mtsai., 2004).

2.1.4 A joghurt

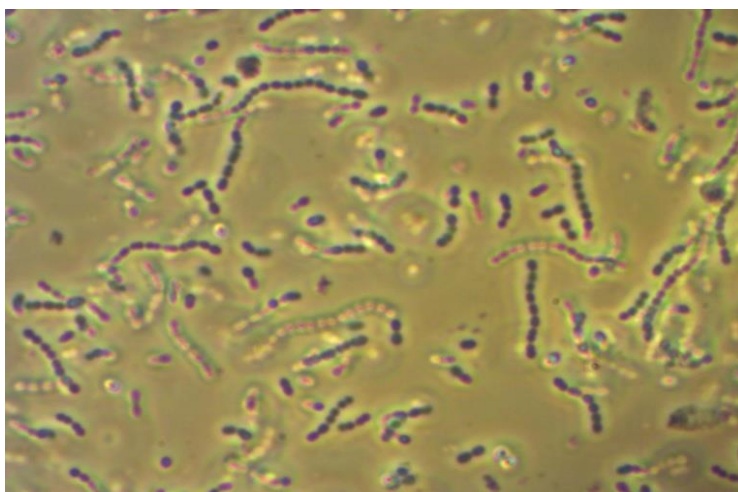
A savanyú tej és tejszín készítményeket tisztán savas vagy vegyes alvasztással készítik. A legfontosabb műveletek a következők: inokulum készítése, beoltás, savanyítás (alvasztás/fermentálás), hűtés, hideg érlelés, valamint ha szükséges habarás. A fermentált élelmiszerek növelik az élelmiszer hasznos mikroba tartalmát, emészthetőségét, vitamintartalmát, jobban hozzáférhetővé válnak a bioaktív komponenseket, jobb textúrát, kedvezőbb ízt biztosít, kizárja és ellehetetleníti a kedvezőtlen baktériumok elszaporodását, ezzel megnövelve a termék eltarthatóságát. Ezen túl a tej táplálkozási értékét a biológiai savanyítás növeli, melyet a 2. táblázat szemléltet (Szakály, 2003).

2. táblázat Savanyítás hatása a tej egyes táplálkozással összefüggő tulajdonságaira
(Szakály, 2003 nyomán)

Tulajdonságváltozás a tejhez képest	%
NPN (nem fehérje nitrogén tartalom)	+ 47,7
FAN (szabad aminosnitrogén tartalom)	+ 264
Fajlagos fehérjehasznosulás	+ 9,2
Fajlagos májregeneráció	+ 16,8
Ca-hasznosulás	+ 7,2
C-vitamin felezési ideje	+ 54,5

A joghurt egyedi baktériumtenyészettel, joghurt kultúrával készül. A fermentáció során az adagolt baktériumok a tejben található cukrot (laktóz) és a további összetevőket használják fel arra, hogy elszaporodjanak, ez által megváltoztatva a tej ízét, textúráját, és így az elkészült terméket a folyamat végére már joghurtnak nevezhetjük. A joghurtoknál alkalmazott starter indító tenyészet a *Lactobacillus bulgaricus* és a *Streptococcus thermophilus* a gyártó által meghatározott

mennyiségben kevert kultúrája (1. ábra). A *L. bulgaricus* tejtermékekben, növényeken, növényi komposztban, savanyú káposztában, emberi-állati bélflórában, kovászban, szilázsban található meg. Fakultatív anaerob, Gram pozitív baktérium, amely nem képez spórát, savtűrő és antimikrobális anyagot termel a rothasztó és patogén baktériumok ellen. Fő szénhidrát bontási anyagcsere terméke a tejsav (Teixeira, 2014). A *S. thermophilus* tejben, tejtermékekben található meg. Fakultatív anaerob, Gram pozitív, homofermentatív baktérium, amely nem képez spórát (Hutkins & Goh, 2014).



1. ábra *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* és *S. thermophilus* starter kultúra optikai mikroszkópos képe. Forrás: saját felvétel

2.1 *A felhasznált alapanyagokról*

2.1.1 *A savó*

Az egyik legkedveltebb tejtermék a sajt, melynek előállítása világviszonylatban 180-190 millió tonna savó termelődésével jár együtt

évente, és e melléktermék mennyisége átlagosan évente további két százalékkal nő (Román, 2010, Güttler, 2012). Régen az ipari úton keletkezett savót, mindenféle előzetes feldolgozás nélkül a környezetbe, felszíni vizekbe, csatornába engedték, amely nyilvánvalóan napjainkban nem megengedhető, viszont takarmányként és trágyázószerként való hasznosítása a mai napig elterjedt. Környezetvédelmi szempontból a magas KOI (kémiai oxigénigény) és BOI (biológiai oxigénigény) értékét figyelembe véve, a környezeti terhelése és elhelyezése problémát jelent az élelmiszeripar számára. Nem tekinthetünk a savóra kizárólagosan, mint feleslegesen keletkező, környezetszennyező melléktermékre, hiszen számos pozitív élettani hatással rendelkezik. A 17-18. században ivókúra keretében, gyógyászati célból már alkalmazták svájci szanatóriumokban. Az otthon keletkező savót is felhasználták a kenyérdagasztásnál és kelt tészták elkészítésénél. A tej savas alvasztásánál, túró gyártásakor, a tejcukor és a tejsav egymáshoz viszonyított arányát tekintve savanyú tejsavó, az oltós és vegyes alvasztás során, a sajtok gyártása közben pedig édes tejsavó keletkezik. Az alvadás során a tej fehérjéi közül a kazein koagulál és a képződött kazein térháló magába zárja a tej többi összetevőinek (tejsír, tejcukor és ásványi anyagok) jelentős részét. A tej szárazanyag tartalmának mintegy 50%-a jelenik meg a visszamaradó savóban. 100 liter sajttejből mintegy 80-90 liter savó képződik. A savófehérje aminosav-összetétele kedvező, esszenciális aminosav-tartalma magas és a savó jelentős forrása egyes vízoldható vitaminoknak is (Csapó & Csapóné, 2002). A savófehérje biológiai értéke (biological value, BV) meghaladja a tojásfehérjéjét (Szakály, 2003), valamint benne 20 % feletti mennyiségben találunk elágazó szénláncú aminosavakat (BCAA: leucin, izoleucin, valin) (Shoveller és mtsai., 2005). A savó a

többi tejtermékhez hasonlóan fontos kalciumforrás, valamint laktóztartalmának emésztetlen hányada a vastagbélbe érve prebiotikumként viselkedik. Nagy számban található benne biológiailag aktív fehérjék és peptidek, valamint immunglobulinok. Előnyös szárazanyag-összetétele mellett azonban hátrány, hogy gyors mikrobiológiai romlásnak indul, magas víztartalma miatt. A savó hasznosításának egyik lehetséges módja különböző koncentrált termékek előállítása dehidratálással. A savóport vákuumbepárlással, a savófehérje-koncentrátumot (WPC-35, WPC-80), valamint -izolátumot (WPI) és -hidrolizátumot (WPH) elválasztási technikák alkalmazásával, a szárazanyag-tartalom frakcionálásával állítják elő. Ennek köszönhetően újabb és nagyobb hozzáadott értékű termékeket állíthatnak elő. A savóban található laktóz hasznosítására számos lehetőség van, belőle tejcukor származékokat gyárthatnak, mint például a laktulóz, laktitol vagy a laktobionsav. Az élelmiszeriparon kívül a savót a gyógyszeripar és a kozmetikai ipar is felhasználja, egyes összetevőiből biogázt illetve különböző polimer vegyületeket is elő lehet állítani. A savó frissen történő felhasználásának megkönnyítését a fermentációs eljárással történő feldolgozása jelentené, a melléktermék keletkezési helyén.

2.1.2 A tej

A tej emlősállatok tejmirigyei által termelt, az újszülött kizárólagos táplálására szolgáló összetett biológiai folyadék, amely a szükséges tápanyagkomponenseket optimális mennyiségben és szerkezetben tartalmazza. A tejben körülbelül 140-150 féle biológiailag értékes anyag található meg, melynek eredményeképpen az újszülött képes a tej fogyasztásával a testsúlyát rövid időn belül megduplázni. A tejnek

önmagában is nagy táplálkozásbiológiai jelentősége van, ezen felül alapanyaga további értékes termékeknek, mint például a joghurt, vaj, sajt, tejföl, tejszín, kefir.

3. táblázat: A tehéntej átlagos összetétele
(Szakály, 2003 nyomán)

Tej alkotórész	%
Víz	87,3
Szárazanyag	12,7
Zsír	3,7
Fehérje	3,4
Tejcukor	4,7
Ásványi anyagok	0,7
Egyéb	0,2

A tejben, legnagyobb mennyiségben vizet találunk (87,3%), melyben finom diszperziós oldatban vannak jelen a tejalkotó komponensek. A tej szárazanyagában (12,7%) található a makrokomponenseket, a tejszír, tejfehérjét, tejcukrot, valamint a mikrokomponenseket pl. ásványi anyagokat és vitaminokat (3. táblázat). A tejszír zsírsav profilja lényegesen összetettebb, mint a növényi eredetű és a legtöbb állati eredetű élelmi zsiradéké. A többi lipid-forráshoz képest viszonylag nagy a rövid szénláncú telített zsírsavak aránya a tejszírban, és acil-lipidjeiben páratlan szénatomszámú, valamint elágazó oldalláncú zsírsavak is megtalálhatók. A tej zsírsav profilját az alkalmazott takarmányozás jelentősen befolyásolhatja. A tejfehérje körülbelül 80%-át a kazein adja, mely alfa-, béta- és kappa kazeinből áll, valamint 20%-ban a savófehérjék alkotják. A tejfehérjék magas biológiai értéküknél fogva alkalmasak arra, hogy komplettálják a táplálékban előforduló egyéb komplett és inkomplett

fehérjéket. A tej jellegzetes édes ízét a laktóz adja, mely egy glükózból és galaktózból felépülő redukáló diszacharid. A tej mintegy 14-féle vitamint tartalmaz, ezen belül jelentős A-, D-, és B2-vitamin-forrás (Ballard & Morrow 2013).

2.2 *Prebiotikumok*

A prebiotikumok körét Gibson és Roberfroid definiálta először 1995-ben: „olyan nem emészthető élelmiszer összetevők, melyek szelektíven serkentik a növekedését/aktivitását egy vagy több a szervezetre jótékony hatású bélben található baktériumnak, ez által hozzájárulva a gazdaszervezet egészségéhez” (Gibson & Roberfroid, 1995). A szerzők később pontosították a definíciót: „olyan szelektíven fermentálható összetevők, melyek előnyös változást eredményeznek a bél mikroflórájának összetételében és aktivitásában, ezzel kedvező hatást gyakorolva a fogyasztó egészségére”. A prebiotikumokkal szembeni követelmények az alábbiak: legyenek rezisztensek az emberi emésztőenzimokkal szemben, azonban a bélbaktériumok képesek legyenek őket fermentálni olyan módon, hogy ennek során a kedvező baktériumok életképessége és aktivitása növekedjen meg (Rastall és mtsai., 2006). A fenti megfogalmazásokra hagyatkozva, ezeket a követelményeket igazolni kell *in vitro* vagy *in vivo* kísérletekkel.

A prebiotikumok többnyire olyan vízben oldható rostok, melyeket 3-10, vagy esetenként ennél több monoszacharid egység épít fel. Az ismert prebiotikumok emészthetetlen oligoszacharidok keverékei. Az inulin frukto-oligoszacharid (Saad és mtsai., 2013). Ezek a szénhidrátok ellenállnak az emberi emésztőenzimoknak, így eredeti állapotukban

jutnak el a vastagbélbe, ahol kifejtik jótékony hatásukat (Quigley és mtsai., 1999). Kémiai összetételüket tekintve közel állnak az élelmi rostokhoz, melyeknek a Codex Alimentariusban található meghatározása a következő: legalább hármas polimerizációs fokkal rendelkező szénhidrátok, melyek nem emésződnek és nem szívódnak fel az emberi vékonybélben. A fő különbség a két csoport között, hogy a prebiotikumok szelektíven hatnak a potenciálisan jótékony bélbaktériumokra, mivel azok szelektív szubsztrátumai, azonban egyes szénhidrátok mindkét feltételt teljesítik. Például az inulin jól ismert prebiotikum és egyben vízoldható élelmi rost is. Egyes nem emészthető di-, oligo-, poliszacharidok, rezisztens keményítők és bizonyos cukoralkoholok szintén rendelkezhetnek prebiotikus tulajdonságokkal (Al-Sheraji és mtsai., 2012).

A legismertebb prebiotikumok a galaktooligoszacharidok (GOS) és a fruktooligoszacharidok (FOS) (Roberfroid, 2005). A prebiotikumok természetes módon fordulnak elő számos növényben, gyümölcsben, például a cikóriában, hagymában, fokhagymában, spárgában, articsókában, póréhagymában, banánban és paradicsomban. A prebiotikumokat ki lehet vonni közvetlenül az őket tartalmazó növényekből (például inulin extrakció cikóriából), vagy kémiai/enzimes hidrolízissel is előállíthatók poliszacharidokból, illetve glikozidkötések kialakításával mono- vagy diszacharidokból (Barreteau, 2005).

A galaktooligoszacharidok legalább 85% galaktózt tartalmaznak. A laktóz bioszintézise során, a β -galaktozidáz enzim működésekor keletkeznek. A *L. bulgaricus* és *S. thermophilus* β -galaktozidáz enzimének erős a transzgalaktozidáz hatása, vagyis a termékben található laktózt hatékonyan alakítják át. A laktózból laktulózt állítanak elő, a

folyamat során a laktóz glükóz része fruktózzá konvertálódik, és laktulóz diszacharid képződik. A laktulóz nem szívódik fel a tápcsatornában, ezért hashajtóként is alkalmazható. A laktoszukrózt laktózból és szacharózból állítják elő (Panesar & Kumari, 2011).

A fruktooligoszacharidok (mint például az inulin) ipari előállítására szacharózból transzfruktozilációval megy végbe, de közvetlenül is kivonhatóak cikóriából forró vizes extrakcióval. Az izomaltulóz (palatinóz) nem prebiotikus hatású, de a lebontásakor keletkező palatinóz oligoszacharidok már prebiotikus tulajdonsággal rendelkeznek. Az izomalto-oligoszacharidokat keményítőtől állítják elő, melyet első lépésben α -amilázzal folyósítanak el, majd β -amilázzal és α -glükozidázzal bontanak tovább (Zhang és mtsai., 2003). A gencio-oligoszacharidokat transzglükozilálással állítják elő glükóz szirupból. A szója oligoszacharidjaiban raffinóz és sztachióz keveréke található. A szójafehérje gyártásánál keletkező szójabab savójának az extrakciójával állítják elő. A xilo-oligoszacharidokat xilánból állítják elő enzimatisz hidrolízissel. Nyersanyagai a fa, kukoricacsutka, korpa, mogyoróhéj, szalma és maláta (Figler és mtsai., 2004).

2.2.1 Az oligoszacharidok felhasználási módjai

Az oligoszacharidokat a 80-as évek óta élelmiszer adalékként használják, mivel kedvezően befolyásolják az élelmiszerek viszkozitását és a gélek állagát. Alkalmazásuk ezen felül táplálkozás élettani előnyökkel is jár, mivel édes ízűek, édesítőképességük mintegy 30-60%-a a szacharózénak, azonban kalóriatartalmuk és glikémiás-indexük alacsonyabb a szacharózénál (Saad és mtsai., 2013). Pékárukban használva megnövelik

a termékek eltarthatóságát, mivel azok tovább megőrzik frissességüket (Walter, 1999). Oldhatóságuknál fogva italokban is kedvezően felhasználhatóak. Alacsony zsírtartalmú termékeknél, zselésítő tulajdonságuk miatt, kedvező hatást gyakoroltak a termékek állagára. Joghurtokban csökkentették a savó kiválását és testesebb, jobb textúrát eredményeztek. Természetes édesítő hatásuknál fogva, további mesterséges vagy természetes édesítőszerrel kombinálva, alkalmasak a kedvező testsúly megtartását elősegítő alacsony kalória tartalmú termékek előállítására (Franck, 2002).

2.2.2 *A prebiotikumok kedvező élettani hatásai*

A prebiotikumokat korábban bifidusz-faktoroknak vagy bifidogén-faktoroknak nevezték, mivel a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek kizárólagos táplálékai. Az emberi emésztőenzimeknek ellenállnak, ezért jelentős részük érintetlenül jut el a vastagbélbe, ahol a relatív táplálékhiány miatt már nagyon kevés hasznosítható táplálékmaradvány lelhető fel. A prebiotikumok egyes élettani szempontból előnyös baktériumok, például a bifidobaktériumok számára tápanyagként szolgálnak, elősegítve azok kolonizációját a bélben, ezzel párhuzamosan, a kompetíció miatt, megakadályozzák a patogén mikrobák elszaporodását (Szakály, 2009). A bélbaktériumok a prebiotikumokból szerves savakat, például tejsavat és ecetsavat állítanak elő a fermentáció során, melyek a vastagbél epithel sejtjei számára energiaforrásként szolgálnak és elősegítik a bélfal sejtjeinek vérellátását. A savképződés a vastagbél felszálló ágában a pH csökkenéséhez vezet, ezzel párhuzamosan az ozmotikus nyomás is növekszik, melynek hatására a perisztaltika

fokozódik és nő a széklet víztartalma. A vastagbél leszálló ágában a béltartalom savanyodása miatt fokozódik a nitrogén széklettel történő ürítése, ez által a vér ammónia szintje is csökken (Rodler, 2005). A nem emészthető szénhidrátok késleltetik a gyomor kiürülését, és emiatt a jóllakottság érzése is tovább megmarad (Figler és mtsai., 2004). Továbbá, fizikai barrierként akadályozzák a zsírok, a koleszterin és a cukor felszívódását, ez által csökkentik annak a valószínűségét, hogy magas vérzsírszint, elhízás és cukorbetegség alakuljon ki. Kedvező a zsírsavcsere gyoroltt hatásuk, csökkentik a vér VLDL koleszterin és triglicerid szintjét (Kok és mtsai., 1996).

A GOS és FOS fogyasztásával csökkenteni lehet az utazók hasmenésének nevezett betegség kialakulásának esélyét, valamint enyhíteni lehet a betegség tüneteit. Továbbá, a bélhámsejtek karcinogénnel szembeni expozíciós idejének megrövidítésével és bizonyos, székletben található karcinogén enzimek gátlásával csökkenthetik egyes daganatos megbetegedések kialakulásának esélyét is (Kok és mtsai., 1996). Rendszeres fogyasztásuk csökkentheti a vastagbélrák kialakulásának kockázatát, pozitív hatást gyakorolhat az ásványi anyagok, például a kalcium és magnézium hasznosulására, és emiatt hozzájárulhat a csonttrikulás megelőzéséhez. Kedvező hatásaik közé tartozik még, hogy a frukto-oligoszacharidok nem okoznak fogszuvasodást, mivel a szájban lévő *S. mutans* nem képes ezeket bontani, így kevesebb sav képződik fogyasztásuk során, mint a cukrokból (Roberfroid, 1999). Ígéretes eredményeket mutatott antibiotikumokkal való együttes adagolásuk (metronidazol-, vancomycin-oligofruktóz), mivel hatásukra a terápiás időszak alatt megnőtt a probiotikus baktériumok csíraszám a székletben (Lakatos & Lakatos, 2006).

2.3 *Élelmi rostok*

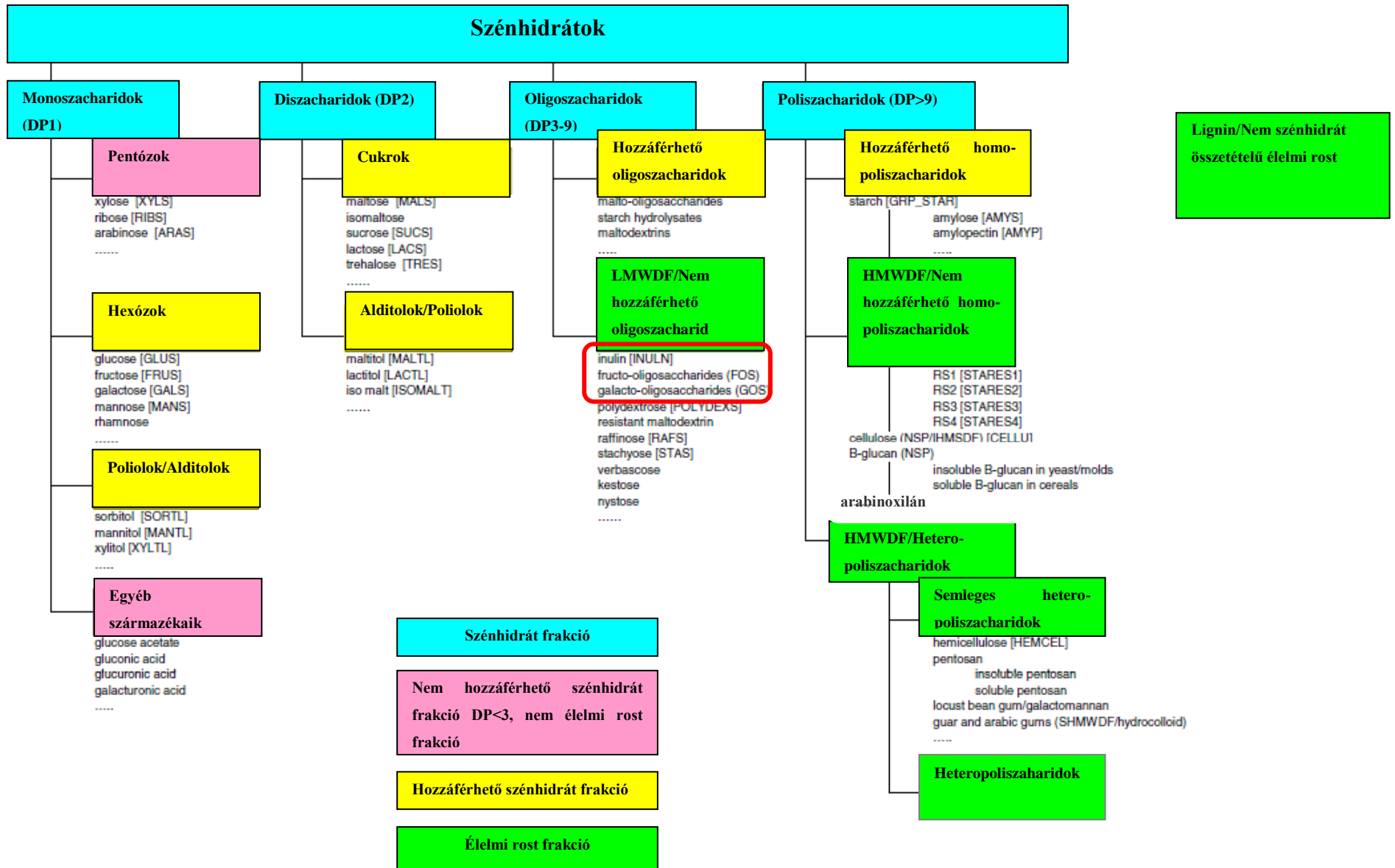
2.3.1 *Rostok meghatározása*

Az élelmi rostok olyan legalább 3-as polimerizációs fokkal rendelkező szénhidrátok, melyeket az ember endogén emésztőenzim rendszere nem tud lebontani (nem emésztődnek és szívódnak fel az emberi vékonybélben) így eredeti állapotban jutnak el a vastagbélbe (Quigley és mtsai., 1999). Az élelmi rostokra azért térek ki, mivel a prebiotikumok egyben élelmi rostnak is tekinthetők, mivel az ember által nem emészthetők. Továbbá ugyanúgy, ahogy a pre- és probiotikumok, az élelmi rostok is hozzájárulnak a kedvező gastroenterális állapotok fenntartásához. A növényi sejtfalból származó poliszacharidok (ballasztanyagok) a bélbaktériumok fontos tápanyagai. Az emésztőenzimokkal szemben rezisztens szénhidrátok eljutnak a vastagbélig, ahol fermentálódnak, ezáltal megnövekszik a baktériumok és a béltartalom tömege is, amely laxatív hatást eredményez (Figler és mtsai., 2004). A diétás rostok, az AACC (2001) szerint, az elfogyasztott növényi táplálék azon (a lignin kivételével) szénhidrát jellegű maradványai, melyek ellenállnak az emésztésnek és felszívódásnak az emberi vékonybélben, majd ezt követően teljesen vagy részlegesen fermentálódnak a vastagbélben. Az AACC szerint a diétás rost összetevői a következők:

- Nem keményítő jellegű poliszacharidok és oligoszacharidok: cellulóz, hemicellulóz, arabinoxilánok, arabinogalaktánok, polifruktózok, inulin, oligofruktánok, galaktooligoszacharidok, gumiszzerű, növényi nyálkaanyagok, pektinek.

- Analóg szénhidrátok: emészthetetlen dextrinek, ellenálló maltodextrinek, szintetikus szénhidrátok, polidextróz, metil-cellulóz, hidroxipropilmetil cellulóz, emészthetetlen „ellenálló” keményítők.
- Lignin.

A 2. ábra szemlélteti a prebiotikumok és az ételmi rostok elhelyezkedését a szénhidrátok egyes csoportjain belül, illetve azon kívül (lignin). Az ábra az ételmi rost frakciókat zöld színnel jelöli. Egy, illetve kettő monomert tartalmaznak a mono- illetve a diszacharidok. A 3-9 polimerizációs fokkal rendelkező oligoszacharidokon belül helyezkednek el a kis molekulású ételmi rostfrakciók, a nem hozzáférhető oligoszacharidok (LMWDF). Ide tartozik az inulin, a fruktooligoszacharidok, valamint a galaktooligoszacharidok. A 9-nél több monomer egységből álló poliszacharidokon belül találjuk meg a nagyobb molekulású homo- és heteropoliszacharid rostfrakciókat. Nem hozzáférhető homopoliszacharid például a cellulóz, a béta-glükán és az arabinoxilán. Nagy molekulású heteropoliszacharid ételmi rost található például a szentjánoskenyérmag lisztben. A lignin nem szénhidrát összetételű ételmi rost frakció.



2. ábra Különböző polimerizációs fokú szénhidrátok csoportosítása. (Westenbrink, 2013 nyomán)

2.3.2 *A rostok kedvező élettani hatása*

Az élelmi rostok kedvező tulajdonságait, amelyek segítségével a jótékony élettani hatásuk megnyilvánul, három fő csoportba sorolhatjuk. Az első kedvező tulajdonságuk a széklet tömegének a növelése. A bél baktériumflórájának nagyobb mértékben ellenálló szálak, tehát a kevésbé erjedőképes rostok, közvetlenül járulnak hozzá ehhez a funkcióhoz, mivel jobb a térfogat növelő képességük és ezáltal több vizet kötnek meg. Növelik a széklet volumenét, így biztosítja a táplálék folyamatos továbbhaladását a belekben. Fenntartják a bélperisztaltikát, fokozódik a bélmozgás, ennek köszönhetően a széklet bél tranzit ideje csökken és kevesebb toxikus anyag szívódik fel. A rostús diéta csökkenti a bélrendszeri megbetegedések előfordulási gyakoriságát például aranyér kialakulása, béلكiöblösödés (diverticulum), vastagbél rák, Crohn-betegség, irritábilis vastagbél-gyulladás esetében. A cellulóz kevésbé erjedőképes rost, és ugyanez vonatkozik az alábbi módosított cellulózokra: karboximetil-cellulóz, hidroxipropil-metilcellulóz, metilcellulóz (Rodler, 2005).

A második kedvező hatás a rost viszkozitásában rejlő tulajdonság által nyilvánul meg. A rostok a bélrendszer űrtartalmát kitöltik, lassítják a gyomor kiürülését, ezáltal telítettség, jóllakottság érzését keltik. Magukhoz kötik, és távol tartják az epithel sejtektől az epesavakat és a koleszterint. Az étkezésenkénti 5-15 g rostot tartalmazó étrend, késlelteti a glükóz felszívódást és növeli az inzulinérzékenységet. Az étkezést követően kevésbé emelkedik a vércukorszint, javul a glükóz tolerancia, tehát cukorbeteg, elhízottak diétájában is sikeresen alkalmazható. Csökkenti a szérum koleszterinszintet, a szív és érrendszeri megbetegedések megelőzésében is jelentős szerepet játszik (Rigó, 1996).

A kedvező viszkozitás kialakításában szerepet játszó rostok az alábbiak: agar, alginátok, arabinogalaktánok, arabinoxilánok, karragén, gellán gumik, guar gumik, szentjánoskenyérmag gumi, pektin, béta-glükán, psyllium.

A rostok harmadik kedvező tulajdonságát fermentációs képességük adja. A bél baktériumai képesek fermentálni az oda kerülő rostot, és mintegy táplálékul szolgál azoknak, ez által szelektíven fokozzák a bifidobaktériumok, laktobacillusok szaporodását. A fermentáció termékei rövid szénláncú zsírsavak, tejsav, hidrogén és szén-dioxid. Ezen termékek visszahatnak a vastagbél nyálkahártya sejtjeire, ezzel elősegítik a vastagbél-végbél rákos megbetegedéseinek megelőzését. Az oligoszacharidok és a rezisztens keményítő a vastagbélben teljesen erjedőképes rostok. A polidextróz, és a rezisztens maltodextrin részben erjedőképes rostok. További erjedőképes rostok az inulin, frukto-oligoszacharidok, a rezisztens keményítő, valamint a pektin (Gere, 2010)

A napi ajánlott rostbevitel nők esetében 25 g/nap, férfiak esetében 38 g/nap, ezzel szemben a napi rostfogyasztás a nyugati típusú országokban (EU alapító tagországok) nem éri el a 15 g/nap mennyiséget (Brownawell és mtsai., 2012).

2.4 *A rövid szénláncú zsírsavak keletkezése és humán élettani szerepük*

A régebbi illózsírsav elnevezésük az analitikai kimutatási módszerükből eredt, mivel mennyiségüket vízgőz-desztillációval határozták meg. Kémiai szerkezetük szerint a rövid szénláncú zsírsavak (short chain fatty acids, SCFA) olyan telített, nyílt szénláncú monokarbonsavak, melyek

szénatom száma kettőtől ötig terjed (Chassaing & Gewirtz, 2018). A természetes zsiradékok trigliceridjeiben, néhány zsiradék (például a tejszír) kivételével, általában hosszabb szénláncú zsírsavak (például palmitinsav vagy sztearinsav) vannak jelen nagyobb mennyiségben. A rövid szénláncú zsírsavak fő keletkezési helye az emberi testben a vastagbél, ennek feltétele azonban a specifikus fermentatív bakteriális közeg (Hoverstad & Midtvedt, 1986). Az emberi emésztőenzimeknek ellenálló rostokat a vastagbélben található tejsavbaktériumok szénforrásként használják fel. A *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* fajok fermentációjuk során az etanol és a szén-dioxid mellett nagyobb mennyiségű SCFA-t is termelnek (Bosscher és mtsai., 2009). Az emlősökben az acetát, a propionát és a butirát aránya 75:15:10 és 40:40:20 között változhat, mely arányt nagyban befolyásolja az elfogyasztott táplálék összetétele (Cummings, 1991, 1987; Hamer és mtsai., 2008).

A rövid szénláncú zsírsavak döntő hányada felszívódik a bélhámsejtekbe, csupán 5-10 százalékuk ürül ki a széklettel. Az acetát (ecetsav), propionát (propionsav) és butirát (vajsav) a felszívódást követően eltérő módon hasznosul. Az acetátnak (amely a legnagyobb mennyiségben keletkezik a vastagbélben) döntő hányada a májba szállítódik, ahol energia nyelésre vagy koleszterin szintézisre használódik fel. A propionát nagyobb része a glükoneogenezis során glükózzá alakul a májban, kisebb része energiatermelésre használódik fel. A butirát mintegy 70-90%-a közvetlenül a bélben hasznosul, mivel főként a bélhámsejteknek szolgáltat energiát, ezzel elősegítve a sejtek növekedését és megújulását. Befolyásolja a sejtek differenciálódását, proliferációját és hatással van az apoptózis (sejthalál) bekövetkezésére is (Della Ragione és mtsai., 2001). A nátrium-butirát antiproliferatív

(sejtosztódást/sejtnövekedést gátló, daganatellenes) hatást gyakorol a sejtekre, valamint preventív hatású a rák és az adenoma kialakulásával szemben (Bornet és mtsai., 2002). A rövid szénláncú zsírsavak jelenléte megakadályozza a másodlagos epesavak (7-dezoxikolát és litokolát) létrejöttét, mivel a pH csökkentése révén kedvezőtlen feltételeket teremt kialakulásuknak (Hijova & Chmelarova, 2007). A butirát mennyiségét befolyásolja az elfogyasztott rostok mennyisége és minősége, azonban a nem prebiotikus rostok élettani hatása még nem bizonyított (Hamer és mtsai., 2008). Az SCFA-k termelődése olyan körülményeket teremt a vastagbélben, hogy közvetetten az elsődleges barrier szerepét betöltő, jótékony bél mikrobióták szaporodását segíti elő, ezzel szemben a káros baktériumok számát visszaszorítja. A bélhám sérülése, integritásának elvesztése kedvez az irritábilis bélszindróma, a colitis, a Crohn-betegség kialakulásának, mely további betegségek kialakulását vonhatja maga után. A megfelelő rostfogyasztás és a fermentálódott rövid láncú zsírsavak preventív tulajdonságaikkal hozzájárulnak a fentebb említett betegségek kialakulási valószínűségének csökkentéséhez, illetve a terápiás kezelések eredményességének elősegítéséhez.

A legfontosabb SCFA-t termelő baktériumok, és az egyes SCFA-k főbb metabolikus szerepe és élettani hatása az alábbiak:

Acetát: *B. adolescentis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*: energiatermelés, koleszterin bioszintézis.

Propionát: *Roseburia insulinovorans*, *Veillonella* spp., *Ruminococcus obeum*, *Bacteroides* spp., *Dialister* spp., *Phascolarctobacterium* spp.: sejtek energia ellátása, glükoneogenezis, koleszterin bioszintézis gátlása, HDAC (hiszton-deacetiláz) gátlás.

Butirát: *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes caccae*, *Coprococcus*

eutactus: sejtek energia-ellátása, gyulladásgátló hatás, immunszuppresszív citokinek indukálása, immunszuppresszív GLP-2 indukálása, tumor sejtekben HDAC (hiszton-deacetiláz) gátlás, apoptózis (sejthalál) indukálása a tumor sejtekben, mucosa barrier funkciójának fokozása, méregtelenítő enzimek expressziója (Fernandez és mtsai., 2016).

2.5 *Probiotikumok*

A fermentáció az egyik legősibb tartósítási módszer. Az egészségre nézve előnyös baktériumokról már az Ószövetségben is említést tesznek, miképpen Ábrahám hosszú életét a savanyított tej fogyasztásának köszönhette. A fermentált tejtermékeket terápiás céllal már az előtt használták, mikor Leeuwenhoek 1683-ban felfedezte a mikroszkopikus élőlények létezését. 1857-ben Louis Pasteur izolált először tejből tejsav baktériumokat. Ilja Iljics Mecsnyikov 1907-ben, a bolgár és orosz nomádok hosszú életkorát az általuk fogyasztott fermentált tejtermékekkel hozta összefüggésbe (Makinen és mtsai., 2012). 1953-ban Kollath tett először említést a probiotikumokról (Hamilton-Miller és mtsai., 2003).

A bélsatorna születésünkkor steril, a szülőcsatornán való áthaladáskor és az anyatej fogyasztásának megkezdésével kezd kialakulni a csecsemő bélflórája. Ebben az időszakban a táplálék bőségesen tartalmaz tejcukrot és prebiotikus oligoszacharidokat. A tejcukor olyan nagy mennyiségben van jelen, hogy az újszülött laktáz enzime nem képes teljes mértékben lebontani, így egy része változatlan formában halad tovább a vastagbélbe. A *Lactobacillusok* saját energiaszükségletük fedezésére használják fel és az oxigén

felhasználásával anaerob környezetet alakítanak ki (Dobi, 2010). A felnőtt bélflóra 300-500 fajból áll, melynek összetétele a gazdaszervezetre egyedileg jellemző (bakteriális ujjlenyomat), össztömege 1-1,5 kg (Csiki, 2008). Összetétele, mennyisége nem állandó, az élet folyamán egészséges emberben is változik, illetve a táplálék összetételétől, minőségétől függően is változhat. A baktériumflóra csíraszama a béltraktus mentén nem homogén, a csípőbélben 10^4 - 10^6 /g chymus, a vastagbélben 10^{12} /g chymus (Dobi, 2010).

A legismertebb, leggyakoribb probiotikus nemzetségek a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* és más Gram pozitív *coccusok*. Példák a laktobacillus törzsekre: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, bifidobaktériumokra: *B. bifidum*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, sztreptokokkuszosokra: *S. thermophilus*, *S. salivarius*, *S. intermedius*. A kultúráknak az alábbi kritériumoknak kell megfelelni: fogyasztáskor élő sejt formájában legyenek jelen, minél nagyobb, de legalább 10^8 cfu/g mennyiségben. Legyenek stabilak és a termék fogyaszthatósági idején belül tartalmazzák a megfelelő csíraszámot; legyenek ellenállóak az emésztőenzimekkel, a gyomorsavval és az epesavakkal szemben. Tapadjanak a bélhámhoz, legyenek képesek ideiglenes kolonizációra és biztonságosak (nem kórokozó törzs) legyenek. Továbbá a technológiai folyamatoknak ellenálljanak, és ne befolyásolják a termék érzékszervi tulajdonságait (Rodler, 2005).

A probiotikumokra vonatkozó kritériumokat technológiai, élettani és orvostudományi szempontból egyaránt meg kell határozni. A probiotikumokra vonatkozó technológiai elvárások a következők: stabilitás a gyártástechnológia alatt, megfelelő érzékszervi

tulajdonságok, fágrezisztencia és a tárolás alatti stabil hasznos csíraszám fennmaradása (Saarela és mtsai., 2000).

A probiotikumokra vonatkozó élettani (*in vitro* is vizsgálható) kritériumok: tolerálják a gyomron és a vékonybélben történő áthaladást, legyenek ellenállóak az epesavaknak, képesek legyenek hámszöveti adhézióra, tudjanak növekedni a bél lumenében és a bél hámszövetén, továbbá legyen ko-aggregációs képességük, lehetőség szerint termeljenek a patogénekre ható antimikrobiális anyagokat és legyenek rezisztensek az antibiotikumokra.

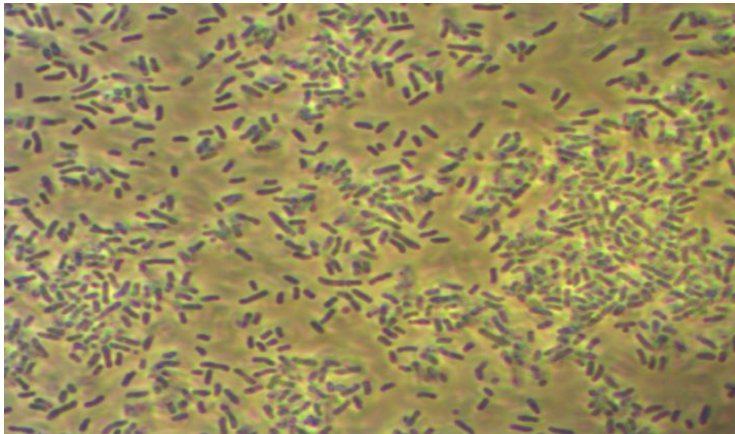
A probiotikumokra vonatkozó *in vivo* kritériumok szerint képesnek kell lenniük az immunrendszer erősítésére, a patogén mikroorganizmusok kolonizációjának gátlására, a laktózbontás elősegítésére, számos betegség közöttük a vastagbélrák, gyulladós bélbetegségek, szív és érrendszeri betegségek kialakulásának csökkentésére.

A probiotikumok élettani hatási közül talán az egyik legjelentősebb az, hogy elősegítik a bél nyálkahártya épségének megőrzését. Ebbe beletartozik a nyálkahártya normál fejlődésének a biztosítása, és a barrier funkció megőrzése. Jelenlétükkel epithelsejt-proliferációt és -differenciálódást indukálnak. Fokozzák azoknak a fehérjéknek az expresszióját, melyek a tight junctionok felépítésében vesznek részt, ezzel a megfelelően illeszkedő tight junctionok alacsonyán tartják a bél permeabilitását. A probiotikumok a mucosához tapadva az epithel sejteken lévő receptorokon, kompetícióba lépnek a patogénnel és a baktericid fehérjék szintézisét indukálják a Paneth-sejtekben. Közvetlenül vagy specifikusan gátolják az idegen baktériumok megtelepedését, modulálják az immunválaszt. Esszenciális szerepük van az immunrendszer működésében, mivel képesek indukálni

a Toll-like receptorokat. A probiotikus baktériumok kölcsönhatásba lépnek a DC-sejtek (dendritikus-sejtek) Toll-like receptoraival, ekkor intercelluláris szignál aktiválódik, mely ösztönzi a természetes védekező immunválaszt segítő T-helper-1 sejtek citokin-termelését (Wacha & Szijarto 2011). A bélrendszer kedvező mikroökológiája hozzájárul az immunrendszer fejlődéséhez, mivel lehetővé teszi a lumenben lévő mikrobiális antigének mintavételezését (sampling). Így az antigének korlátozott számban a nyálkahártyába jutnak, találkoznak a GALT sejteivel és egy kontrollált immunreakció jön létre (Rosero és mtsai., 2014), amely véd a patogén baktériumok megtelepedése ellen, kompetitív módon gátolja megtapadásukat és kolonizációjukat és megakadályozza a transzlokációt. A rövid szénláncú zsírsavak szintézise révén elősegítik a bél sejteinek vérellátását és csökkentik a béltartalom pH-ját. Kedvezően befolyásolják a szervezet metabolikus tevékenységét (koleszterin felszívódás) és az alábbi vitaminok termelését: tiamin (B1), folsav (B9), piridoxin (B6), és K-vitamin. A tejsavbaktériumok nem termelnek rothasztó anyagokat, nem ismert a velük szembeni allergia, még az arra érzékeny egyéneknél sem (Isolauri, 2001).

A *Bifidobacterium* BB-12[®] (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM15954) (3. ábra) a Chr. Hansen leginkább elismert probiotikus törzse. Biztonságos, stabil, az egyik legjobban dokumentált probiotikum, 1985-óta használják világszerte, élelmiszer összetevőként és táplálékkiegészítőként (Alves és mtsai., 2012; Ozer és mtsai., 2008; Magarinos és mtsai., 2007; Ozcan, 2010). A klinikai vizsgálatokban 100 milliárd CFU/nap mennyiségben történő fogyasztás esetén sem dokumentáltak az emberi egészségre gyakorolt károsító hatást (Weizman & Alsheikh, 2006). Teljes genomjának feltérképezése is megtörtént. A BB-12 törzset Európában az EFSA (European Food Safety Authority) és

a QPS (Qualified Presumption of Safety) biztonságos státuszba sorolta be, míg az USA-ban az FDA által (Food and Drug Administration) szintén biztonságosnak ítélt GRAS státuszt (Generally Recognized As Safe) kapott (Chr. Hansen Nu-trish Kézikönyv, 2006).



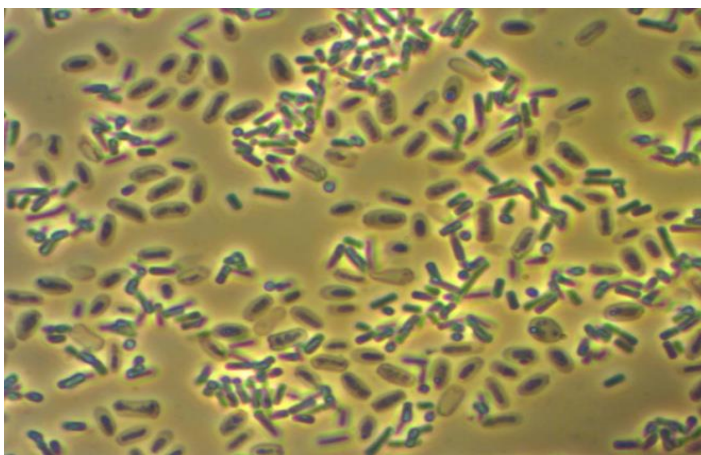
3.ábra *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) optikai mikroszkópos képe

Forrás: saját felvétel

Mint dokumentált probiotikum, rendelkezik a probiotikus törzsre vonatkozó kritériumokkal: biztonságosság (törzs identitás), savtolerancia, epetolerancia, bél epithéliális sejtjeihez történő adhézió, valamint szavatossági idő végéig tartó stabilitás; továbbá képesség a fogyasztó egészségére történő kedvező, terápiás hatás kifejtésére, amely többféleképpen nyilvánulhat meg. Az emésztőrendszer egészségére kifejtett hatás (hasmenés ellen, székrekedés ellen), az antibiotikumok kedvezőtlen mellékhatásának csökkentése, megszüntetése, az immunrendszerre kifejtett kedvező hatás, a kardiovaszkuláris egészség előmozdítása, laktóz intolerancia csökkentése, enyhébb lefolyású betegségek időtartamának lerövidítése. A tényleges élettani

megnyilvánulásokat *in vitro*, *in vivo* és humán klinikai vizsgálatokkal kell alátámasztani, melyek az említett baktériumtörzs esetén, többszörösen bizonyítottak.

A *L. acidophilus* LA-5[®] DSM13241 (4. ábra) törzset 1979 óta használják világszerte élelmiszer adalékanyagként, illetve táplálékkiegészítőként (Alves és mtsai., 2012; Ozer és mtsai., 2008; Magarinos és mtsai., 2007; Ozcan, 2010). Jól dokumentált klinikai vizsgálatok által igazolt, hogy 50 milliárd CFU/nap mennyiség fogyasztása esetén sem tapasztalható semmilyen mellékhatás. A törzs Európában az EFSA által biztonságos QPS státuszt kapott (Qualified Presumption of Safety), míg az USA-ban az FDA, a szintén biztonságos GRAS státuszba sorolta be (Chr. Hansen Nu-trish Kézikönyv, 2006).



4.ábra *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) optikai mikroszkópos képe Forrás: saját felvétel

Tanulmányok kimutatták, hogy a BB-12, valamint LA-5 probiotikumok kedvező hatást gyakorolnak a gyomor-bél traktusra (Bogovic-Matijasic és mtsai., 2016; Chatterjee és mtsai. 2013; Savard és mtsai., 2011),

csökkentik a légúti fertőzés előfordulásának gyakoriságát (Taipale és mtsai., 2011) csökkentik egyes nemkívánatos baktériumok számát a bélben, mint például a *C. perfringens* és *Helicobacter pylori* (Mohan és mtsai., 2006, Murakami és mtsai., 2006, Sheu és mtsai., 2006). Az LA-5 és a BB-12 fogyasztása lerövidítette a hasmenéses időszak időtartamát (Vrese és mtsai., 2011). Már kialakult vastagbélgyulladásban szenvedő betegek is jól tolerálták az LA-5 és BB-12-t tartalmazó készítményt egy éven át tartó alkalmazás mellett is (Wildt és mtsai., 2011). A probiotikumok további kedvező hatása megmutatkozik a humorális, celluláris és nem specifikus immunválaszokban (Kabeerdoss és mtsai., 2011, Sheikhi és mtsai., 2016, Tejada & Simon, 2000). Kimutatták, hogy a BB-12 a gyulladás csökkentése révén mérsékeli a kóros immunreakciókat, például az atópiás ekcéma tüneteit (Jungersen és mtsai., 2014), valamint enyhítette a *Helicobacter pylori* fertőzést egy 6 hétig tartó kúra során.

2.6 *A bél mikrobióta változása az életünk során*

2.6.1 *A születés módjának hatása a kialakuló mikrobiótára*

Az újszülöttek emésztőrendszerének kolonizációja a születésnél kezdődik és erőteljesen befolyásolja annak módja, a császármetszés vagy a vaginális szülés, valamint az anyatejjel és/vagy tápszerrel történő táplálás. Életünk első napjaiban a belet kolonizáló baktérium populációra az instabilitás a jellemző. A mikrobióta az anyatejjel vagy tápszerrel történő táplálás során kezd stabilizálódni, továbbá a szilárd élelmiszer bevezetése és az elválasztás során újból megváltozik az összetétele. Ezen túl további módosító tényezők is hatással vannak rá

ilyen például, a kor, a hospitalizáció valamint az antibiotikumok használata.

A természetes módon világra jött gyermekek a vagina mikrobiótájával inokulálódnak, míg a császármetszéssel születettek a bőr természetes mikrobiótájával (Lynch és mtsai., 2015). Az újszülött gasztrointesztinális traktusának mikrobiótáját az anya vaginális és fekális flórája alakítja ki (Gibson & Roberford, 1995). Születés után az újszülött mikrobiomra az alacsony diverzitás és magas bakteriális fluxus a jellemző (Voreades és mtsai., 2014). A bél első kolonizálói fakultatív anaerob baktériumok, az *E. coli*, valamint *Staphylococcus*, *Streptococcus* és *Enterobacteria* fajok, ezen baktériumok teremtik meg az obligát anaerobok számára a megfelelő környezetet (Voreades és mtsai., 2014), fokozatosan elhasználják az oxigént és új metabolitokat termelnek, felkészítve a belekben található környezetet az anaerob baktériumok számára, melyek közül a *Bifidobacterium*, a *Clostridium*. és a *Bacteroides* dominál (Marques és mtsai., 2010). Később ezeket a baktériumokat elsősorban az *Actinobacteria* és a *Firmicutes* (Voreades és mtsai., 2014) helyettesítik. A természetes szüléshez képest a császármetszés alacsonyabb kolonizációs rátával jár, a bifidobaktérium szám és a *B. fragilis* tagjai alacsonyabb mennyiségben vannak jelen egyes szerzők szerint (Penders és mtsai. 2006). A *C. difficile* gyakorisága nagyobb volt bizonyos esetekben (Penders és mtsai., 2008). A legkiemelkedőbb különbségek a *C. difficile* és a *B. fragilis* esetén vehetők észre (Penders és mtsai., 2006). A *B. fragilis* szintje százszor alacsonyabb volt, míg a *C. difficile* szintje százszor magasabb a császármetszéssel született csecsemők esetén (Penders és mtsai., 2006). Rögtön születés után az újszülött belet olyan fakultatív anaerob

baktériumok kolonizálják, mint az *Enterobacteriaceae*, *Streptococcusok*. és a *Staphylococcusok* (Marques és mtsai., 2010).

2.6.2 Az anyatej hatása a mikrobiom alakulására

Az anyatej számos olyan komponenst tartalmaz, melyek elősegítik a bél mikrobióta megfelelő összetételének kialakulását, ide tartoznak egyes prebiotikus aktivitással rendelkező oligoszacharidok, nukleotidok, immunglobulinok, citokinek, rövid láncú zsírsavak, és a laktoferrin. Ezen kívül az anyatej mikroba összetétele is kedvezőnek tekinthető (Salazar és mtsai., 2014). A vertikális transzmisszió miatt az újszülött bél mikrobiótája hasonlít az anyáéra (O'Toole & Claesson, 2010). Tenyésztéses és molekuláris módszerekkel is kimutatták, hogy az anyából származó bélbaktériumok jelen vannak az anyatejben (Martin és mtsai., 2009). Az újszülött mikrobiótát ezen az úton is kolonizálhatják a baktériumok (O'Toole & Claesson 2010). Az első kolonizálók fakultatív anaerobok, ezeket követik a szigorúan anaerobok (O'Toole & Claesson 2010). A *B. longum* subsp. *infantis* genom analízise alapján kimutatták, hogy speciális stratégiája van azon tejből származó molekulák hasznosítására, melyeknek nincsen az újszülött számára tápértéke (Ottman és mtsai., 2012). Ez arra utal, hogy a baktérium és az újszülött „gazdaszerkezet” evolúciója párhuzamosan ment végbe. Több mint 700 baktérium fajt azonosítottak a humán anyatejben (Voreades és mtsai., 2014). Az anyatej kémiai összetétele befolyásolja a bél mikrobiótát, azáltal hogy olyan oligoszacharidokat tartalmaz melyeket a *Bifidobacterium* spp. szelektíven használ fel (Voreades és mtsai., 2014). Az anyatej a legjobb opció az újszülöttek növekedésének és fejlődésének a támogatására (Marques és mtsai., 2010), és ezen kívül folyamatos

baktérium forrás is a csecsemő bélrendszerének kolonizációja számára (Marques és mtsai., 2010). Az egészséges anyáktól származó tej 10^9 CFU/g baktériumot tartalmaz (Marques és mtsai., 2010), pozitív hatásai miatt, számos próbálkozás történt olyan tápszer előállítására, amely az anyatej kedvező hatásaival bír, mely főként a tápszerhez adott probiotikumok és/vagy prebiotikumok hozzáadásával történt (Marques és mtsai., 2010). A prebiotikumok lecsökkenthetik a fertőzések előfordulásának mértékét csecsemőkben (Salazar és mtsai., 2014). Az anyatej erősebb trófikus választ vált ki, mint a tápszer, ami arra utal, hogy a humán tej bioaktív komponensei fontosak a gasztrointesztinális fejlődéshez. Az anyatejből izolált tejsavbaktériumok a patogén baktériumok széles spektrumát képesek gátolni. A gátló hatás a kompetíció mellett magába foglalhatja olyan antimikrobiális alkotóelemek termelését is, mint a bakteriocinek, szerves savak vagy hidrogén peroxid (Martin és mtsai., 2009). Kutatások igazolták, hogy az anyatejben található élő baktériumok az anyai bélből származnak, és az emlő mirigyhámsejtjeihez endogén útvonalon keresztül jutnak (az úgynevezett entero-emlő útvonal) el (Martin és mtsai., 2009). A baktériumok vertikálisan adódhatnak át, ezt alátámasztja a korai széklet minta hasonlósága az anyai vaginális, fekális vagy bőr mikrobiótával (Palmer és mtsai., 2007).

2.6.3 Különbség anyatejjel és tápszerrel táplált csecsemők mikrobiótájában

Az újszülöttek bél ökoszisztémája relatíve egyszerűnek tekinthető, beleiket a bifidobaktériumok elsőként kolonizálják, a bakteriális közösség 60%-át is kitehetik. A referenciának a természetes módon

született, anyatejjel táplált csecsemő számít. Ezzel ellentétesen a tápszerrel etetett gyermekekben a bifidobaktérium lassabban kolonizálódik (Lynch és mtsai., 2015). Bizonyos tanulmányok arra utalnak, hogy azok a csecsemők, melyeknél a bifidobakteriális kolonizációja később következik be vagy/és a bifidobaktérium szám alacsonyabb, jobban ki vannak téve gasztrointesztinális vagy allergiás állapotoknak (Martin és mtsai., 2009). Kezdetben az olyan fakultatív anaerobok dominálnak, mint az *E. coli* és az *Enterococcusok* (Gibson & Roberford, 1995), melyek létrehozzák azt az erősen redukált környezetet, ami az obligát anaeroboknak szükséges (Gibson & Roberford, 1995). Az újszülött mikrobiomjának diverzitása fokozatosan nő az idő előrehaladtával (Ottman és mtsai., 2012). Anyatejjel vagy tápszerrel etetett csecsemők esetében gyakran izolálták az alábbi fajokhoz tartozó törzseket: *B. breve*, *B. longum* subsp *infantis*, *B. longum*, *B. bifidum*. Szintén kimutatták, de kevésbé gyakran az alábbi törzseket: *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. pseudolongum*, *B. dentium*. Az anyatejjel táplált csecsemők esetén a bifidobaktériumok dominálnak, míg a tápszerrel etetett csecsemők esetén az *E. coli*, a *Cl. difficile*, a *Bacteroides fragilis* és lactobacillusok magasabb számban vannak jelen. A mikrobiota mintázatban egy erős anyai „aláírás” tapasztalható, amely nem marad fent korlátlanul (O’Toole & Claesson 2010). Az, hogy anyatejet használunk vagy tápszert meghatározza a kolonizáló bifidobaktériumok típusát is (Ottman és mtsai., 2012). Az anyatejjel táplált csecsemők tápszatornája nagy mennyiségben tartalmaz *B. breve*-t, a tápszerrel táplált csecsemők inkább *B. longum*-ot (Ottman és mtsai., 2012). Az újszülött bél mikrobiotát a *Proteobacteria* dominálja (Salazar és mtsai., 2014). Az anyatejjel táplált csecsemőkben több a bifidobaktérium és kevesebb a patogén, mint a tápszerrel etetetteknél,

ahol a *Bacteroides* és *Clostridium* van jelen, és magas a *Klebsiella* szint. Amikor a *Bifidobaktérium* fajok eloszlását vizsgálták anyatejjel és tápszerrel etetett csecsemők esetén, kis különbség volt az anyatejjel és a tápszerrel tápláltak bélbaktérium összetételük között, azonban több bifidobaktérium fajt mutattak ki anyatejjel való táplálás esetén, mint tápszerrel etetett társaiknál (Klaasens és mtsai., 2009). A *B. adolescentis* a leggyakrabban megtalálható bifidobaktérium felnőttekben, csak kis mennyiségben fordul elő tápszerrel etetett csecsemők esetében és egyáltalán nincs jelen anyatejjel etetett csecsemőkben (Klaasens és mtsai., 2009). A kisgyermek 2-3 éves korára a bélmikrobióta hasonlóná válik a felnőttekéhez. A kezdeti kolonizáció során mikrobiális szukcesszió megy végbe és a kialakult baktérium populáció nem stabil. Egy hónapos korban az anyatejjel etetett csecsemőkben kevesebb volt a *C. difficile* és az *E. coli*, mint a tápszerrel etetett csecsemők esetén. A két csoport esetén a bifidobaktérium mennyiség összehasonlítható. Az anyatejjel etetett csecsemők mikrobiótájában a bifidobaktériumok uralkodnak (Penders és mtsai., 2008). A csak tápszerrel etetett csecsemőket, gyakrabban kolonizálta az *E. coli*, *C. difficile*, és *B. fragilis* csoport, valamint a laktobacillusok mint a kizárólag anyatejjel etetett csecsemőket. A *C. difficile* mennyiség is magasabb a tápszerrel etetett csecsemők esetén (Penders és mtsai., 2008). Az oligoszacharidot tartalmazó tápszerrel etetett csecsemők székletében nagyobb a bifidobaktérium mennyisége (Penders és mtsai., 2008). Az antibiotikum használat a fakultatív anaerob mikrobák (*Bifidobacteriumok* és *Bacteroides*) szintjét lényegesen csökkentette (Penders és mtsai., 2008). A laktóz hidrolízise nem teljes a vékonybélben, innen tovább emésztetlenül jut a vastagbélbe ahol, mint prebiotikum hatással lesz a bélflórára. Tejcukor jelenlétében kedvezőbb

a kalcium abszorpciója és az ásványi anyagok hasznosulása, mivel a laktózból keletkező tejsav által létrehozott savas közeg javítja a kalciumsók oldhatóságát (Csapó, 2002).

A gyerek születésekor és nevelése során fennálló környezet szignifikánsan befolyásolja az újszülött mikrobiótáját, ha a higiénia kisebb mértékű, akkor nagyobb *Enterococcus* és *Lactobacillus* szám a jellemző (O'Toole & Claesson, 2010).

2.6.4 A felnőttek és az idősek mikrobiótája

A felnőttkor során a bél mikrobióta elég stabil a fajok szintjén, azonban a törzsek szintjén mehet végbe jelentős változás (Tiihonen és mtsai., 2010). Számos tanulmány foglalkozik ezzel a témával, viszont fontos azt megjegyezni, hogy nehezen determinálható az idős kor meghatározása. Nehéz meghúzni a határt, ahonnan az öregedést számoljuk. A kor előrehaladtával a táplálkozási szokások és az életvitel is megváltozhat (Biagi és mtsai., 2012). Nem létezik olyan egyszerű marker, mellyel jellemezhető lenne a fekális mikrobióta változása a kor függvényében. Egyedül a diverzitás csökkenése lehet jele az öregedésnek (Tiihonen és mtsai., 2010), azonban ez nem feltétlenül a korrall függ össze, hanem okozhatja az általános egészségi állapot romlása, a nem megfelelő táplálkozás, vagy egyes gyógyszerek használata is (Rondanelli és mtsai., 2015). A jelenlegi eredmények arra utalnak, hogy az idősödés folyamán olyan változások mennek végbe a mikrobiótában melyek az egészségi állapottal és a táplálkozással függnnek össze.

A bél mikrobiótában erőteljes változást a gyógyszerek, leginkább az antibiotikumok szedése okozhat (Tiihonen és mtsai., 2010). A legtöbb tanulmány szerint a *Clostridiumok* mennyisége megnő,

különösen az antibiotikum kezelés esetén, melyet a *Clostridium* fajok diverzitásának a növekedése is jellemez (Woodmansey, 2007). A széles spektrumú antibiotikumok használatának köszönhetően megnövekedhet a *C. difficile*-hoz hasonló patogén baktériumok mennyisége. A gyomor csökkenő savtermelése mikrobiális túlnövekedést idézhet elő a vékonybélben, amely gátolhatja a tápanyagok és vitaminok abszorpcióját (Tiihonen és mtsai., 2010). A végbél mikrobiótáját a gasztrointesztinális rendszerben végbemenő változások, a táplálkozás és a gazdaszervezet immunrendszerének a módosulása egyaránt befolyásolják (Woodmansey, 2007).

Megfigyelték, hogy az életkor előrehaladtával az életképes *Bacteroides* fajok mennyisége csökken, valamint azt is, hogy a folyamatot a többszöri antibiotikum kezelés felerősítette (Woodmansey, 2007). Kórházi ellátásban részesülő idős embereknél szintén felfigyeltek a *Bacteroides* mennyiségének a csökkenésére (O'Toole & Claesson, 2010). A proteolitikus baktériumok, mint a fusobaktérium, propionibaktérium és clostridium nemzetségbe tartozó fajok mennyiségének növekedése szintén megfigyelhető idősebb populációban (Woodmansey, 2007). Mitsuoka (1990) szerint idősebb korban a bifidobaktériumok száma csökken, míg ezzel párhuzamosan a *C. perfringens*, valamint a laktobacillusok, koliformok és enterokokkuszok mennyisége növekszik (Tiihonen és mtsai., 2010). Ezzel összhangban, Hopkins és mtsai (2001) szerint a bifidobaktériumok száma alacsonyabb volt az idősebb személyekben, mint a fiatalabbakban; azonban nem találtak eltérést a *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Enterobacterium* és *Clostridium* szintben a fiatalabb és az idősebb személyek között, valamint úgy találták, hogy a *Lactobacillusok* mennyisége nem nagyobb, hanem kisebb volt az idősek bélrendszerében (Tiihonen és mtsai., 2010).

A *Lactobacillus/Enterococcus* mennyiség megnő az idősök fekáliájában (Tiihonen és mtsai., 2010). Az idős bélnek az egyik legjellemzőbb tulajdonsága a kedvező bifidobaktériumok mennyiségének csökkenése. A számos bifidobaktérium faj mely az újszülöttekre és a felnőttekre jellemző egy-két domináns fajra csökken le az idősök esetén (Woodmansey, 2007). Kórházba utalt időseknél a bifidobaktérium mennyiség csökkent (O'Toole & Claesson, 2010). Ezzel szemben, He és munkatársai (2003) magasabb *Bifidobacterium* szintet figyeltek meg idősekben a fiatalokhoz képest (Tiihonen és mtsai., 2010). A korrallal az olyan kedvező baktériumok száma, mint a laktobacillusok és a bifidobaktériumok száma csökken (Zwiehler és mtsai., 2009). A korrallal az anaerobok száma csökken, míg a fakultatív anaerobok száma nő (Zwiehler és mtsai., 2009). Az enterobaktériumok, sztreptokokkusok, sztafilokokkusok és élesztők mennyisége megnő az idősödő bélben (Woodmansey, 2007). A *Bacteroides*, *Prevotella*, *Bifidobacteria* és *Lactobacillus* spp. faj diverzitása csökken, az *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcusok*, *Streptococcusok* és *Candida albicans* faj száma nő (O'Toole & Claesson 2010). Az össz diverzitása az idős bél mikrobiotának alacsonyabb volt, mint a fiatalabb felnőtteké (Zwiehler és mtsai., 2009).

A csökkent bélmozgás miatt a székrekedés egy idősekre jellemző probléma (Woodmansey, 2007). Az idősekre jellemző fiziológiai változásoknak köszönhetően, a béltartalom lassabban halad át a tápcsatornán ugyanakkor a súlya kisebb, és a bakteriális anyag tartalma is csökken. A hosszabb tartózkodási idő megnöveli a bakteriális fermentáció időtartamát. A bélbaktériumok összetételében történő változások, a diétában végbemenő kedvezőtlen módosulások és a bélben való áthaladáshoz szükséges idő megnövekedése elősegíthetik a

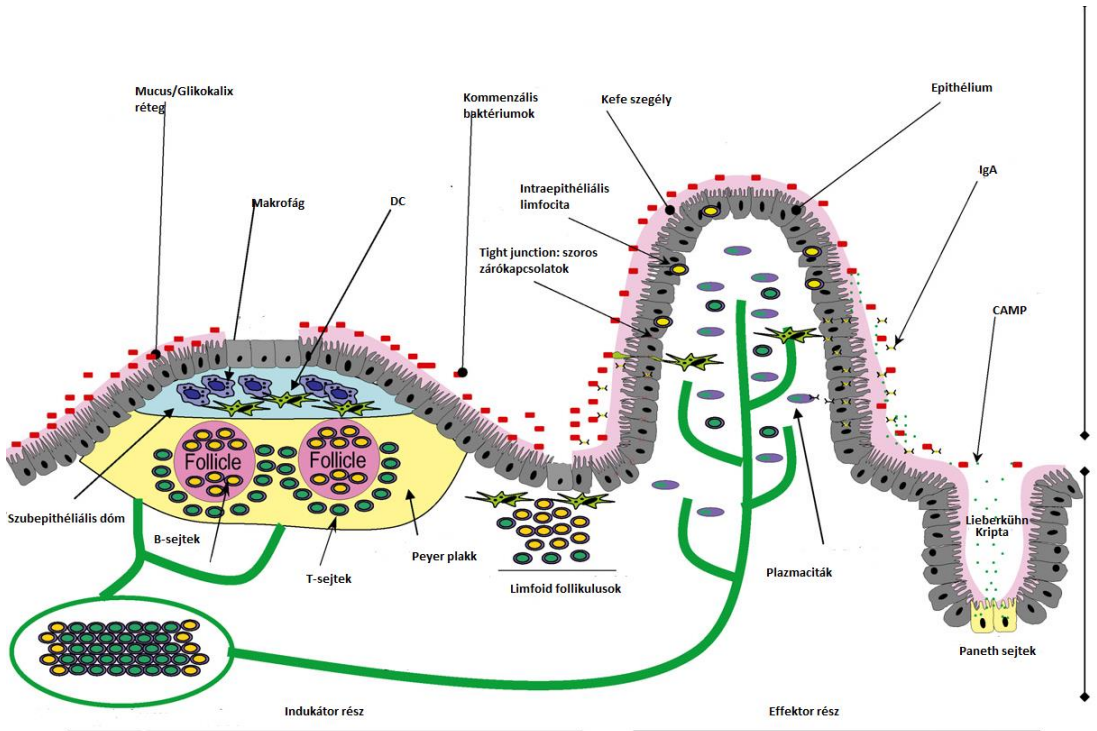
végbélben való rothadást és a nagyobb hajlamot a gasztroenteritiszre idősokban (Woodmansey, 2007). Az idősök fogazatának állapota, vagy hiánya miatt, a rágáskor kifejtett erő csökkenhet ezen, hatások illetve egyéb más élelmiszer összetevők befolyásolják a bél mikroorganizmusok növekedését. Az öregkorral társítható jelenség egy alacsony szintű szisztémikus gyulladás, amely az immunosenescencia (immunrendszer öregedése) része. A gyulladás szintjét az idősokban a bél mikrobióta szabályozza (O'Toole & Claesson, 2010). Az öregedéssel együtt járó változás a táplálkozásban, a betegségek előfordulásának megnövekedése, az ezzel együtt járó gyógyszer szedés megváltoztatja a mikrobiális közösség összetételét az emésztőrendszerben (Tiihonen és mtsai., 2010). Az idősodó bélben megnő a proteolitikus aktivitás, csökken az amilolitikus aktivitás és a rövid láncú zsírsavak szintje (Woodmansey, 2007). Az idősök széklet mintáiban a baktériumok összcsíraszám csökken (Zwiehler és mtsai., 2009). Előfordulhat, hogy a korrall járó gyulladással állapot okozza a változásokat a bél mikrobióta összetételében. Az idősöknél a fizikai mozgás hiánya miatt az intesztinális áthaladási idő megnő. A korrall a gyomorsav szekréció lecsökken és megnő a nyálkahártya permeabilitása (Rondanelli és mtsai., 2015).

A fekális bifidobaktériumok szintjének emelkedése önmagában nem előny az egészségre nézve, csak indikátora az intesztinális egészségnek (Tiihonen és mtsai., 2010). A bizonyítékok arra utalnak, hogy az egészséges idős személyek mikrobiális közösségének összetétele hasonló az egészséges felnőttekéhez. Az, hogy az egyén egészsége járul hozzá a mikrobióta stabilitásához vagy a fordított helyzet áll fenn, még ismeretlen (Voreades és mtsai., 2014).

2.7 A GALT

A GALT (bélhez kapcsolt limfoid szövet) a szervezet legnagyobb kiterjedésű immunszerve. Szoros kapcsolatban áll a többi nyálkahártya eredetű (mucosalis) immunszervvel, amelyek a nyálmirigyekben, az emlőmirigyekben, a tüdőben (BALT, tüdőhöz kapcsolt limfoid szövet) és az urogenitális nyálkahártyában találhatók meg. Alkotórészei sajátosan szervezett és nem szervezett részekre oszthatóak fel (5. ábra). A GALT szervezett részei a Peyer-plakkok, a vékonybél szoliter folliculusai és a mesenterialis nyirokcsomók. A szervezett rész az immunválasz kezdeti kialakulásának a helye. A nem szervezett részek a Lamina Propria, az intraepithéliális terek (felszíni epithélium és Lieberkühn-crypták) és az intraepithéliális limfociták. A nem szervezett részek az immunválasz elvezető részét képezik (Arató, 2013, Mowat és mtsai., 2004). A Peyer-plakkokat fedő epithélium sejtjei között találhatjuk az M-sejteket, melyeken a makromolekulák felszívódása történik. Az M-sejtek mintegy körbeölelik a közvetlenül alattuk elhelyezkedő limfocitákat, a makrofágokat, melyeknek az antigén bemutatásban fontos szerepük van, és a dendritikus sejteket. A Peyer-plakkokban elkötelezett limfociták tovább jutnak a mesenterialis nyirokcsomókba. A Lamina Propriában nagy számban találunk szétszórtan elhelyezkedő limfocitákat, plazmasejteket és makrofágokat. A limfociták fele T-sejt, a másik fele pedig B-sejt, melyek többségén IgA immunglobulin található, itt csak kevés IgG-izotípus található (Mowat & Bain, 2011). Az intraepithéliális limfociták az epithéliális sejtek között helyezkednek el, számuk az antigének mennyiségét tükrözi. A vékonybél nyálkahártya epithéliuma a Lieberkühn-cryptákban elhelyezkedő őssejtekből folyamatosan megújul. Többek között ezekből

az őssejtekből alakulnak ki az enterociták, a mucint képző kehelysejtek, az enteroendokrin sejtek és a Paneth-sejtek is (Leon, 2011).



5.ábra A GALT részei (Magalhaes és mtsai., 2007 nyomán)

2.7.1 A GALT védelmi vonalai

A bélhez kapcsolt limfoid szövet elsődleges védelmi vonala egy mechanikus védvonal, az úgynevezett tight junction. A tight junction az egészséges epithéliális sejtek sejt közötti szorosan elhelyezkedő kapcsolóstruktúrája, mely a passzív védelmet jelenti, és az epithel hámsejtek szoros kapcsolódásával képes fenntartani a bél nyálkahártya alacsony permeabilitását, így megakadályozni a patogének továbbjutását. Elhelyezkedését tekintve a nyálkahártyát, valamint a

kommenzalista bélbaktériumokat határolja el egymástól (Rosero, 2014). A következő védelmi vonal a nyálkahártya hámsejtjei által termelt antimikrobiális peptideké (AMP), amely mechanikai és kémiai barrier funkciót is betölt. Az AMP-k fő forrásai a Lieberkühn-cryptákban elhelyezkedő Paneth-sejtek, de az enterociták is termelnek különböző hatásspektrumú AMP-eket, például β -defensineket és cathelicidineket. A Paneth-sejtek által termelt legfontosabb AMP a HD-5, ezen kívül termelnek α -defensineket, lizozimot, szekretoros-foszfolipáz-A2-t és szekrécións leukocitaproteáz-inhibítort (SLPI) is (Shi, 2007). A termelt antimikrobiális anyagok nem csak a Gram-pozitív és -negatív baktériumok, gombák, vírusok és protozoák ellen hatásosak, hanem ezen kívül még a Lieberkühn-crypták alján található őssejtek védelmét is biztosítják. Ez a komplex összetételű glyocalix nyákréteg megakadályozza a patogén, és a kommenzális bélbaktériumok közvetlen kontaktját a bél nyálkahártyájával. Ez azt jelenti, hogy teljesen egészséges emberben, akinél ez a védelmi vonal tökéletesen működik, a bél hámsejtjeinek a közvetlen felülete steril (Agerberth & Gudmundsson 2006). Az antimikrobiális peptidek védelemben betöltött előnye, hogy gyulladásos reakció kiváltása nélkül biztosítja a mikroflóra és a nyálkahártya homeosztázisát. Továbbá, biológiai aktivitásuk révén hatnak az immunsejtekre is, a bél nyálkahártyában jelen lévő limfocitákra, az antigén prezentáló sejtekre, a makrofágokra és a dendritikus sejtekre (Menzel & Rogler 2009). Ha azonban a patogének mégis átjutnak ezen a nyákrétegen, akkor szembe találják magukat a következő, már az aktív védelmi vonalhoz tartozó biokémiai védelmi elemmel, a mintázat felismerő receptorokkal. A mintázat felismerő receptorok (PRR) a természetes immunválaszban részt vevő sejtek felszínén (pl.: antigén-prezentáló dendritikus sejtek felszínén) vagy

bármely intesztinális epithéliális sejten jelennek meg. A patogénekre jellemző struktúrát vagy molekuláris jellemzőt, vagyis egy kórokozó asszociált molekuláris mintázatot ismernek fel (Rasmussen és mtsai., 2009). A PRR receptorok gyorsan felismerik a patogéneket és az inváziót megkezdő mikrobákat is, és hatásukra, rájuk nézve kedvezőtlen körülményeket alakítanak ki. Először az antimikrobiális peptidek fokozott termelése indul meg, ez után immunmoduláló hatást indukálnak és a természetes immunvédekezés elemeit is mozgósítják. A jellemző mintázatok aktiválják a receptorokat és stimulálják a jelátviteli utakat, specifikus génexpressziót váltanak ki és ezáltal antimikrobiális és gyulladásos folyamatok alakulnak ki (Cario, 2005). A mintázat felismerő receptoroknak két csoportja van, a Toll-szerű (TLR) receptorok, amelyek a természetes immunválasz egyik központi elemét képezik, valamint a NOD-receptorok. A TLR-receptorcsaládnak jelenleg tíz receptora ismert, melyek főként a sejtfelszínen és az endoszómákban jelennek meg és akkor aktiválódnak, amikor a mikrobák megtapadnak a nyálkahártyán. A NOD-receptorok sejtek között, az endoszómákban és a citoplazmában találhatóak meg (Lapis, 2009, Menzel & Rogler, 2009). Láthatjuk, hogy a bél nyálkahártya barrier funkciója több lépcsős, jól szabályozott védelemmel rendelkezik, azonban bármely szabályozási pont sérülése bélgyulladás kialakulásához vezethet, amivel a mucosa épsége is sérül.

2.7.2 A GALT működése

A GALT-hoz kapcsolt immunrendszer működését az antigének idézik elő, melyek lehetnek például proteinek, vírusok vagy baktériumok. Az antigének először, az M-sejteken keresztül találkoznak a Peyer-

plakkokban elhelyezkedő limfocitákkal. Az M-sejtek alatt makrofágokat találunk, ezek prezentálják az antigént a CD4+ sejteknek. Az antigén bemutató sejtek először hidrolizálják, feldolgozzák, kisebb részekre bontják az antigéneket, ez után azok a sejt felszínre kerülnek, ahol az MHC II molekulákkal (HLA-DP, -DQ, -DR) egy komplexet képeznek. Az MHC-k a fő hisztokompatibilitási komplexek, kodominánsan öröklődő alloantigének. Az emberben HLA-nak nevezett sejt felszíni fehérjék. Két típusuk van az MHC I és II osztály. Feladatuk az antigénpeptidek bemutatása a T-sejtek számára (Falus, 1998). Ahhoz, hogy az aktív immunválasz kialakuljon, az antigén-prezentáló sejteken és a T-helper sejteken megtalálható, kostimuláló molekuláknak egymáshoz kell kapcsolódniuk. Az antigénnel történő első találkozást, amikor a T-helper sejtekből citokinek szabadulnak fel és kiváltják a T- és B-sejtek további aktivációját, primingnek nevezzük. A priming folyamata során a switch (átkapcsolás) révén IgA izotípusú bizonyos antigénekkal elkötelezett memória-B és T-sejtek képződnek. Citokintermelésük alapján többféle T-helper sejtípust különböztetünk meg. A T-helper-1, amely interleukin-2-t (IL-2), interferon- γ -t, lymphotoxint, tumornekrózis faktor- α -t (TNF- α) termel, szerepe a sejt közvetített immunválaszban van. A másik csoport, a T-helper-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 citokineket termel és a humorális immunválaszért felelős. A T-helper-1 és T-helper-2 citokinjei egymást kölcsönösen gátolják. A citokinmintázatuk alapján megkülönböztetünk T-helper-3 és T-regulátor-1 sejteket. A T-regulátor-1 sejtek csoportjához tartoznak az úgynevezett szupresszor sejtek, melyek a következők: a CD4+, CD25+ és a CD8+. Az elkötelezett T- és B-sejtek a nyirokerekken keresztül elhagyják a Peyer-plakkokat és a véráramba kerülnek. Útjuk során áthaladnak a mesenterialis nyirokcsomókon, ahol a primingon

átesett limfociták további érési folyamata történik. A véráramon keresztül a limfociták nagy része visszakerül a vékonybélbe (Arató, 2013)

Az orális tolerancia révén a bélbe kerülő antigénekkal szemben az immunrendszer szelektál, tehát nem alakul ki immunreakció/válasz minden egyes antigénre. Ezt a kontrollált felszívódást az antigének „mintavételezésének” nevezzük. A bélrendszer tartalmának specifikus immunológiai azonosítása az „oral tolerance”. Ha például az antigén bemutató sejtek felszínén nincsen aktivált kostimuláló molekula, amivel komplexet hozna létre az MHC-vel és ezzel aktiválná a CD4+ T-helper sejteket, akkor tolerancia alakul ki. Tolerancia alakul ki akkor is, ha a T-sejten a kostimuláló molekula a CTLA-4, ami az antigén-prezentáló sejtekhez kapcsolódik, és ezzel csökkenti a T-sejt aktivációját (Clair és mtsai., 2007). A harmadik gátló tényező lehet, hogy a CD+ dendritikus sejtek, retinsav termelésük által képesek gátolni a T-helper-1 és T-helper-2 sejtek immunválaszát (Matteoli és mtsai., 2010, Veldhoen & Brucklacher-Waldert, 2001).

2.8 A bél mikrobióta megváltozásával összefüggő betegségek

2.8.1 Gluténérzékenység

A coeliakia vagy más néven lisztérzékenység vagy gluténérzékenység, a vékonybél-nyálkahártya sorvadásával járó betegség. Ezt az immunmediált betegséget a gabonák magvainak tárolófehérjéi, a glutén és a rokon prolaminek válthatják ki. Pontosabban, a tünetek kialakulásáért a glutén alkoholban oldott fehérjefrakciója a felelős, ami a búzában a gliadin, a rozsban a hordein, az árpában a secalin. A pontos patomechanizmus máig még nem ismert, bizonyított viszont, hogy a

veleszületett és az adaptív immunitás, valamint egyéb környezeti faktorok is szerepet játszanak a kialakulásában. A ma ismert magyarázat szerint a coeliakiásokban a gliadin vékonybélnyálkahártya károsító oka a következő. A transzglutamináznak fontos élettani szerepe van, segíti a sebgyógyulást, stabilizálja a kötőszövetet és sejthalál (apoptózis) segítségével a többi sejtet védi. Ha intracellulárisan helyezkedik el, az antitestek nem férnek hozzá, nem indukál kóros folyamatokat, ha viszont a sejt közötti térbe jut, akkor fehérjével kapcsolódva (gliadin) már a szervezet ellenanyagként ismeri fel. A transzglutamináz képes magához kötni a gliadint, így egy transzglutamináz-gliadin komplex jön létre. Egészséges emberekben a Lamia Propriában lévő B-sejtek felismerik ezt a komplexet és a T-helper sejtek nem fogják indukálni a B-sejtek specifikus ellenanyag képződését. A betegségben szenvedők immunrendszere reagál a komplexre, a B-sejtek felveszik, feldolgozzák és a specifikus CD4+ T-sejtek bemutatják. Aktiváció történik, ha van DQ2 vagy DQ8 hisztokompatibilis antigén, ekkor a T-sejtek aktiválódnak, megindul a citokin termelés és ez által a B-sejtek antitranszglutamináz antitesteket fognak termelni (Sollid és mtsai, 1997). Minden coeliakiásban kimutatható a HLA-DQ2 vagy-DQ8 (human leukocyte antigen) antigén, ez a populáció 20-30%-ban ugyanígy előfordul, de természetesen a betegség előfordulása ennél jóval alacsonyabb, egy százalék körüli. Ez is bizonyítja, hogy a környezeti faktoroknak is jelentős szerepük van a betegség kialakulásában (Akobeng és mtsai., 2006). A betegség klasszikus tünetei a felszívódási zavarral összefüggő testsúly-csökkenés, nagy tömegű zsíros széklet, hasmenés, puffadás, vérszegénység, bőrtünetek, dermatitis psoriasis. A glutén mentes étrend követésével a tünetek teljes mértékben megszűnnek.

2.8.2 Gyulladásos bélbetegségek

A gyulladásos bélbetegségek csoportjába tartozik a Crohn-betegség (CD), a colitis ulcerosa (fekélyes vastagbélgyulladás) (UC) és az irritábilis bélszindróma (IBS). Míg a Crohn-betegség a teljes tápcsatorna hosszát, bárhol érintheti, addig a colitis ulcerosa csak a vastagbél területére jellemző. A tünetek között jelentkezik a hasi fájdalom, puffadás, többszöri székletürítés, hasmenés, vagy székrekedés, olykor véres széklet. Három klinikai megjelenési formát írtak le, az elsődlegesen hasmenéssel, az elsődlegesen székrekedéssel és a kettő váltakozásával járó tünet együttest. Az IBS az egyik leggyakoribb funkcionális bélbetegség, az iparosodott országokban a népesség 10-20%-át érinti (König & Brummer, 2014). Genetikailag hajlamosító faktorok is szerepet játszanak a kialakulásában, de táplálkozási és életmódbeli szokások is befolyásolják. Kialakulásuk oka egyértelműen még nem ismert, a genetikai és környezeti tényezők mellett az immunológiai tényezőknek is komoly befolyásoló hatása van. A hajlamosító gének többsége a veleszületett adaptív immunitásban, az epithéliális permeabilitásban és a baktériumok intracelluláris feldolgozásában játszik szerepet. Összességében több okra vezethető vissza a gyulladásos betegség kialakulása. Újabb vizsgálatok kimutatták, hogy a gyulladásos bélbetegségben szenvedők és az egészségesek bélflórájának összetételében eltérés tapasztalható. A betegeknél a bél mikrobióta diverzitásának csökkenése figyelhető meg. A bifidobaktériumok száma csökken, míg a *Bacteroides* és *Clostridia* törzsek mennyisége nő (Parkes és mtsai., 2012). Ez komoly kockázatot jelent a diszbiózis kialakulására. A bél nyálkahártyájának és a bél

mikrobiota közösség szimbiózisának megváltozása igen nagy kockázati tényező az IBS megjelenésében (Fehér és mtsai, 2014). A betegségre jellemző elváltozás, a bél-nyálkahártyája által szekretált probakteriális anyag (mucin) és antibakteriális anyagok (lizozim, defensin, cathelicidin) abnormális szekrécija. A nyák-termelés minősége és mennyisége megváltozik, termelődhet fokozottabb vagy csökkent mértékben, mely okozhatja hasmenés kialakulását. Ennek következtében a jótékony probiotikumok sem képesek a kitapadásra és kolonizációra, így kedvező hatásukat sem képesek kifejteni. A másik jellegzetes elváltozás az úgynevezett leaky gut (áteresztő bél) szindróma, vagyis a nyálkahártya barrier funkcióinak a zavara (Gecse és mtsai., 2012). A barrier funkció károsodása, a patogének transzlokációjához vezet. A bélnyálkahártyán átjutó makromolekulák kötődnek a bélfalban lévő hám-, ideg-, immun, és hajszálér sejtjeikhez, ezáltal kórosan befolyásolhatják a helyi és az általános immun-, idegi-, és anyagcsere folyamatokat (Keita-Söderholm, 2010).

2.8.3 *Tejfehérje allergia*

A tejallergiát a tejben található fehérjék váltják ki, leggyakrabban az alfa-laktalbumin, béta-laktoglobulin és a kazein. A genetikai faktorok is szerepet játszanak, hiszen ha mindkét szülőben előfordul a betegség, akkor a gyermekben való kialakulásának a valószínűsége 23% körül van, míg egyéb esetben csupán 2-3%. A tünetekért a nem IgE-mediált sejtközvetített immunreakció felelős. A leukocita migrációt gátló faktor és a tumornekrózis-faktor-alfa felszabadulása fokozott, mely növeli a bél permeabilitását. A jellegzetes tünetek a tejfehérjét tartalmazó élelmiszer elfogyasztása után jelentkező diszkomfort érzés, puffadás, hasmenés. Ha

a tejfehérjét teljes mértékben elhagyják, a tünetek megszűnnek, azonban tejexpozíció esetén ismét jelentkeznek (Arató, 2013).

2.8.4 *Diszbiózis*

Fertőzést vagy antibiotikumos kezelést követően a mikroflóra számában és összetételében komoly változás következik be. A kommenzális baktériumok csökkenése tapasztalható a patogének javára. Ennek következtében a jótékony bélbaktériumok helyett a patogének és/vagy szaprofita baktériumok fejtik ki stimuláló hatásukat a gazdaszervezet bélnyálkahártyájára, ez a neuroimmun és az anyagcsere folyamatok túlműködését (upregulation) generálja, melynek következtében helyi vagy szisztémás gyulladás alakul ki. A gyulladás kialakulása mellett a tápanyag felhasználásban, megemésztésében is zavar támad. A diszbiózis nemcsak lokális bél nyálkahártya gyulladást okozhat, hanem szisztémikus hatása miatt számos más betegség kiváltó oka is lehet. A bélflóra megváltozása nemcsak a gyulladásos bélbetegségben, például irritábilis bél-szindróma, Crohn-betegség, colitis ulcerosa, tapasztalható, hanem a 2-es típusú diabétesz, hipertónia, elhízás, carcinoma, arteriosclerosis, Alzheimer-kór és Parkinson-kór esetében is felléphet változás (Turnbaugh & Gordon, 2009). A test más pontján fellépő megbetegedések egyik példája a szem felszíni nyálkahártyáján, a szaruhártyán, kötőhártyán különösebb kiváltó ok nélkül kialakuló gyulladás. A tünetekre jellemző a száraz vagy épp ellenkezőleg könnyező szem, diszkomfort, idegen test, égető, csípő, szárazság, fáradtság vagy homokszemcse-érzés. Továbbá, fokozott érzékenység fényre, füstre, és mindehhez társul a kötőhártya és a szemhéjak duzzanata, vérbősége. Tipikus tünet még, hogy nyúlós nyák termelődik a

szemzugban. A bélrendszeri és a szempanaszok hasonlósága, és a jellegzetes tünetek miatt az irritábilis szem szindróma (IES) elnevezést használják a tünet együttes elnevezésére. A megfigyelések szerint az IBS gyakran társul pszichés tünetekkel, például szorongás, depresszió, levertség, alvászavar, fáradtság, összpontosítás hiánya, szexuális apátia (Wu, 2012). A jellegzetes tünet együttesre pedig az irritábilis elme szindróma (IMS) elnevezést használják.

2.8.5 Bakteriális transzlokáció

Bakteriális transzlokációnak nevezzük az életképes baktériumok és az élettelen baktériumok alkotórészeinek vagy toxikus termékeinek a bélnyálkahártya barrieren keresztül történő átjutását, akár a mucosaba vagy extraintestinalis szövetekbe, valamint a szisztémás keringésbe. A bakteriális alkotórészek lehetnek expoliszacharidok (EP) a baktérium külső részéből, peptidoglikánok (PG) a bakteriális sejtfalból és nukleinsav (DNS) a sejtplazmából (Fehér, 2014). A transzlokáció két feltételezett mechanizmusa a transzcelluláris permeabilitás és a paracelluláris permeabilitás. A transzcelluláris permeabilitás az epithelsejtek membránjában található csatornákon és pumpákon keresztül történő transzlokáció, például a *Salmonella* fajtákra, és a *Listeria monocytogenes*-re jellemző. A paracelluláris permeabilitás a tight junctionok károsodása miatt következik be, amikor a bélfal permeabilitása nő (Beutheu és mtsai., 2012). A bakteriális transzlokáció bizonyos mértékig nem kóros jelenség és egészséges emberben is tapasztalható, úgy, hogy közben nem alakul ki gyulladós betegség (Lichtman, 2001). A bakteriális transzlokáció molekuláris hátterének vizsgálata és a szöveti szintű kimutatása nem egyszerű,

mintavételezésére laparotómiát kell alkalmazni, illetve kevés a diagnosztikai eljárás és a klinikai adat. A transzlokáció első lépésében a baktériumok a mucosát kolonizálják, ez után a védelmi vonalon továbbjutott kórokozók nagy részét a GALT makrofágjai és limfocitái elpusztítják, a túlélő baktériumok a makrofágokkal együtt a mesenterialis nyirokcsomókba jutnak. A baktériumok pontos szóródási útvonala a mai napig nem ismert, de első lépésben bizonyosan a mesenterialis nyirokcsomókban telepsznek meg és innen szóródhatnak tovább. A mucosa kolonizációja a nyálkahártya helyi gyulladását váltja ki, ez immunválaszt indukál, majd ezt követően az immunrendszer intenzív stimuláló hatás alá kerül, amely a szervezet gyulladásos egyensúlyának eltolódásához vezet. Így alakulhat ki a szisztémás gyulladásos válasz szindróma (SIRS), a fertőzés által kialakult szisztémás gyulladásos választ pedig szepszisnek nevezzük. Ha a szepszis hosszú ideig fennáll, akkor több szervi működési zavar (MODS) alakul ki, és ez több szervi elégtelenség (MOF) kialakulását vonja maga után. A nyálkahártya sérült barrier funkciója következtében megnő a bél permeabilitása, elszaporodnak a káros baktériumok, az effektív immunválasz hiánya esetében bakteriális transzlokáció alakulhat ki, amely nagy valószínűséggel a több szervi elégtelenség (MOF) kialakulásához vezet (Rosero, 2014).

2.9 A humán emésztőrendszer *in vitro* modellezése

Az *in vitro* humán emésztési vizsgálatokhoz képest, melyek folyamatai úgymond „lombikban” játszódnak le, kétségkívül hitelesebb eredményeket kapunk a humán klinikai vizsgálatok elvégzésével. Mindemellett, miközben az *in vitro* vizsgálatok hátrányairól és esetleges

„hibáiról” beszélünk, fontos figyelembe venni a klinikai vizsgálatok hátrányait is. A humán vizsgálatok kivitelezéséhez igen nagy mintaszámra van szükség, hogy az egyedi tényezők hatását (életkor, különböző életmód, betegségek, stb) kiküszöböljük (Payne és mtsai., 2012). A magas költség és időigényesség mellett számos etikai probléma is fellép a vizsgálatok során. A pontos vizsgálat érdekében laporoszkópos mintavétel szükséges, azonban az invazív mintavétel drasztikusnak bizonyul a pácienseknél. A legtöbbször tehát széklet mintát vesznek, azonban a széklet baktérium összetétele már eltér a bél nyálkahártyában található ökoszisztémától (Eckburg és mtsai., 2005, Marchesi, 2011).

Az *in vitro* és a klinikai vizsgálatok egyaránt rendelkeznek előnyökkel és hátrányokkal, éppen ezért célszerű az *in vivo* és *in vitro* emésztési modelleket egymással kiegészíteni. Az emésztési modellek előzetes alkalmazásával nemcsak megalapozhatjuk a klinikai vizsgálatokat, de pl. a potenciálisan funkcionális élelmiszer összetevők kiválasztása során le is csökkenthetjük a vizsgálandó anyagok számát, és a modellek egyszerűbb jellegének köszönhetően jobban megérthetjük a különböző anyagok élettani hatásmechanizmusát. Az *in vitro* emésztési modellek könnyen reprodukálhatóak, mivel kizárják az egyéni tényezők által okozott szórást, azonban az *in vitro* emésztési modellek soha nem fogják az *in vivo* rendszer komplexitását teljes mértékben reprodukálni. Ennek a legfontosabb okai, hogy általában nincs modellezve az epitheliális nyálkahártya, nincs kölcsönhatás a gazda szervezet immunrendszerével, valamint nem állnak a neuroendokrin rendszer szabályozása alatt (Williams és mtsai., 2015). Nem lehet kiváltani velük a humán klinikai vizsgálatokat, azonban elősegíthetik az *in vivo* kísérletek számának célzott redukálását. Ezen kívül, azáltal, hogy

pontosan ismerjük és szabályozhatjuk az emésztőnedv összetevőinek mennyiségét, eloszlását, elősegíthetik a vizsgált minták bioaktív komponensei hatásmechanizmusának a jobb megértését. Például figyelemmel lehet követni, hogy a szubsztráttól, inhibítortól, szimulált betegségtől függően hogyan változik a mikrobióta (Williams és mtsai., 2015).

2.9.1 Emésztési modellek

Az *in vitro* emésztési modellek folyamatos fejlődésen mennek keresztül, amit elősegít, az *in vitro* modellek által kapott eredmények összevetése, az *in vivo* modellek és a klinikai vizsgálatok során kapottakkal. A szakirodalomból ismert, különböző *in vitro* fermentációs modellek előnyeit és korlátait a 4. táblázatban mutatom be.

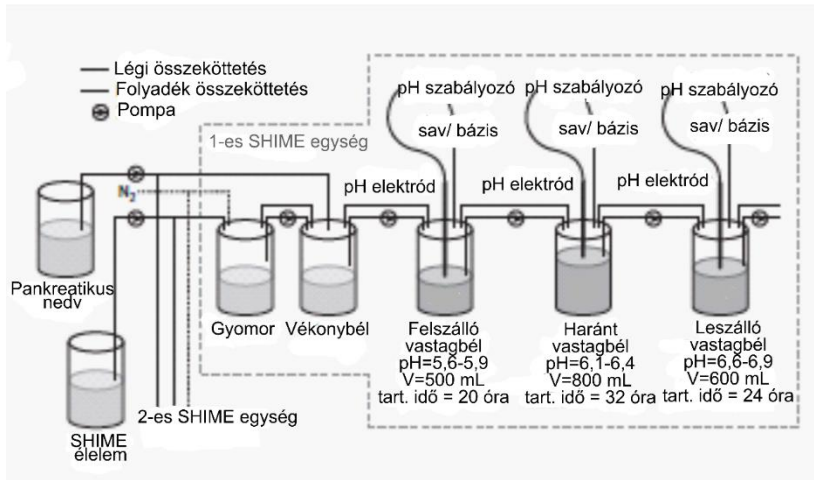
4. táblázat Az *in vitro* fermentációs modellek előnyei és korlátai (Payne és mtsai., 2012 nyomán)

Modell	Előny	Korlát	Hivatkozás
Kevert kultúra („batch culture”)	Könnyen összeállítható, fermentációs tanulmányok szempontjából előnyös, különösen szubsztrát emésztés tanulmányozása során.	Rövid időtartamú fermentációs tanulmányokat tesz lehetővé, mikrobiológiai ellenőrizhetőség gyenge.	Pompei és mtsai., 2008; Gumienna és mtsai., 2011
Folyamatos kultúra	Az <i>in vivo</i> körülményeket szimuláló folyamatos áramlás. A környezeti tényezők jól ellenőrizhetők.	Nincs gazda szervezet funkcionalitás. A kísérleteknek idő korlátja van (napok vagy hetek).	Maccaferi és mtsai., 2010; Duncan és mtsai., 2009
Több stádiumú folyamatos kultúra	Folyamatos áramlás több edényben, melyek az emésztő rendszer különböző szakaszainak körülményeit utánozzák.	Nincs gazda szervezet funkcionalitás. A kísérleteknek idő korlátja van (napok vagy hetek).	Van-den-Abbeele és mtsai., 2010; Maccaferi és mtsai., 2010
Immobilizált folyamatos kultúra	Magas sejt sűrűség, egy folyamatos fermentációs rendszer hosszú távú	Nincs gazda szervezet funkcionalitás.	Le Blay és mtsai., 2009; Zihler és

	stabilitása, immobilizált fekális mikrobiótával.		mtsai., 2010
Mesterséges emésztő rendszer	Folyamatos áramlás, mely során a metabolitok és a víz az <i>in vivo</i> körülményeknek megfelelően cserélődnek ki.	Nincs immun és neuroendokrin válasz, a kísérletek időtartama néhány napra korlátozódik.	Blanquet-Diot és mtsai., 2009; Kovatcheva-Datchary és mtsai., 2009

A humán mikrobiom modellezése érdekében beoltott baktériumok növekedése ezekben a rendszerekben a beoltáskor használt baktérium koncentrációtól és a szubsztrát fogyásának mértékétől függ. Az alacsony koncentrációban beoltott rendszerek tipikus S-formájú növekedési görbét mutatnak, ami a kezdeti magas tápanyag koncentrációnak köszönhető. Idővel tápanyag hiány lép fel és toxikus termékek halmozódnak fel, ami a növekedés leállításához vezet. A magas koncentrációban beoltott rendszerek korlátolt növekedésűek (Payne és mtsai., 2012). Az *in vitro* bél fermentációs modellek esetén a humán bél mikrobióta reprodukálhatósága és funkcionális stabilitása megkérdőjelezhető (Payne és mtsai., 2012).

A legelterjedtebben használt bél szimulátor a három stádiumú folyamatos kultúra rendszer, a SHIME[®] (6. ábra) (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem – Az emberi bél mikrobióta által alkotott ökoszisztéma szimulátora), az EnteroMix, a Lacroix modell és a TIM egység (Marzorati és mtsai., 2014).



6.ábra A SHIME *in vitro* emésztési modell vázlatos ábrázolása (Williams és mtsai., 2015 nyomán)

Az EnteroMix modell esetében négy párhuzamos mintát lehet elemezni úgy, hogy inokulumként ugyanazt a fekális mintát alkalmazzuk (Williams és mtsai., 2015). A Lacroix modell esetén a paraméterek a csecsemő bélre specializáltak (Venema & van den Abbeele, 2013). A széklet inokulumot 1-2 mm átmérőjű gél gyöngyökön immobilizálják, melyek gellangumiból, xantán gumiból és nátrium citrátból állnak (Venema & van den Abbeele, 2013). A SHIME rendszer esetében a stabilizálási időszak két hét (Williams és mtsai., 2015). Ez az időszak nem csak az *in vitro* körülményekhez való alkalmazkodáshoz szükséges, hanem ahhoz is, hogy a mikrobióta a fekálistól a vastagbél régiókra specifikus mikrobiótává alakuljon (Venema & van den Abbeele, 2013). A TWINSHIME rendszer esetén két mintát lehet vizsgálni párhuzamosan (Williams és mtsai., 2015).

A TIM rendszerek esetében nemcsak a pH, de a perisztaltikus mozgás, az enzim szekréció és aktivitás, az epesók koncentrációja, az

áthaladási idő és a felszívódási képességek is kontrollálhatóak (Williams és mtsai., 2015). A szilikon membrán miatt a falak rugalmasak, a bél perisztaltika jól modellezhető (Venema & van den Abbeele, 2013). Jobb, mint a mágneses keverés, mert a viszkózus anyagok is megfelelően keverednek és szállítódnak. A TIM-2 esetén 10 mintát lehet párhuzamosan vizsgálni (Venema & van den Abbeele, 2013). Az előbbieknél fejlettebb nyálkahártya modellek és gazdaszervezet-mikrobióta interakciós modellek immobilizált mucint és sejtvonalakat is alkalmaznak (Williams és mtsai., 2015).

Számos publikációban alkalmazzák vastagbél fázisnál a rövid távú keverék („batch”) inkubációt. A rendszer lehetővé teszi, hogy hatékonyan és gyorsan eredményeket kapjunk. A körülmények azonban távol vannak a fiziológiáitól. Ennek az egyik oka az, hogy felgyűlnek olyan mikrobiális metabolitok, amelyek gátolják a további mikrobiális aktivitást. Ezért ahhoz, hogy az adott szubsztrátum fermentációja végbe menjen, 24 órás vagy hosszabb inkubációs idő szükséges (Venema & van den Abbeele, 2013).

2.9.2 *A bél epithelium in vitro modellezése*

A probiotikumok egyik fontos kiválasztási szempontja, hogy milyen mértékben képesek megtapadni a bél nyálkahártyán. Továbbá, a kedvező élettani hatást, amely az immunrendszerre kifejtett moduláló hatás által jön létre, csak úgy képesek kifejteni, ha közvetlen kapcsolatba lépnek az immunsejtekkel. Egy adott baktérium kezdeti kitapadása a vékonybél felszínén található cukor származékok, a glikolipidek és glikoproteinek felszíni részeinek felismerése révén történik (Cencič & Langerholc, 2010). Ezt a folyamatot bifidobaktériumok és laktobacillusok esetén

mutatták ki. A baktérium első lépésben reverzibilis fiziko-kémiai kölcsönhatásba lép a bél nyálkahártyájával, melyet már egy specifikus megkötődés követ, amely a baktérium felületén jelen lévő adhéziós molekulák, az adhezinek és az epithéliális sejt receptorai között jön létre (Miron és mtsai., 2001).

A baktériumok *in vitro* adhéziós vizsgálatát humán eredetű vastagbél karcinóma sejtvonalakkal lehet vizsgálni, melyeknek számos fajtája létezik, a teljesség igénye nélkül pl. HT-29, Caco-2, mucus szekretáló HT-29-MTX. Ezen sejtvonalak strukturális és funkcionális differenciálódása nagyon hasonlít az emberi bél érési folyamataihoz. A sejtvonalak alkalmazásai, fenntartási körülményei és az azokkal történő vizsgálatok kutatócsoportonként változnak. Fontos megjegyezni, hogy mindezen hatások befolyásolják és megnehezítik az eredmények összehasonlíthatóságát (Sambuy és mtsai., 2005). Széles körű alkalmazásuk ellenére a Caco-2 és a HT-29 tumorogén sejt vonal távol áll a tökéletes *in vitro* modelltől (Cencič & Langerholc, 2010). Ennek az egyik oka, hogy kevert vastag- és vékonybél fenotípust mutatnak, a másik az, hogy a karcinogén sejteknek a sejt felszíni szénhidrát összetétele eltér a normális sejtektől (Cencič & Langerholc, 2010).

A sejtvonalak beszerzése történhet az ATCC-től (az amerikai sejtenyészet gyűjteményből) vagy ECACC-től (a hitelesített európai sejtenyészet gyűjteményből), melyek aktuálisan 20-40 passzálnál tartanak. Első lépésként a sejtvonalat passzálni kell, és fenn kell tartani. A passzálastól eltelt pár nap után a sejtvonal konfluensé (összenőtté) válik, ekkor kifejeződnek a hámsejt, kehelysejt és bél hámsejt fenotípusok.

A tight-junction (szorosan egymás mellé rendeződő kapcsolatok) fehérjék kifejeződésével létrejön az epithéliális barrier integritása, és

kialakul a szelektív módon áteresztő membrán (Cencič & Langerholc, 2010). Ennek a membránnak az transzepithéliális ellenállását mérhetjük a TER-el (trans epithelial resistance). Ha a Caco-2 sejtvonalat egy rétegben tenyésztjük („monolayer”) akkor vékonybél mikrovilluszokkal rendelkező epithéliális sejtekké differenciálódnak, „tight junction” alakul ki köztük és vékonybél hidroláz aktivitással fognak rendelkezni (Williams és mtsai., 2015). A Caco-2 sejtréteg növesztése során fontos, hogy a sejtréteg morfológiáját ellenőrizzük (Hubatsch és mtsai., 2007). Ellenőrizni kell az inzerten való megfelelő növekedést, valamint azt, hogy a tápoldat komponensek cseréjekor nem történt e semmilyen morfológiai változás (Hubatsch és mtsai., 2007).

A 3D modelleket nem rákos eredetű bél epithéliális sejt vonalból hozzák létre, mikroporózusos membránon növesztik őket, ami lehetővé teszi a sejtek polarizációját és a TER kialakulását (Cencič & Langerholc, 2010). A mikroporózusos membrán alatt (bazolaterális oldal) az immunsejtek fekszenek (makrofágok, dendritikus sejtek), melyek a nyálkahártya limfoid szövetet utánozzák. A bél mikrobióta a membrán felső része fölé adagolható, így lehetőség van a mikrobióta hatásainak tanulmányozására (Cencič & Langerholc, 2010). Ez a három komponens (epithélium, immunsejtek és mikrobióta) a bél legfontosabb faktorait képezik, aminek köszönhetően a 3D modellek közelíthetnek az *in vivo* helyzethez (Cencič & Langerholc, 2010). Más tanulmányok *ex vivo* módszereket alkalmaznak, melyekhez az élő szövet életképességét kell fenntartani (Williams és mtsai., 2015), például humán bél biopszia mintákat vagy állati szerveket, *in vitro* alkalmaznak hosszabb időn keresztül, biztosítva az *in vivo* helyzetnek megfelelő környezetet.

3. A disszertáció célkitűzései

PhD kutatómunkám fő célja egy olyan tejjari melléktermékkel (savóval) kiegészített ivójoghurt jellegű termék előállításának megalapozása volt, amely összetételénél fogva pro- vagy szinbiotikus, azaz a bél ökoszisztéma stabilizálásával egészségmegőrző hatású lehet. Továbbá vizsgáltam a LA-5 és BB-12 probiotikumok élettani hatásának megnyilvánulását attól függően, hogy milyen vivőanyagban (élelmiszer-mátrix-szal, vagy étrendkiegészítő kapszulában) történik a bejuttatása.

A vizsgálati munkák előtt a következő fő célkitűzéseket fogalmaztam meg:

- Technológiai vizsgálatok elvégzése a termékgyártás jövőbeni megalapozása érdekében. A tejből és tej-savó elegyből készült hagyományos, probiotikus és szinbiotikus termékek mikrobiológiai, kémiai és érzékszervi jellemzőinek, valamint funkcionális technológiai szempontjainak vizsgálata a gyártást követően és a tárolás során. Annak megállapítása, hogy a pro- és a prebiotikum, valamint a savó kiegészítés milyen hatást gyakorol ezekre a tulajdonságokra, megfelel-e a probiotikus csíraszám az előírásoknak, illetve van-e jelentős változás a termékek hűtve tárolása során.
- Szimulált humán emésztési vizsgálatok elvégzése annak megítélésére érdekében, hogy milyen mértékű a hasznos baktériumok túlélése az emésztés során. A tejből és tej-savó elegyből készült hagyományos, probiotikus és szinbiotikus termékek, valamint az étrendkiegészítőként használt probiotikus kapszulák összehasonlítása abból a szempontból, hogy a vizsgált, élettanilag előnyös tulajdonságokkal rendelkező baktériumok

milyen mértékben jutnak el *in vitro* körülmények között hasznosulási helyükre, a vastagbélbe.

- A probiotikus hatás előfeltételeinek megítélése érdekében a joghurt starterkultúra és a vizsgált probiotikus törzsek bélhámsejtekhez való tapadási képességének vizsgálata hidrofobicitás és adhéziós vizsgálattal *in vitro* körülmények között.
- A joghurt starterkultúra és a vizsgált probiotikus törzseknek a gyulladós folyamatokban játszott szerepének megfigyelése *in vitro* körülmények között.
- Annak vizsgálata, hogy tejből készült hagyományos és probiotikus termékek, valamint az étrendkiegészítőként használt probiotikus kapszulák milyen mértékben képesek enyhíteni a mesterségesen kiváltott vastagbélgyulladás (colitis) tüneteit állatkísérletekben.

4. Anyagok és módszerek

4.1 A vizsgált termékek előállítása, gyártása

A joghurt jellegű készítmények előállítása a Kaposvári Egyetem (MATE Kaposvári Campusának jogelődje) Technológiai Laboratóriumában, a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Élelmiszer-tudományi Kutatóintézetében, valamint az INRAE Micalis Kutatóintézetében (Jouy-en-Josas, Franciaország) történt. A fermentált tejtermékek elkészítéséhez zsíros tejport, illetve édes savóport (Obert Kft, Kaposvár) használtam fel, melyből a termék specifikációjában leírtaknak megfelelő rehidratálással állítottam elő a felhasználásra kész tejet és az édes savót. A prebiotikumot tartalmazó termékekhez 3% Frutafit Inulin IQ inulint (DP \geq 9) (Sensus, Roosendaal, Hollandia) adagoltam. A két alapanyagot külön-külön hőkezelttem, a tejet 90 °C-on 10 percen keresztül, a savót 60°C-on 10 percen keresztül melegítettem vízfürdőben. A maghőmérséklet alakulása a tej esetén elérte a pillanat pasztörözési módnál alkalmazott 85°C-ot, a savónál a kíméletes hőkezelési módnak számító 60°C-ot. Ezt követően a savós-tejes alapanyagokat 50-50%-ban összekeverttem, 40°C-os beoltási hőmérsékletre hűtöttem és egyszerre adagoltam az FD-DVS YF-L812 Yo-Flex (Chr. Hansen A/S, Horsholm, Dánia) többszörösen kevert törzsű starter kultúrát, mely *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*-t és *S. thermophilus*-t tartalmazott, valamint a probiotikus, *B. animalis* spp. *lactis*-t és *L. acidophilus*-t tartalmazó FD-DVS BB-12 és LA-5 (Chr. Hansen A/S, Horsholm, Dánia) kultúrát. Kontrollként olyan mintákat is készítettem, melyekben az alapanyag nem tartalmazott savót, hanem csak tejet, ebben az esetben a hőkezelés a tej alapanyagra vonatkozóan, majd az azt követő beoltás a savót

tartalmazó mintákkal azonos módon történt. A starter mikrobákat a joghurt állag eléréséhez szükséges, a gyártó által megadott mennyiségben (0,02%-os beoltási arányban), a probiotikus kultúrát pedig 10^8 CFU/ml termék mennyiség eléréséig adagoltam a hőkezelésen átesett alapanyagokhoz. A beoltott tej, illetve savó-tej keveréket ez után steril csavaros mintatartó edényekbe öntöttem és $40\text{ }^\circ\text{C}$ -os alvasztási hőmérsékleten 5 órán keresztül, a kívánt 4,55-ös pH eléréséig alvasztottam. Az alvadékokat ezt követően hűtőbe helyeztem és $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 24 óra hosszan hidegérleltem. A szintén vizsgált Bonolact[®] Pro+biotikum kapszulák (Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, Mosonmagyaróvár), *B. animalis* spp. *lactis* BB-12-t és *L. acidophilus* LA-5 baktériumtörzseket tartalmaztak liofilizált formában, cellulóz kapszulában TransMatrix[™] védőkupakos csomagolásban. Egy kapszulában 10^8 CFU/kapszula/db mennyiségű baktérium volt, mindkét törzsre vonatkozóan. A baktériumok mennyisége bizonyítottan konstans volt a megadott lejáratú időn belül, a speciális TransMatrix[™] védőcsomagolásnak köszönhetően. A vizsgálati mintákat és azok összetételét az 5. táblázat szemlélteti.

5.táblázat A joghurt jellegű készítmények és a táplálékkiegészítő kapszula összetétele (alapanyagok és felhasznált baktériumkultúrák).

Alapanyag és kultúra	Kísérleti termékek			
100% tej	<u>Hagyományos joghurt=HJ</u>	<u>Probiotikus joghurt=PJ</u>	<u>Szinbiotikus joghurt=SZJ</u>	<u>Kapszula=K</u>
Felhasznált baktérium kultúra	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (YF-L812)	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (YF-L812) + <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12, <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> LA-5	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (YF-L812) + <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 + inulin (3%)	<i>Bifidobacterium</i> <i>animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12, <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> LA-5 Bonolact® Pro+Biotikum liofilizált baktérium kultúra cellulóz burokban TransMatrix™ csomagolásban
50% tej 50% savó	<u>Savós hagyományos joghurt=SH</u>	<u>Savós probiotikus joghurt=SPJ</u>	<u>Savós szinbiotikus joghurt=SSZJ</u>	
Felhasznált baktérium kultúra	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (YF-L812)	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (YF-L812) + <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12, <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> LA-5	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (YF-L812) + <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 inulin (3%)	

4.2 *Technológiai vizsgálatok*

4.2.1 *Mikrobiológiai vizsgálatok*

A termék tárolás alatti csíraszám változás ellenőrzéséhez hagyományos mikrobiológiai szélesztéses vizsgálatot végeztem el, 5 mintavételi időpontban, a termék előállításának napjától számított 1., 7., 14., 21. és végül a 28. napon. Előzetesen a minták egy grammjából hígítási sort készítettem, majd a szuszpenziót szelektív táptalajra juttattam és az inkubációs idő letelte után leolvastam a telepképző egységek számát. Az összes laktobacillus szám meghatározását MRS-agaron (Carl Roth Co., Karlsruhe, Németország) végeztem 37°C-on, 72 órán keresztül tartó inkubációt követően. A bifidobaktériumok számának ellenőrzéséhez BSM (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, US) táptalajt használtam, az anaerob tenyésztést 37°C-os inkubációs hőmérsékleten végeztem, 72 órás inkubációs időn keresztül.

4.2.2 *Érzékszervi bírálat*

Az érzékszervi bírálaton a Kaposvári Egyetem (MATE Kaposvári Campusának jogelődje) dolgozói, valamint hallgatói közül 14 fő vett részt, a nemek aránya 60% nő és 40% férfi volt. A bírálaton részt vevő személyek, előzetes érzékszervi tréningen sajátították el a hagyományos natúr joghurt és ivójoghurt karakterisztikai tulajdonságait, melyre a későbbi, pontos összehasonlíthatóság céljából volt szükség. A bírálat kivitelezése jól megvilágított, klimatizált, 21°C-os helységben történt, ahol a bírálók egymástól elszeparálva helyezkedtek el. A vizsgált termékek átlátszó műanyag poharakban, azonos mennyiségben, random számozással ellátva, fehér tálcán kerültek a bírálókhoz. A bírálók a kísérleti termékekre adott pontszámokat egy kedvelt és a vásárlók által

elfogadott bolti natúr ivójoghurthoz/kanalazós joghurthoz hasonlítva adták meg. A bírálati lapon strukturált skálán 1-től 9-ig terjedő pontozással értékelték a termékek tulajdonságait illat, szín, textúra és íz vonatkozásában. A pontozás értelmezése szerint a skála középső értéke, azaz 4,5 pont felelt meg az általánosan elfogadott és ismert natúr joghurt tulajdonságainak. Az ettől az értéktől eltérő, 1- és 9-hez közelítő értékek már tulajdonságbeli eltérést jelentettek. Szín tekintetében az 1-es érték a túl halvány, jellegtelen szín megfelelője volt, a maximális 9-es érték már a szélsőségesen zöldes-sárgás árnyalatnak felelt meg. Az illat pontozásánál az 1-es értéket a jellegtelen, nem intenzív illattal párosítottuk, míg 9 pont a túl savanyú, illetve egyéb idegen illatot jelentett. Az íz jellemzésénél 1-es érték volt a jellegtelen, nem intenzív íz megfelelője, a maximális 9 pont vonatkozott a túl savanyú vagy egyéb idegen ízre. Az állomány pontozásánál az 1-es pont jellemezte a széteső, túl híg állományt, a 9 pont pedig a túl sűrű, kemény állagot.

4.2.3 A pH mérése, műszeres színmérés, és az alvadék szilárdságának vizsgálata

A termékek műszeres vizsgálatához a tárolás időtartama alatt, 5 különböző időpontban vettem mintát: a termékek előállítását követően az 1., a 7., a 14., a 21. és a 28. napon. A tárolás folyamán az ivójoghurtok pH változását Testo 205 hordozható pH mérővel vizsgáltam (Testo, Reutlingen, Németország).

A színmérést Minolta Chroma Meter CR-300 (Konica Minolta, Essex, UK) színmérővel végeztem el. A mérés alapja a CIELAB színrendszer, mely során regisztráljuk az L*-, a*- és b*-értékeket. Ezek az úgynevezett színpontok vagy más néven színkoordináták, melyet

derékszögű koordináta rendszerben ábrázolhatók a színek jellemzésére használatos CIE-szintérben. Az a^* - b^* síkon az a^* és b^* féltengelyek az alábbi színezeteknek felel meg: $+a^*$ a piros, $-a^*$ a zöld, $+b^*$ a sárga, $-b^*$ a kék. Az L^* a világossági tényező, amely az a^* - b^* síkra merőlegesen értelmezendő.

A termék alvadék szilárdságának vizsgálata Zwick Roell Z005 statikus roncsolásos anyag-szerkezetvizsgáló műszerrel történt (Zwick Roell, Ulm, Németország). A készítmények alvadék szilárdságának a vizsgálatához, a mérés során az első összenyomásnál kifejtett maximális erőt, a First Maximum Force (N) értéket vettem alapul. Az alvadék-törési képesség tesztet közvetlenül a pohárban végeztem el, 4°C -os terméken, joghurtokra beállított penetrációs teszttel.

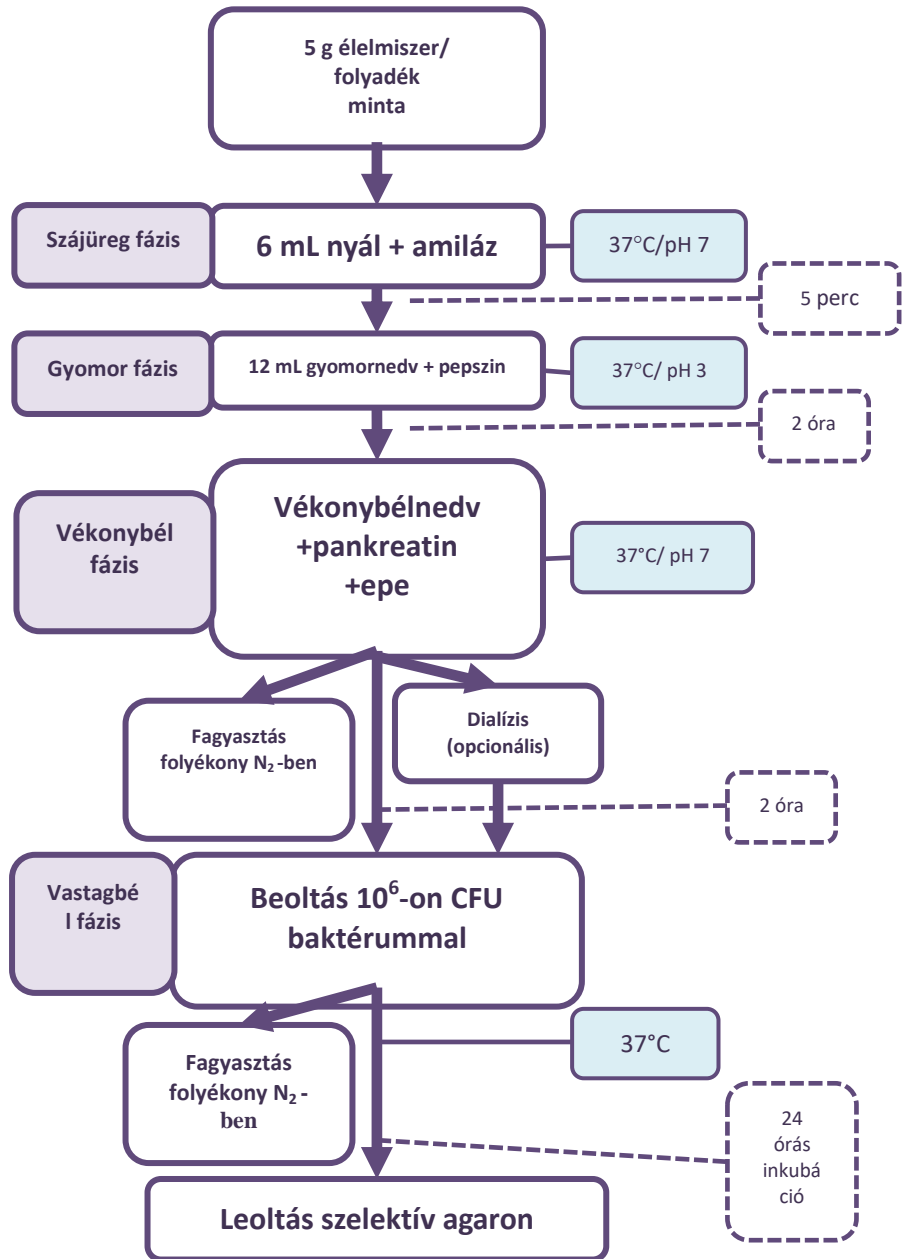
4.2.4 A kémiai összetétel meghatározása

A gyártást követően minden termékénél meghatároztam a nedvességtartalmat, nyersfehérje- és nyersszír-tartalmat, valamint a laktóz-tartalmat. A fenti méréseket az alábbi szabványok alapján végeztem el: „Tej, tejszín és sűrített tej - A szárazanyag-tartalom meghatározása” MSZ EN ISO 6731; „A tej összes fehérjetartalmának meghatározása” MSZ 12325-82; „Tejszín, savanyú tej, tejszínkészítmények és ízesített tejtermékek zsírtartalmának meghatározása” MSZ 9602:1984”, valamint laktóz meghatározása a „Savanyú tejkészítmények vizsgálati módszerei” MSZ 3725:1984 szabvány szerint.

4.3 Szimulált humán emésztés vizsgálat

A világszerte elismert, több nemzetközi kutatócsoport által elfogadott egyezményes Infogest *in vitro* emésztési modell vizsgálatot (Minekus és mtsai., 2014) a 7. ábrán található folyamatábrának megfelelően hajtottam végre. A minták azonnali vagy későbbi vizsgálata érdekében az emésztés leállítására a minták folyékony nitrogénbe történő elhelyezésével bármely szakasznál lehetséges. A protokoll szerint a folyadékok esetén a szájüreg fázis opcionálisan használható, illetve elhagyható, mivel az italokat egyből lenyeljük, és nem rájuk meg. Ebben az esetben a szájüreg fázist (2 perc pH=7) kihagytam a vizsgált minták viszkózus/fél folyékony állaga miatt. A folyamat során a mintákat mágneses keverőn kevertetem 250 rpm-en, 37 °C-os vízfürdőben tartva, két órán keresztül a gyomor fázisban (pH=3), majd két órán keresztül a vékonybél fázisban (pH=7). Az Infogest modell alkalmazása során az enzimeket mindig a kísérlet idején mért enzimaktivitásuknak megfelelően adagoltam, a jobb pontosság és reprodukálhatóság érdekében. A pH-t szükség szerint NaOH-dal vagy sósavval állítottam be. Az Infogest vékonybél fázist követően, a vastagbél fázis vizsgálatot is elvégeztem, melynek során 5 ml-t vettem ki a mintából, melyet steril kémcsőbe pipettáztam. Az így kapott mintát a vastagbél szakasz modellezése érdekében 24 órán keresztül önmagában inkubáltam, steril kémcsőben, 37°C-on anaerob Jarban.

7. ábra Az Infogest *in vitro* emésztési modell egyszerűsített folyamatábrája



Első lépésben az SSF Simulated Salivary Fluid (szimulált nyál nedv), az SGF Simulated Gastric Fluid (szimulált gyomornedv) és az SIF Simulated Intestinal Fluid (szimulált vékonybél nedv) emésztőnedvek törzsoldatait, továbbá az emésztés során a pH beállításához szükséges 1 M sósav oldatot és 1 M NaOH oldatot készítettem el.

A pH megfelelő, irányított fenntartása és szükség esetén történő korrigálása nagyon fontos az emésztés szimulációja során. Az éles emésztéses vizsgálat előtt egy úgynevezett „tesztcső kísérletet” végeztem el, a pH beállításának céljából. Az emésztéses vizsgálat kivitelezése előtt, mindegyik mintát enzim nélkül emésztettem, az emésztés szerinti megadott időtartamig. A folyamat ugyanúgy zajlott, mint az éles emésztéses vizsgálat esetén, viszont nem használtam enzimeket és a vizsgálat során feljegyeztem, mennyi sav vagy bázis volt szükséges az adott pH eléréséhez. A vizsgálat azért fontos, mert az éles kísérlet folyamán már a kiszámolt pontos mennyiségű anyagot adagoljuk a mintákhoz. Ez nagymértékben megkönnyíti és felgyorsítja a munkafolyamatot.

Az emésztés modellezése során használt enzimeket az enzimaktivitásuk ismerete alapján kiszámított mennyiségben adagoltam az emésztőnedvekhez. Az enzimek aktivitását a kísérlet előtt megmértem, és az adagolandó mennyiséget ennek alapján határoztam meg.

4.3.1 Patogén gátlás vizsgálata

A patogén gátlás vizsgálatához az emésztett vékonybél fázis mintákat 10^6 CFU/ml *C. perfringens* és 10^6 CFU/ml *E. coli* baktériumokkal oltottam be, modellezés képpen, kedvezőtlen bakteriális közegnek kitéve a

megemésztett termékeket. Ehhez az előzetesen felszaporított baktériumok csíraszámát optikai denzitásuk (600 nm-en mért abszorbanancia) alapján, kalibrációs görbe használatával becsültem meg, majd a mintákhoz adagoltam és együttesen steril kémcsőben, 37°C-on anaerob Jarban, 24 órán keresztül inkubáltam, modellezve a vastagbélben zajló körülményeket.

A fázis végén minden emésztett mintából csíraszám meghatározást végeztem szelektív agarokon. A gátlás százalékát Pitt és mtsai. (2000) szerint a következőképpen számoltam:

$$A-B/A \times 100$$

ahol, A = a kórokozó baktérium (CFU/ml) csíraszama egyedi tenyészetben

B = a kórokozó baktérium a probiotikus baktériumok (CFU/ml) jelenlétében

4.3.2 *A szimulált humán emésztési vizsgálat során a csíraszám meghatározáshoz használt táptalajok*

A 6. táblázatban az emésztés során alkalmazott szelektív táptalajok jellemzőit mutatom be. A csíraszám meghatározáshoz használt táptalajoknál, szelektivitási alkalmasságuk vizsgálatának céljából, mindegyik vizsgált baktérium esetén szelektivitási előkísérletet végeztem el. A *Lactobacillus*-ok vizsgálatára külön szelektív táptalajokat alkalmaztam, az előkísérlet során pedig sikerült megbizonyosodni azok hatékonyságáról. A mikrobiológiai vizsgálat során, a starter kultúrát (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) el kellett különíteni a probiotikus kultúrától (*Lactobacillus acidophilus* LA-5). Erre megoldást jelentett az MRS-BPB (bromophenol blue)

táptalaj alkalmazása (Lee és mtsai., 2008), melyben a brómfenol kék hatására kékre festődött a vizsgált baktérium. A *L. acidophilus* LA-5 esetében pedig S-MRS táptalajt alkalmaztam, mely egy MRS agar, melyben glükóz helyett szorbitolt alkalmaztam, melyet szelektíven csak az LA-5 hasznosított. A bifidobaktériumok meghatározásához anaerob tenyészetet alkalmaztam.

6.táblázat A csíraszám meghatározáshoz alkalmazott szelektív táptalajok és azok jellemzőik

Táptalaj	Összetétel	Kód, gyártó(k)/ település, ország/állam/ Recept (g/l)	pH	Szerepe	Körül- mények	A baktérium csoport, amelyhez alkalmazható
Harlequin agar	gyártó által összeállított	(LABM Harlequin E.coli/ Coliform Medium HAL008), Lab M Limited, Heywood, Egyesült Királyság	7,2	szelektív kimutatás	aerob	<i>Escherichia coli</i> (vastagbél szakasz beoltás)
MRS-BPB agar	összeállított táptalaj	MRS agar+ 0,05% l-cysteine/HCl, 0,002% BPB	6,5	szelektív kimutatás	aerob	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> (joghurt starter kultúra)
S-MRS	összeállított táptalaj	glükóz nélküli MRS agar, 10g/l D-sorbitollal kiegészítve	6,8	szelektív kimutatás	anaerob	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5) (joghurt probiotikus kultúra)
ST agar	összeállított táptalaj	10 g trypton, 10g sucrose, 5g élesztő kivonat, 2g K ₂ HPO ₄ , 12g agar, 0,5% bromocresol purple	6,8	szelektív kimutatás	aerob	<i>Streptococcus thermophilus</i> (joghurt starter kultúra)
TSC agar	gyártó által összeállított	(01-278 Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC Agar)), Scharlab, Barcelona, Spanyolország	7,6	szelektív kimutatás	anaerob	<i>Clostridium perfringens</i> (vastagbél szakasz beoltás)
	D-Cycloserine Selective Supplement, használati útmutató szerint	(06-116LYO1), Scharlab Magyarország Kft, Debrecen, Magyarország	-			
BSM agar	BSM agar	(BSM Agar, Fluka Analytical 88517-250G-F), Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	6,8	szelektív kimutatás	anaerob	<i>Bifidobacterium animalis</i> spp. <i>lactis</i> BB-12
	BSM Supplement, használati útmutató szerint	(Fluka Analytical 83055-5G-F), Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	-			

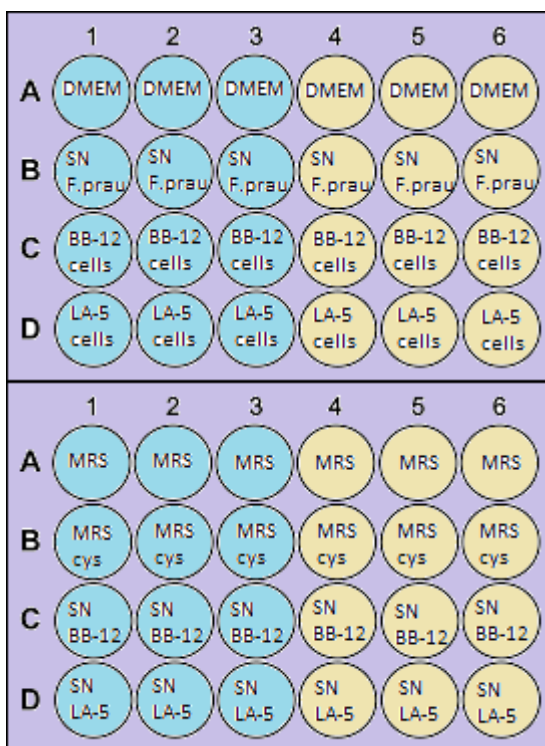
4.4 *In vitro* vizsgálatok

4.4.1 *Intesztinális sejtvonalak (HT-29 és Caco-2) szaporítása és fenntartása*

A HT-29 és a Caco-2 humán vastagbél daganatból származó karcinóma/adenokarcinóma sejtvonalak szaporítása és azok fenntartása az adhéziós és az immunválasz vizsgálatokhoz az alábbiak szerint történt. A HT-29 sejtek (ATCC HTB38) (LGC Standards, Molsheim, Franciaország) fenntartásához 10% (v/v) hővel inaktivált marha szérumalbumint (BSA) (Lonza, Levallois-Perret, Franciaország) és 1% penicillin/streptomycint keverékét (Lonza, Levallois-Perret, Franciaország) tartalmazó médiumot használtam (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium DMEM) (Lonza, Levallois-Perret, Franciaország). A Caco-2 sejtvonalakhoz (ATCC HTB37) (LGC Standards, Molsheim, Franciaország) 20%-os BSA-t, 1% penicillin/streptomycint és 1% nem esszenciális aminosavat (NEAA) (Lonza, Levallois-Perret, Franciaország) tartalmazó médiumot alkalmaztam. A sejtvonalakat 25 cm²-es méretű kultúrázó edényekben szaporítottam és 10% CO₂-t tartalmazó inkubátorban 37 C°-on tartottam. A konfluensé válásig, körülbelül 6-7 napon keresztül, a médium közeget rendszeres időközönként frissre cseréltem. Amikor a sejtek 90%-ban konfluensé váltak, 1 ml 0,25%-os tripszin-EDTA oldattal inkubáltam 37 C°-on, annak érdekében, hogy leválasszam a kultúrázó edényről. Ez után 7 ml DMEM médiumot adtam a már leválasztott sejtszuszpenzióhoz és centrifugáltam. A lecentrifugált pelletet, friss DMEM médiumban reszuszpendáltam és sejtszámlálást végeztem.

4.4.2 Baktériumok koinkubációja HT-29 sejtvonalban

A sejtvonal teljes konfluensé válásakor, a sejtekről eltávolítottam az elhasznált DMEM médiumot, majd PBS-el (foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat) átmostam. A kísérlet előtti napon 5%-os (v/v) DMEM közegre cseréltem a médiumot. Egy kultúrázó edénybe 10^8 CFU mennyiségű baktérium felülúszó vagy baktérium pellet került koinkubálásra 6 órán keresztül ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10% CO_2) TNF- α (PeproTech, London, UK) jelenlétében (5 ng/ml) vagy anélkül. Pozitív kontrollként *Faecalibacterium prausnitzi*-t használtam (8. ábra). A koinkubációs vizsgálat végén begyűjtöttem a koinkubált felülúszót, majd $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam az ELISA teszt (Biolegend, San Diego, Kalifornia US) kivitelezéséig.



8. ábra Sematikus illusztráció a 6 órás koinkubáció kísérleti elrendezéséről. Kék színnel jelöltem a TNF- α -val történő inkubálást, sárgával a TNF- α nélküli kontrollt.

4.4.3 *TNF- α által indukált immunmodulációs vizsgálat HT-29 sejtvonalonban*

A 6 órás koinkubáció után a felülúszót ELISA tesztnek vettem alá. A felülúszóban található immunoreaktív IL-8 fehérje szintet human IL-8 ELISA MAX Standard teszttel vizsgáltam meg, a gyártó általi protokolléírásnak megfelelően, direkt sandwich ELISA módszerrel. Az IL-8 szint meghatározásához “anti-human IL-8” monoklónozott és hordozóra rögzített antitestet, valamint “horse radish” peroxidázhoz (HRP) kapcsolt detektáló antitestet használtam, szubsztrátként pedig folyékony TMB-t (tetrametilbenzidin). A reakció végén a kapott abszorbancia eredményeket 450 nm-en ELISA plate reader-rel olvastam le és értékeltem ki.

4.4.4 *Adhéziós vizsgálat HT-29 és Caco-2 sejtvonalonban*

A vizsgálni kívánt baktérium kultúrákat előzetesen legalább 12 óra hosszan (egy éjszakán keresztül) szaporítottam. A vizsgálat napján előkészítettem az előzetesen felszaporított kultúrákat, melyeket centrifugáltam (5000 g, 10 perc), majd kétszer mostam PBS-el, és DMEM-ben oldottam 10^8 -on CFU/ml mennyiségben. Ezzel párhuzamosan a már 6-7 napos, teljesen konfluensé vált, HT-29 és Caco-2 sejtvonalat tartalmazó mikrolapokat is előkészítettem a vizsgálatához, az elhasznált DMEM-et eltávolítottam és háromszor mostam PBS-el. Minden egyes mikrolap lyukba 1 ml baktérium szuszpenziót adagoltam és 60 percen keresztül inkubáltam 37°C -on (10% CO_2). Az idő lejártával a DMEM-et eltávolítottam és 3x PBS-el mostam, hogy a meg nem tapadt baktériumokat eltávolítsam a sejtek felületéről. Ez után 1% Triton X-100-t (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, US) oldottam fel PBS-

ben és inkubáltam 5 percen keresztül, hogy leváljanak a sejtekhez tapadt baktériumok. Ezt követően a sejtek számolása érdekében tripszines hidrolízist végeztem el, mely során minden mikrolap vájatba 1 ml 0.25% tripszin-EDTA oldatot adagoltam, melyet 7 perces inkubálás követett. Az előbb adhézióval megkötődött, majd a sejtrétegről leválasztott baktérium (Triton-baktérium szuszpenzió) telepszámlálását hígítási módszerrel végeztem el, a vizsgált baktériumnak megfelelő táptalajon és hőmérsékleten (4.2.1.fejezet). Az adhézióval megkötődött baktériumok mennyiségét az alábbi módon számoltam ki:

Vizsgált baktérium adhézió %-a = $(B_1 / B_0) \times 100$,

ahol $B_1 =$ (CFU/ml) a Triton-baktérium szuszpenzió csíraszama, valamint $B_0 =$ (CFU/ml) a kiindulási baktériumszám (a mikrolap vájathoz adott baktérium mennyisége).

4.4.5 Adhéziós vizsgálat mucinnal

A vizsgálat kezdetén liofilizált mucint (III.típus) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA) oldottam fel PBS-ben, 10 mg/ml töménységben, majd a 96 vájatú polikarbonát mikrolemmez minden egyes mélyedésébe 100-100 μ l szuszpenziót helyeztem. Egy órán keresztül inkubáltam 37°C-on, ez után 4°C-on tartottam egy egész éjszakán át. Következő nap, a mikrolap vájathoz egyenként átmostam PBS-el, annak érdekében hogy a plate-hez nem kötődött felesleges mucint eltávolítsam. A vizsgálni kívánt baktériumokat, a vizsgálat előtti napon kezdtem el felszaporítani, a nekik megfelelő körülmények szerint, egy éjszakán keresztül. A vizsgálat előtt a felszaporított baktériumokat centrifugáltam

(5000 g, 10 perc) majd kétszer mostam PBS-el. A centrifugált szuszpenzióból 100 mikrolitert inokuláltam (10^8 CFU/ml), minden egyes plate-vájatba és háromszor mostam PBS-el, hogy a nem kötődő baktériumokat eltávolítsam a mucintól. Az utolsó átmosás után 1% Triton X-100-at (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, US) oldottam fel PBS-ben és 90 percen keresztül inkubáltam $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on, hogy a mucinhoz kötődő baktériumhoz hozzájussak. Az adherálódott baktérium-mennyiséget határhígítási módszerrel, lemezöntéssel határoztam meg.

$$\text{Mucin adhézio\%} = (B_1 / B_0) \times 100$$

ahol B_1 = (CFU/ml) vizsgálat végén a mucinhoz kötődött baktériumok száma, B_0 = (CFU/ml) a kezdeti, mucinhoz adagolt baktérium mennyisége.

4.4.6 Hidrofobicitás vizsgálat

Az oldószerekkel szembeni mikrobiális adhézio (MATS) információt szolgáltat a mikrobák felületi tulajdonságaikról (Vinderola & Reinheimer, 2003). A hidrofobicitás teszt kivitelezéséhez a vizsgálat előtti napon egy éjszakán keresztül szaporítottam fel a vizsgálni kívánt baktériumokat. A felszaporított kultúrákat a vizsgálat napján centrifugáltam és 5 ml-t mostam PBS-ben, majd reszuszpendáltam. A sejtsuszpenziót a 600 nm-en mért abszorbancia alapján meghatározott 10^8 CFU mennyiségben adagoltam a PBS-hez. Két ml baktérium-PBS szuszpenzóhoz 1 ml oldószert (hexánt vagy etil-acetátot) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri USA) adtam, majd a keveréket 2

percen keresztül kémcsórázóval kevertetem. Ez után 1 órán keresztül 37°C-on hagytam, hogy a két fázis spontán elváljon egymástól. A kivált vizes fázist üveg pipetta segítségével kivettem és megmértem az abszorbanciáját ($\lambda=600$ nm). A sejt felületi hidrofóbicitása (H%) a kivált vizes fázis abszorbanciájának a csökkenéseként értelmezhető:

$$H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

ahol A_0 és A az abszorbancia értéke oldószeres extrakció előtt és után.

4.5 *In vivo* vizsgálatok, állatkísérlet

Az állatkísérlethez 7-8 hetes C57BL/6, csíramentes, steril egereket (Janvier Le Genest Saint Isle, Franciaország) használtam fel, melyeket a National Institute of Agricultural Research (IERP, INRAE, Jouy-en-Josas, Franciaország) állattartó- és kísérleti létesítményében, speciális, csíramentes körülmények között tartottam a kísérlet megelőzően (akklimatizációs időszak, minimum 1 hét) és a kísérlet teljes időtartama alatt. Az állatok flexibilis film-izolátorral ellátott (Getinge-La Calhène, Vendôme, Franciaország), steril faforgácsot tartalmazó ketrecben voltak elhelyezve (5 egér/ketrec). A takarmányozás *ad libitum* történt, az egerek számára egész nap folyamán, mindig elérhető módon volt biztosítva az autoklávozott csapvíz, valamint a standard R03 40 élelem (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, Franciaország), mely csíramentesítése érdekében gamma sugárzással volt kezelve (45 kGy) (IBA Mediris, Fleurus, Belgium). A standard körülmények biztosítása a következőképpen történt. A terem 07:30 és 19:30 között volt megvilágítva, a hőmérséklet 20 és 22 °C között, a levegő egyensúlyi relatív páratartalma 45-55% között volt. Az állatkísérletre vonatkozó

európai közösségi szabályokat a helyi illetékes COMETHEA bizottsági szerv jóváhagyta (Comité d’Ethique en Experimentation Animale du Centre INRA de Jouy-en-Josas et AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France 3445-2016010615159974 és 16744-201807061805486). A mérsékelt bélgyulladás előidézése dinitrobenzol-szulfonsavval (“moderate DNBS-dinitrobenzene sulfonic acid modell”) és a baktériumok állatokba juttatása szondával a következő módon történt. Az egyenként körülbelül 20 g-os állatokat 150 µL 0,1%-os ketaminnal és 0,06% xilazinnal 1 mL Imalgene 1000 (Merial, Lyon Franciaország) és 0,6 mL 2%-os Rompunnal (Bayer, Leverkusen, Németország) intraperitoneálisan érzéstelenítettem, ez után közvetlenül a vastagbélbe helyeztem egy 3,5 cm hosszúságú katétert (Solomon Scientific, San Antonio, US) és fecskendővel (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, US) juttattam be 100 mg/ testtömeg kg DNBS-t (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, US) 30% (v/v) etanolt tartalmazó foszfát pufferben feloldva (EtOH-PBS). A dózis 2 mg DNBS/egér volt. A kontroll csoportban lévő egerek, melyeknél nem idéztem elő bélgyulladást, ugyanezt a protokollt követve EtOH-PBS kaptak. Az első 3 nap folyamán az állatok folyamatos megfigyelés alatt voltak, mivel ez a periódus igen kritikus az egészségük szempontjából. Ezt követően, a 10 nap elteltével kezdtem el az állatok szondázását, mely során bejuttattam a vizsgált baktériumokat/joghurtokat/kapszulázott formulát, vagy a PBS-t (kontrol csoport) (Ecimed, France). Egy szondázás alkalmával intragasztrálisan 200 µL mennyiségű vizsgált anyagot juttattam be az állatba 1×10^8 CFU mennyiségben, és ezt 10 napon keresztül folytattam, ez volt az úgynevezett etetési-periódus. Az állatok bélrendszerében mesterségesen létrehozott gyulladást az első DNBS bejuttatása után 21 nap elteltével

(gyógyulási-periódus) reaktiváltam, egy második 50 mg/ testtömeg kg DNBS bejuttatásával.

4.5.1 A bél makroszkópikus vizsgálata

Az állatokat kábítás után, nyaki diszlokációval leöltük, ezután a hasüreget felnyitottuk, a vastagbelet eltávolítottuk és hosszanti irányban felvágtuk. Ezt követően pontozásos módszerrel értékeltem a vastagbél károsodását egy 0-tól 9-ig terjedő skálán. A pontozás magába foglalta a makroszkópikus nyálkahártya-károsodásokat, mint például a fekélyek jelenlétét, a vastagbélfal megvastagodását, a vastagbél hozzátapadását más hasüregi szervekhez, a székletanyag konzisztenciájában bekövetkezett változásokat (hasmenés indikátoraként) és a hiperémia jelenlétét.

4.5.2 In vivo bél permeabilitás vizsgálat

A bél átteresztő képességének detektálásához fluoreszcens izotiocianáttal konjugált dextranszt használtam (FITC-dextran 3000-5000 Da, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, US) (Tambuwalla et al., 2010). Három nappal a második DNBS-injekció után orális szondával 0,6 mg/g testtömeg kg FITC-dextranszt adagoltam az állatoknak. A vérben lévő FITC-dextrán jelenlétének méréséhez 3,5 órával a szondás adagolást követően vettem mintát a retro-orbitális vénás plexusból, és a mintát az analízisig 4°C-on sötétben tároltam. Az egereket ebben az időszakban a szokásos körülmények között tartottam, azonban az állatok nem ehettek és a vízhez csak korlátozott hozzáférést biztosítottam a számukra. A szérumot centrifugálással választottam el, és a plazma FITC-szinteket mikroplate-olvasóval ellátott fluoriméterrel határoztam meg (Tecan

fluoreszcens mikrolemez-olvasó, Tecan, Lyon, Franciaország), a gerjesztési és az emissziós hullámhosszak 485 nm és 530 nm voltak.

4.5.3 MPO aktivitás vizsgálat

A mieloperoxidáz (MPO) aktivitást (a neutrofil infiltráció markere) Bradley és munkatársai (1982) által leírt protokoll módosított változatával mértem. A disztális vastagbélből egy centiméteres mintát vettem és 5% hexadecil-trimetil-ammónium-bromidot (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, US) és hidrogén-peroxidot (H_2O_2) tartalmazó jéghideg 50 mM kálium-foszfát pufferrel (pH=6) homogenizáltam úgy, hogy a minta végső koncentrációja 50 mg/ml legyen a pufferben. A kolorimetriás reakció abszorbanciáját spektrofotométerrel mértem (Tecan, Lyon, Franciaország). Az MPO-aktivitást a nedves szövet milligrammjára vonatkoztatva, egységnyi mennyiségben fejeztem ki. A MPO aktivitása egységnyi abban az esetben, ha szobahőmérsékleten 1 μM H_2O_2 -t egy perc alatt bont le vízre és oxigénre.

4.6 Statisztikai elemzés

A vizsgált valószínűségi változók esetében Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztem, hogy a normális eloszlást követik-e, és alkalmazható-e varianciaanalízis a csoportátlagok összehasonlítására. Amennyiben nincs külön más kritérium jelezve, a $P < 0,05$ értéket tekintettem szignifikánsnak. A nyers adatokat átlag és \pm szórás formában adtam meg. Az érzékszervi vizsgálatok adatait nem paraméteres teszttel (Kruskall-Wallis) vizsgáltam, mivel az adatok nem mutattak normális eloszlást. Az alvadék-, pH- és színvizsgálatoknál a varianciák homogenitását Levene teszttel ellenőriztem, majd az egy tényezős

variacionaalízist követően a csoportátlagok összehasonlítása céljából Tukey tesztet alkalmaztam. Az élettani vizsgálatoknál Kruskal-Wallis, Tukey és Mann-Whitney tesztet alkalmaztam. A statisztikai elemzéseket, értékelést R commander (R project 3.4.2.) statisztikai szoftverrel, a grafikonokat a Graphpad (Graph-pad szoftver, San Diego, CA) program segítségével készítettem el.

5. Eredmények és értékelésük

5.1 *Technológiai vizsgálatok eredményei*

5.1.1 *Probiotikus csíraszám alakulása a tárolás folyamán*

A probiotikus és a szinbiotikus termékekben biztosítani kell, hogy a hasznos baktériumok megfelelően magas csíraszámokban legyenek jelen a fogyaszthatósági időtartam alatt. Ennek értelmében, a fogyaszthatóság lejáratási időpontjának végéig megkövetelik egy adott minimális csíraszám jelenlétét. Vizsgálataim során többször meghatároztam a LA-5 és a BB-12 probiotikus baktériumok csíraszámát a tejes, valamint a savós pro- és szinbiotikus joghurtokban a négy hetes tárolás időtartama alatt. A kapott eredmények alapján megállapítható volt, hogy a bifidobaktériumok és laktobacillusok szintje a gyártáskor beállított nagyságrendben maradtak, a négy hetes tárolása során sem csökkent 10^8 CFU/ml alá (laktobacillusok 4. hét vége: 8,16-8,5 CFU/ml, bifidobaktériumok 4. hét vége: 8,13-8,57 CFU/ml) egyik termékben sem (7-8. táblázat). A két probiotikum csíraszámának változása hasonló tendenciát mutatott a tárolás időtartama alatt. A kísérlettervezésnél a baktériumszámot azért erre a szintre állítottam be, mivel az egészségügyi előnyök kifejeződéséhez minimum 10^6 CFU/ml csíraszám szükséges, az érzékszervi elfogadhatóság szempontjából pedig 10^8 CFU/ml az a legmagasabb probiotikum mennyiség, mely még fogyasztható, bármiféle a fogyasztó számára elfogadhatatlan íz kialakulása nélkül. A baktériumok száma csökkenő tendenciát mutatott, azonban ez a csökkenés nem volt olyan mértékű, hogy a sejtszám az International Dairy Federation (IDF) által ajánlott érték alá süllyedjen, melynek a minimum szintje 10^6 CFU/g. A kezdeti (0. hét) és az első héten mért probiotikus csíraszám szignifikánsan nagyobb volt, mint a 3. és a 4.

héten mért értékek ($P < 0,05$), tehát az első hetet követően következett be a probiotikus kultúrák csíraszámának csökkenése. A tárolás alatt a probiotikus csíraszámok stabilitását mutatták egy 2012-es szegedi tanulmány (Lendvai és mtsai.) szerint, ahol a *L. bulgaricus* és *S. thermophilus* keverék startert és a LA-5+BB-12 probiotikus kultúrát, inulint, oligofruktózt és fruktózt tartalmazó tejhez adták hozzá. A kísérleti termék a fogyasztási idő végéig megőrizte a kezdeti magas csíraszámot. Savóval készült fermentált terméket vizsgált egy lengyel kutatócsoport (Skryplonek & Jasinska, 2015) *L. bulgaricus*-*S. thermophilus* startert és LA-5 vagy BB-12 probiotikumokat használva, és ők is megfelelően magas csíraszámot (10^8 CFU/ml) mértek a fogyaszthatósági idő végén. Megfigyeléseim szerint a probiotikus csíraszám ugyan csökkent, azonban a csökkenés mértéke még elfogadható volt, mivel a csíraszám az előírásoknak megfelelő érték felett maradt a hűtve tárolás teljes időtartama alatt.

A 100%-ban tej alapanyagot tartalmazó készítményekben a probiotikus és az inulin hozzáadásával létrehozott szinbiotikus joghurtok csíraszámja nem különbözött szignifikánsan egymástól egy mintavételi időpontban sem ($P \geq 0,05$), azonban az idő függvényében csökkenő tendencia úgy tűnt, hogy kevésbé érvényesült a szinbiotikus joghurtban, mint az inulint nem tartalmazó probiotikus joghurtban (7. és 8. táblázat). Elképzelhető, hogy az inulin hosszabb távon már jelentős védő hatást fejtett volna ki, azonban a különbség a negyedik hétig nem volt szignifikáns, ezért további következtetések levonásához hosszabb ideig tartó tárolhatósági vizsgálatra lenne szükség.

A savós termékeknél mind a laktobacillusok, mind a bifidobaktériumok csíraszámja szignifikánsan nagyobb volt, mint a nekik megfelelő analóg, csak tejet tartalmazó termékeknél ($P < 0,05$) a tárolás

teljes időtartama alatt (7. és 8. táblázat). Kátay és munkatársai (2013) hasonlóképpen magasabb prebiotikus csíraszámot (LA-5 és BB-12) tapasztaltak a 30% és 75% közötti mennyiségű savót tartalmazó joghurtokban, mint a tejes joghurtokban. Megfigyeléseik szerint mind a fermentációs, mind az érzékszervi tulajdonságok kedvezőnek bizonyultak és a baktériumok csíraszámja a négy hetes tárolási időtartam alatt megfelelően stabil volt, ezért véleményük szerint sincs akadálya a savó használatának abban az esetben, ha a fenti probiotikus kultúrák is részt vesznek a fermentációban.

A savós probiotikus és a savós szinbiotikus készítmények is szignifikánsan különböztek egymástól ($P < 0,05$), azonban az inulint tartalmazó szinbiotikus savós termékekben kevesebb laktobacillusz és bifidobaktérium volt, mint az inulint nem tartalmazó savós probiotikus joghurtban (7. és 8. táblázat). Az utóbbi megfigyelésből következik, hogy a hűtve tárolás során az inulin nem segítette elő a probiotikus kultúrák csíraszámának növekedését a savós termékekben. Hasonló eredményekről számoltak be Pinto és munkatársai (2017) amikor az édes savóval mikrokapszulázott BB-12 csíraszámja a 28 napos tárolás alatt nem változott, ugyanakkor az édes savó és inulin keverékével mikrokapszulázott BB-12 csíraszámja szignifikánsan csökkent. Az inulin probiotikumokra kifejtett hatásának pontos mechanizmusa a hűtve tárolás során még mindig tisztázatlan. A jelenlegi magyarázat szerint a prebiotikum szelektív szubsztrátot biztosít a baktériumnak, továbbá védi azt a savas behatásoktól. Egyaránt találhatunk példát az inulin csíraszámra kifejtett kedvező hatására (Akalin és mtsai., 2004, Varga és mtsai., 2003, Aryana és mtsai., 2007), illetve arra is, hogy nem befolyásolja számottevően a probiotikus csíraszámot (Bozanic, 2002, Ozer 2005). Az inulin baktériumok általi hasznosítása függhet az adott

készítményre jellemző polimerizációs foktól, valamint a készítmény tisztaságától, finomítottságának mértékétől. A magas polimerizációs fokkal (DP>22) rendelkező és a túlzottan finomított (>99,5%) inulint kevésbé, míg az alacsonyabb polimerizációs fokkal rendelkezőket (DP>9) és kevésbé finomítottakat (>90%) jobban hasznosítják a baktériumok (Bielecka és mtsai., 2002). A termékek előállításánál használt inulin jelen kísérletben DP>9 polimerizációs fokkal rendelkezett, amely a fentiek alapján kedvezőnek tekinthető. Donkor és munkatársai (2006) több különböző dózisban, 0,5, 1 és 1,5%-ban adagolták az inulint a probiotikus joghurtokhoz és megállapították, hogy alacsonyabb dózisok kedvezőbben befolyásolták a baktériumok növekedését és életképességét. Továbbá, az inulin baktériumokra kifejtett hatása a tárolás során különböző lehet attól függően, hogy hányféle mikroorganizmus vesz részt egyszerre a fermentációban. Oliveira és munkatársai (2009) amikor *L. bulgaricus*-t, *L. acidophilus*-t, *L. rhamnosus*-t és *B. lactis*-t fermentáltak *S. thermophilus*-al kokultúrában, az egy napos tárolás után úgy tapasztalták, hogy csupán a *S. thermophilus*-*B. lactis* baktérium kombinációnál volt megfigyelhető az inulin csíraszám növelő hatása. Amikor az összes baktériumot együttesen fermentálták, mindegyik baktérium sejtszáma csökkent, hiába volt jelen az inulin. A jelenséget a baktériumok egyazon szubsztrátért történő versengésével magyarázták. Továbbá a különböző probiotikumoknak (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. lactis*) a *S. thermophilus*-al szemben mutatott szinergikus és antagonisztikus hatását még nem tisztázták teljes körűen (Oliveira, 2009). Pasephol (2009) articsókából kivont inulinnal egészítette ki a joghurtot, ez a prebiotikum nem gyakorolt számottevő hatást a baktériumszámra a tárolás során. Az inulin adagolása javíthatja az

érzékszervi tulajdonságokat (Kip, 2005), azonban a tárolás alatti csíraszámra nem feltétlenül fejt ki kedvező hatást. Hasonlóan igaz volt ez a megállapítás Drgalic (2005) vizsgálataiban is, amelyben a 100%-ban savót, inulin és LA-5, BB-12 és *L. casei* probiotikumok jelenlétében fermentáltak. A tárolás folyamán a prebiotikum jelenléte vagy hiánya nem gyakorolt hatást a baktériumszámba, miközben a LA5 és BB-12 csíraszám a tárolás végéig kellően magas szinten (10^7 CFU/ml felett) maradt.

A probiotikus tejtermékek erjedési folyamatait számos tényező befolyásolja, mint a rendelkezésre álló szubsztrátok, az adott törzsek szabad oxigén-, szénhidrát-, savtűrőképessége, illetve más egyéb komponensekkel (pl. a fehérjék fajtája és mennyisége, zsír mennyisége) szembeni toleranciája. Nem szabad elfelejteni arról, hogy az alkalmazott starter kultúra szintén befolyásolhatja a probiotikus kultúrák stabilitását, esetleges antagonisztikus hatások miatt. A starter kultúrával együtt történő fermentáció során törekedni kell a starter és a probiotikus kultúra szimbiotikus „együttműködésére”. Fontos a megfelelő starter baktérium kiválasztása, hogy elősegítse a probiotikumok kedvező szaporodását, hiszen egy probiotikus funkcionális élelmiszer esetében elvárás a magas probiotikus mikróbaszám.

7. táblázat: A laktobacillusok számának változása a probiotikus és szinbiotikus termékekben a négy hetes tárolás alatt (termékenkénti és mintavételenkénti összehasonlítás)

Mintavétel napján mért élő csíraszám log CFU/ml	0.	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét
Probiotikus joghurt	8,59 ^{aB}	8,57 ^{aB}	8,58 ^{aAB}	8,28 ^{aA}	8,16 ^{aA}
Savós probiotikus joghurt	8,99 ^{cB}	8,95 ^{cB}	8,82 ^{cAB}	8,74 ^{cA}	8,63 ^{cA}
Szinbiotikus joghurt	8,60 ^{aB}	8,48 ^{aB}	8,34 ^{aAB}	8,34 ^{aA}	8,49 ^{aA}
Savós szinbiotikus joghurt	8,80 ^{bB}	8,76 ^{bB}	8,49 ^{bAB}	8,54 ^{bA}	8,50 ^{bA}

*^{a,b,c}: az eltérő kis betűkitevők a szignifikáns eltérést jelzik ($P < 0,05$) a különböző összetételű joghurtokon belül.

^{A,B,C}: az eltérő nagy betűkitevők a szignifikáns eltérést jelzik ($P < 0,05$) a négy hetes tárolás során.

Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlagait jelöli.

8. táblázat: A bifidobaktériumok számának változása a probiotikus és szinbiotikus termékekben a négy hetes tárolás alatt (termékenkénti és mintavételenkénti összehasonlítás)

Mintavétel napján mért élő csíraszám log CFU/ml	0.	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét
Probiotikus joghurt	8,46 ^{aB}	8,48 ^{aB}	8,37 ^{aAB}	8,34 ^{aA}	8,13 ^{aA}
Savós probiotikus joghurt	8,90 ^{cB}	8,89 ^{cB}	8,83 ^{cAB}	8,74 ^{cA}	8,64 ^{cA}
Szinbiotikus joghurt	8,63 ^{aB}	8,60 ^{aB}	8,54 ^{aAB}	8,36 ^{aA}	8,45 ^{aA}
Savós szinbiotikus joghurt	8,69 ^{bB}	8,64 ^{bB}	8,63 ^{bAB}	8,60 ^{bA}	8,57 ^{bA}

*^{a,b,c}: az eltérő kis betűkitevők a szignifikáns eltérést jelzik ($P < 0,05$) a különböző összetételű joghurtokon belül.

^{A,B,C}: az eltérő nagy betűkitevők a szignifikáns eltérést jelzik ($P < 0,05$) a négy hetes tárolás során.

Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlagait jelöli.

5.1.2 *A kísérleti termékek pH változása a tárolás során*

A joghurt esetében a romlást okozó és a patogén csírák visszaszorítása – részben – a pH csökkenésével érhető el. A starterkultúra mikrobái által létrehozott savas fermentáció azonban olyan alacsony pH értéket eredményez ($\text{pH} < 4,5$), amely nem kedvez a probiotikus baktériumok szaporodásának (Skryplonek & Jasinska, 2015, Varga-Visi & Pápai, 2015).

Iravani és munkatársai (2015) szerint a probiotikumok stabilitására nagy hatást gyakorol a fermentált termékekben a pH és a titrálható savtartalom alakulása. A tej pH-értéke 6,5 körül van, míg a savó pH-értéke attól függően, hogy édes vagy savanyú tejsavó, 6-4,5 körüli intervallum között helyezkedik el. A vizsgálataimhoz édes savó port használtam, melynek pH-értéke az oldást követően 6 körül volt, így keverve a tejjel, a pH-értéke közel volt a tej kiindulási pH-értékéhez. Az alapanyagok egy sarzsból származtak, így az anyagok kiindulási pH-értéke közel azonos volt.

A 9. táblázat a savós és a tejes joghurtok pH-értékének alakulását szemlélteti a hűtve tárolás során. A készítmények pH-ja a tárolás időtartama alatt nem változott szignifikánsan ($P \geq 0,05$). Drgalic és munkatársai (2005) által készített savós szinbiotikus joghurtokban is hasonló, 4,5 körüli pH-értékeket mértek a gyártást követően, a tárolás kezdetekor.

A 0. héten a hagyományos joghurt (HJ) pH-ja szignifikánsan nagyobb volt ($P < 0,05$), mint a savós joghurté (SJ), melyből arra következtethetünk, hogy a savós joghurtban intenzívebb fermentáció

játszódott le. A tejes joghurtoknál a probiotikus törzseket is tartalmazó készítményekben (PJ, SZJ) a pH kissé, de szignifikáns mértékben kisebb volt, mint a csupán hagyományos starterkultúrát tartalmazóké (HJ), ennek oka, feltehetőleg, a probiotikus törzsek jelenlétéhez köthető savanyító hatás. Ez a tendencia a savós joghurtoknál már nem figyelhető meg, feltehetőleg a starterkultúra intenzívebb fermentációja miatt.

A starterkultúrát alkotó baktériumok savtermelő képessége lényegesen erőteljesebb, mint a probiotikus törzseké. A *L. bulgaricus* D(-)tejsavat termel, melyet nem képes metabolizálni az emberi szervezet, míg a *S. thermophilus* L(+) tejsavat termel, amit fel tudunk használni. A probiotikus LA-5 képes mindkét tejsav enantiomer előállítására, a BB-12 jelenlétében a laktóz tejsavas fermentációja (L(+) tejsav) mellett az ecetsavas erjedés is végbemegy. Az általam alkalmazott probiotikus törzsek úgynevezett lassú savanyítók, tehát önállóan csak nagyon lassan és csak kis mértékben tudják fermentálni a tejes közeget vagy egyáltalán nem is képesek rá, proteolitikus rendszerük hiánya vagy gyenge működése miatt. A tejsav mennyisége továbbá a termékek ízét, aromáját is befolyásolja. A joghurt kultúrában a kokkusz-pálcika arány 1:1, illetve 1:2, először az *S. thermophilus* kezd el szaporodni, ekkor a kokkuszok termelik a savat, később kezdenek el a pálcikák szaporodni, végül beáll a kedvező arány. Esetünkben a megnövelt kezdeti baktériumszám rövidebb inkubációs időt tett lehetővé. A kultúra gyors savanyító képessége nagyon fontos szempont a termékek minőségbiztonsága szempontjából. A túl lassú vagy elégtelen savtermelés kedvez a káros és romlást okozó baktériumok szaporodásának. A pH az utósavanyodás után, ez által a tárolási idő alatt is változhat. A hűtés alatt a kultúrák metabolikus aktivitása csökken, de még ekkor is bekövetkezhet további savképződés. A vizsgált

termékekénél egyedül a hagyományos joghurt (HJ) pH-értéke mutatott csökkenő tendenciát a tárolási vizsgálat végére, azonban ez nem volt szignifikáns, csupán ez a termék mutatott utósavanyodási hajlandóságot. A probiotikus és szinbiotikus, mind savós és tejes termékekénél nem következett be jelentős utósavanyodás, a termékek stabilak voltak a pH-érték tekintetében. Az érzékszervi vizsgálatoknál a pH-értéknek és termék textúrájának egyaránt jelentősége van, mivel két azonos pH-értékkel rendelkező készítménynél azt érezzük savasabbnak, amely gyengébb szerkezettel rendelkezik.

Habár a joghurt pH-értéke fontos szempont a probiotikumok stabilitásának szempontjából, bizonyos esetekben nem gyakorolt hatást a stabilitásra a tárolás során (Pinto és mtsai., 2017, Abd-El-Salam, 2011). A joghurt pH-ja főként az inkubációs periódus folyamán változik, azonban a tároláskor bekövetkező utósavanyodás is megváltoztathatja a termék savasságát, amely az érzékszervi tulajdonságokra és a baktériumszámra is hatással lehet. A pH változást a prebiotikumok jelenléte is befolyásolhatja, vizsgálatunkban az inulin nem befolyásolta a tejes készítmények pH értékét (v.ö. PJ és SZJ). Az inulinnak Drgalic (2005) vizsgálatai szerint sem volt hatása a pH-értékre a fermentáció és a tárolás alatt.

9. táblázat A hűtve tárolás során mért pH-értékek.

	0.hét	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét
HJ	4,9±0,1 ^C	4,7±0,1 ^C	4,7±0,1 ^C	4,7±0,1 ^C	4,7±0,1 ^C
PJ	4,6±0,1 ^B	4,6±0,1 ^B	4,6±0,0 ^B	4,6±0,1 ^B	4,6±0,1 ^B
SZJ	4,5±0,0 ^B	4,5±0,0 ^B	4,5±0,1 ^B	4,5±0,0 ^B	4,5±0,1 ^B
SJ	4,4±0,0 ^A	4,4±0,1 ^A	4,4±0,0 ^A	4,4±0,1 ^A	4,4±0,1 ^A
SPJ	4,5±0,1 ^B	4,5±0,1 ^B	4,5±0,1 ^B	4,5±0,0 ^B	4,6±0,1 ^B
SSZJ	4,4±0,1 ^A	4,4±0,1 ^A	4,4±0,1 ^A	4,4±0,1 ^A	4,4±0,1 ^A

*ABC: az eltérő nagy betűkivevők az oszlopok (fermentált készítmények) közötti szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) jelzik.

Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag ± szórás értékét jelöli.

HJ: Hagyományos joghurt, PJ: Probiotikus joghurt, SZJ: Szinbiotikus joghurt, SJ: Savós joghurt, SPJ: Savós probiotikus joghurt, SSZJ: Savós szinbiotikus joghurt

5.1.3 A termékek színének változása a tárolás folyamán

A hűtve tárolás során a színkoordinátákban nem figyeltünk meg lényeges különbséget, a termékek színe végig stabilnak bizonyult az idő függvényében (10. táblázat). Ha a készítményeket egymással hasonlítjuk össze, akkor elmondható, hogy a háromféle tej alapú készítménynél nem volt szignifikáns különbség egyik színkoordináta esetében sem, azaz sem a probiotikumok, sem a 3%-ban adagolt inulin nem változtatta meg a termékek színét. Habár a savós termékek színkoordinátái nem változtak meg a tárolás során, a savós szinbiotikus joghurt (SSZJ) három vizsgált színkoordinátája közül az L^* érték szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) mutatott a többi termékhez képest. A termékekhez adagolt kiegészítők hatása kritikus tényezőnek számít a színkoordináták szempontjából. A diétás rostok jelenléte megnövelheti az L^* értéket. A termékek zsírtartalmának csökkentése az a^* és b^* értékek csökkenéséhez vezethet (Cais-Sokolinska & Pikul, 2006). A tárolás során előfordulhat a joghurt színének kismértékű megbarnulása, amelyet a Maillard reakciónak, azaz

a nem enzimes barnulásnak tulajdonítanak (Cais-Sokolinska & Pikul, 2006). Az általam használt probiotikum és inulin hatására, ezen változások nem következtek be a tárolás alatt, sem a savós, sem a tejes közegben, tehát a magas csíraszámú adagolt probiotikum és az inulin nem okozott lényeges színváltozást a tárolás alatt.

10. táblázat A fermentált készítmények CIELAB színkoordinátáinak értéke a tárolás során

	0. nap			7. nap			14. nap			21. nap			28. nap		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
HJ	84,6±0,1 ^a	-2,5±0,1 ^a	7,1±0,2 ^a	84,3±0,5 ^a	-2,5±0,1 ^a	7,3±0,3 ^a	85,1±1,4 ^a	-2,6±0,3 ^a	7,5±0,4 ^a	84,8±1,9 ^a	-2,6±0,2 ^a	7,5±0,1 ^a	84,7±0,5 ^a	-2,7±0,3 ^a	7,6±0,6 ^a
PJ	84,5±0,4 ^a	-2,5±0,1 ^a	7,3±0,1 ^a	84,5±0,2 ^a	-2,4±0,2 ^a	7,4±0,3 ^a	84,7±1,9 ^a	-2,5±0,3 ^a	7,6±0,4 ^a	84,5±1,9 ^a	-2,5±0,1 ^a	7,6±0,2 ^a	84,4±0,4 ^a	-2,5±0,4 ^a	7,8±0,7 ^a
SZJ	81,4±0,0 ^a	-3,4±0,1 ^a	8,2±0,8 ^a	81,4±0,6 ^a	-2,4±0,2 ^a	8,1±0,2 ^a	84,6±1,2 ^a	-2,5±0,3 ^a	7,7±0,2 ^a	84,3±1,7 ^a	-2,5±0,1 ^a	7,7±0,2 ^a	84,2±0,4 ^a	-2,6±0,3 ^a	7,9±0,4 ^a
SJ	84,3±0,6 ^a	-3,4±0,1 ^a	7,3±0,2 ^a	81,3±0,3 ^a	-3,3±0,1 ^a	8,3±0,3 ^a	82,1±1,0 ^a	-3,4±0,3 ^a	8,4±0,4 ^a	81,8±1,1 ^a	-3,4±0,2 ^a	8,4±0,1 ^a	81,9±1,3 ^a	-3,5±0,3 ^a	8,4±0,6 ^a
SPJ	81,1±0,4 ^a	-3,3±0,1 ^a	8,3±0,0 ^a	81,2±0,5 ^a	-3,2±0,1 ^a	8,2±0,2 ^a	82,0±1,0 ^a	-3,3±0,3 ^a	8,4±0,3 ^a	81,6±1,4 ^a	-3,2±0,2 ^a	8,4±0,3 ^a	81,9±1,0 ^a	-3,4±0,3 ^a	8,5±0,4 ^a
SSZJ	83,7±0,6 ^b	-2,5±0,1 ^a	7,5±0,1 ^a	83,8±0,5 ^b	-2,4±0,1 ^a	8,2±0,3 ^a	81,0±1,1 ^b	-3,4±0,3 ^a	8,5±0,2 ^a	81,0±1,1 ^b	-3,3±0,2 ^a	8,4±0,3 ^a	80,9±0,1 ^b	-3,4±0,3 ^a	8,5±0,1 ^a

^{ab} eltérő kis betűkitevők szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) jeleznek a különböző termékek között.

Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag ± szórás értékét jelöli.

HJ: Hagyományos joghurt, PJ: Probiotikus joghurt, SZJ: Szinbiotikus joghurt, SJ: Savós joghurt, SPJ: Savós probiotikus joghurt, SSZJ: Savós szinbiotikus joghurt

5.1.4 *Alvadék szilárdság vizsgálata a tárolás folyamán*

A starter kultúra okozta pH csökkenés elősegíti a stabil gél szerkezet kialakulását, amely a joghurt egyik fontos jellemzője. A joghurtok műszeres alvadékvizsgálata során kapott értékek alapján az állományban a négy hét folyamán nem tapasztaltam szignifikáns különbséget ($P \geq 0,05$) (11. táblázat). A tejes és a savós joghurtokat külön vizsgáltam statisztikai szempontból, mivel állományuk összetételüknél fogva eredendően eltért. A savós ivójoghurtoknál a szárazanyag-tartalom, és ezen belül a fehérje- és zsírtartalom kisebb, mint a hagyományos joghurtban, ezért az állománya is lágyabb. A tejes joghurtok kanalazós, míg a savós joghurtok ivó joghurtnak felelnek meg állomány szempontjából, így a hat termék együtt nem hasonlítható össze.

Vizsgálatomban a tejes, kanalazós joghurtoknál az inulint tartalmazó szinbiotikus joghurt (SZJ) állománya szignifikánsan különbözött ($P < 0,05$) a hagyományos (HJ) és probiotikus joghurttól (PJ) (11. táblázat), azonban az inulin az alvadékszilárdságot kedvezőtlenül befolyásolta. A savós ivójoghurtoknál a probiotikus joghurt (SPJ) F_{max} értéke szignifikánsan ($P < 0,05$) kisebb volt, mint az inulint tartalmazó SSZJ mintáé. A fentiekből következik, hogy 3% inulin alkalmazásával textúra javulást sikerült elérni a savóval kiegészített joghurtok esetében, azonban a tej alapú joghurtnál az inulin hozzáadása előnytelen volt a kialakult gél szilárdsága szempontjából.

Az inulin, amellett, hogy prebiotikum, állományjavítóként is használható. Görög joghurtokban az inulin kedvezőbb reológiai tulajdonságokkal rendelkező terméket eredményezett, mint az egyéb fruktooligoszacharidok (Costa, 2019). Az inulin különösen hasznos állományjavítónak bizonyult olyan esetekben, mikor a készítmények

szárazanyag-tartalmának csökkentése miatt azok állaga egyébként túl lágy lett volna. Guggisberg (2008) kis zsírtartalmú joghurtok kedvezőtlen állagát inulin adagolásával tudta javítani. Solowiej (2015) csökkentett zsírtartalmú sajtához adagolt inulint, amelynek hatására a termék állománya javult. Kátay és munkatársai (2013) szerint nincs technológiai akadály a akár 75% savót tartalmazó fermentált tejtermék előállításának sem, ehhez azonban állományjavító adalék szükséges. Guo és munkatársai (2018) megállapították, hogy a tejsavófehérje és az inulin közötti kölcsönhatások hatást gyakoroltak a tejsavófehérje gélesedési tulajdonságaira, függetlenül az inulin hozzáadásának módjától.

11. táblázat A fermentált készítmények alvadék szilárdságának változása a tárolás függvényében

	0.	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét
HJ	4,4±0,8 ^A	3,7±0,1 ^A	4,1±0,1 ^A	4,1±0,1 ^A	4,1±0,2 ^A
PJ	4,3±0,8 ^A	4,0±0,2 ^A	4,0±0,3 ^A	3,7±0,7 ^A	3,5±1,3 ^A
SZJ	4,0±1,1 ^B	3,9±0,8 ^B	3,5±0,1 ^B	3,1±0,5 ^B	2,8±0,0 ^B
SJ	1,2±0,1 ^C	1,1±0,2 ^C	1,0±0,0 ^C	1,1±0,2 ^C	1,1±0,1 ^C
SPJ	0,9±0,2 ^D	1,0±0,0 ^D	1,0±0,1 ^D	1,0±0,2 ^D	0,9±0,0 ^D
SSZJ	1,2±0,0 ^E	1,2±0,1 ^E	1,2±0,0 ^E	1,1±0,2 ^E	1,0±0,0 ^E

*^{ABC}: az eltérő nagy betűk a szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) jeleznek a termékek között. Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag ± szórás értékét jelöli. HJ: Hagyományos joghurt, PJ: Probiotikus joghurt, SZJ: Szinbiotikus joghurt, SJ: Savós joghurt, SPJ: Savós probiotikus joghurt, SSZJ: Savós szinbiotikus joghurt

5.1.5 Beltartalmi vizsgálat

A tej és a tejsavó egyaránt tartalmaz esszenciális aminosavakat, teljes értékű fehérjét, zsírsavakat, valamint ásványi anyagokat és vitaminokat,

azonban eltérő mennyiségben. A savó szárazanyag tartalma lényegesen kisebb, mint a tejé. Az édes tejsavó legfőbb oldott összetevője a laktóz, ezen kívül savófehérjét, kis mennyiségű zsírt, ásványi anyagokat és vitamint tartalmaz. A 12. táblázatban az előállított készítmények legfontosabb beltartalmi adatait szemléltetem, melyek mérése a gyártást követően történt. A tej átlagos fehérjetartalma 3,3% körüli érték, esetünkben a tejes joghurtok fehérjetartalma a hagyományos joghurt esetében 2,9%, probiotikus joghurt és a szinbiotikus joghurtnál pedig 2,8% volt. Az édes tejsavó fehérje tartalma 1% alatt van, azonban a savós joghurtok fehérje tartalma ennél lényegesen nagyobb volt, az 50%-os tej kiegészítésnek köszönhetően, a savós joghurt 1,7%, a savós probiotikus és szinbiotikus joghurtok pedig 1,8% fehérjét tartalmaztak. A tejes és savós joghurtok fehérjetartalma szignifikánsan különbözött egymástól ($P < 0,05$). A tehéntej átlagos zsírtartalma 3,8%, azonban ez az érték tág határok között mozoghat. A savó alacsony zsírtartama miatt a savós ivójoghurtok szignifikánsan kevesebb zsírt tartalmaztak, mint a nekik megfelelő tejes joghurtok ($P < 0,05$) (12. táblázat). A savó kiegészítéssel így sikerült olyan pro- és szinbiotikus készítményeket előállítani, melyek a 100%-ban tejből készült termékekhez viszonyítva lényegesen kisebb zsírtartalommal rendelkeznek. A tej legfontosabb szénhidrátja a laktóz, a kiindulási tej alapanyag laktóz tartalma 5% körüli, ez a fermentáció végére csökken. A tej alapú joghurtoknál a probiotikus kultúrákkal kiegészített termékek (PJ és SZJ) laktóztartalma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a csak starterkultúrát tartalmazó joghurtoké (HJ). Ez arra utal, hogy a kiindulási azonos laktóz-szint nagyobb mértékű bontása ment végbe a PJ és SZJ mintáknál, mint a HJ mintánál, mivel a starterkultúra baktériumok mellett a probiotikus baktériumok is szerves savakká fermentálták a tejcukor egy részét. Ez

összhangban van a pH értékeknél megfigyelt tendenciával (9. táblázat), ahol a probiotikus kultúrákkal kiegészített tejes joghurtok (PJ, SZJ) pH értéke kisebb volt, mint a probiotikumot nem tartalmazó (HJ).

A savót is tartalmazó joghurtokban az inulint nem, csak probiotikumot tartalmazó SPJ minta laktóz tartalma kisebb volt, mint a probiotikum nélkülié (SJ), azaz itt is jelentősebb laktózbontás ment végbe, feltehetőleg a probiotikumok hatására; azonban az inulint tartalmazó probiotikus termék (SSZJ) laktóz szintje megegyezett az SJ mintáéval (12. táblázat). Továbbá, az SPJ és az SSZJ probiotikus savós minták laktóz tartalma szignifikánsan különbözött egymástól. Ennek a két terméknek a kiindulási összetétele és gyártása teljesen azonos volt, az egyetlen eltérést az inulin jelenléte (SSZJ) vagy hiánya (SPJ) jelentette. Az adatok alapján (12. táblázat) inulin jelenlétében a laktóz bontás kevésbé volt intenzív, mint annak hiányában, a savós mintákban. Feltehetőleg a savós közegben a probiotikus baktériumok előnyben részesítették az inulint a tejcukorral szemben. Ezzel szemben, mikor a joghurt alapanyaga 100% tej volt, ez a jelenség nem volt megfigyelhető, a laktóz azonos mértékben bomlott el inulin jelenlétében (SZJ) és annak hiányában (PJ).

12. táblázat. A fermentált készítmények összetétele a gyártást követően

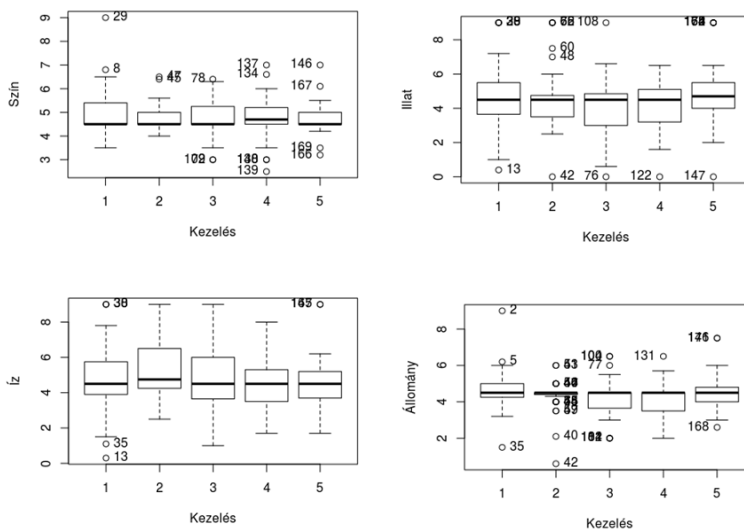
Joghurtok	Nedvesség tartalom %	Nyersfehérje tartalom %	Nyerszsír tartalom %	Laktóz tartalom %
HJ	88,2±0,0 ^C	2,9±0,05 ^B	3,9±0,3 ^B	3,3±0,04 ^B
PJ	88,2±0,0 ^C	2,8±0,06 ^B	3,5±0,1 ^B	2,7±0,01 ^A
SZJ	85,1±0,0 ^A	2,8±0,06 ^B	3,5±0,1 ^B	2,8±0,05 ^A
SJ	91,0±0,1 ^D	1,7±0,06 ^A	2,2±0,1 ^A	3,3±0,06 ^B
SPJ	91,0±0,1 ^D	1,8±0,06 ^A	2,0±0,1 ^A	2,7±0,04 ^A
SSZJ	85,5±0,1 ^B	1,8±0,06 ^A	2,3±0,3 ^A	3,4±0,11 ^B

*ABC: az eltérő nagy betűkifevők a szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) jelzik egy oszlopban a különböző termékek között. Mindegyik adat 3 ismétlés átlag ± szórás értékét jelöli. HJ: Hagyományos joghurt, PJ: Probiotikus joghurt, SZJ: Szinbiotikus joghurt, SJ: Savós joghurt, SPJ: Savós probiotikus joghurt, SSZJ: Savós szinbiotikus joghurt

5.1.6 Humán érzékszervi vizsgálat

A magyar vásárlók szerint fontos, hogy az általuk elfogyasztott élelmiszerek milyen táplálkozás-élettani előnyökkel rendelkeznek, azonban a termékválasztást az ár mellett alapvetően az organoleptikus sajátságok határozzák meg (Székely, 2004), ezért fontos, hogy a pro- és szinbiotikus készítményeknél azok érzékszervi tulajdonságai is feleljenek meg a fogyasztói igényeknek.

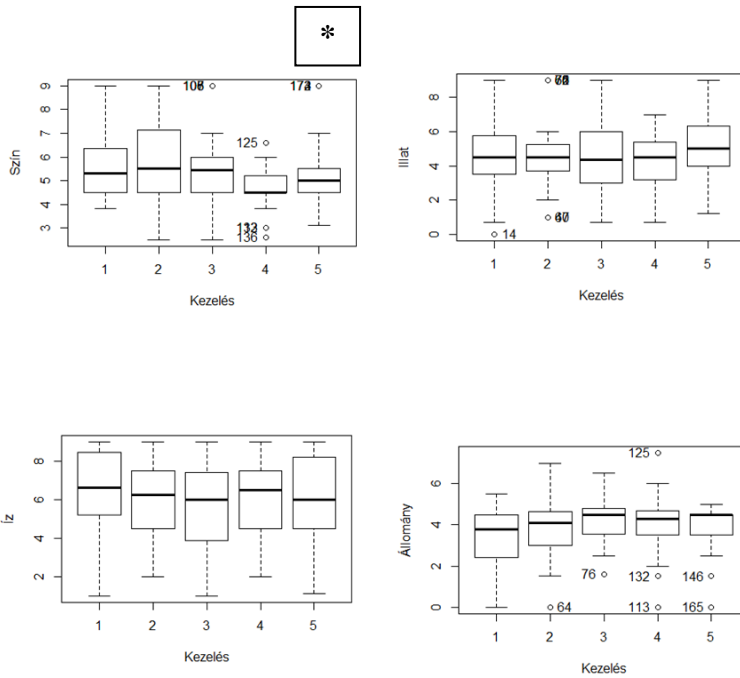
Vizsgálatom során a bírálók először a tej és a savó alapú termékek érzékszervi tulajdonságainak (szín, illat, íz, állomány) változását értékelték a tárolás során, majd ezt követően egy nagy tételben forgalmazott bolti joghurttal hasonlították össze az általam előállított tej- valamint tej- és savó alapú készítményeket. A 9. ábrán a bírálók által a tej alapú készítményekre adott pontszámok statisztikai értékelésének grafikus megjelenítését láthatjuk a tárolási idő függvényében. A statisztikai elemzés alapján megállapítható volt, hogy a tejet tartalmazó kanalizós termékeknel a 4 hetes tárolás során a színre, illatra, ízre és az állagra nem állapítottak meg eltérést a bírálók az adott pontszámaik alapján, tehát a tárolás folyamán nem volt tapasztalható szignifikáns változás ($P \geq 0,05$) (9. ábra).



9. ábra Tejes joghurtok érzékszervi bírálati tulajdonságai. Íz, szín, illat, állomány szerinti pontértékek boxplot diagramjai a 4 hetes tárolás függvényében.

n=14 tréningezett kóstoló bevonásával. Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag ± szórás értékét tartalmazza. °=kiugró értékek. (Kezelés 1=0. nap, 2=1 hét, 3=2. hét, 4=3. hét, 5=4. hét)

A savós, ivó joghurtok esetében a szín kivételével nem volt szignifikáns változás a termékeknél ($P > 0,05$) az idő függvényében. A savós termékek színe a bírálók pontszámai alapján szignifikánsan megváltozott a tárolás során ($P < 0,05$) (10. ábra).



10. ábra Savós ivójoghurtok érzékszervi bírálati tulajdonságai. Íz, szín, illat, állomány szerinti pontértékek boxplot diagramjai a 4 hetes tárolás függvényében.

n=14 tréningezett kóstoló bevonásával. *szignifikáns különbség ($P < 0,05$). Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag \pm szórás értékét tartalmazza. \circ =kiugró értékek. (Kezelés 1=0. nap, 2=1. hét, 3=2. hét, 4=3. hét, 5=4. hét)

A savós hagyományos joghurt esetében összességében a szín, illat és állomány tekintetében szignifikáns eltérést tapasztaltunk ($P < 0,05$) egy elfogadott bolti joghurthoz képest (13. táblázat). Az íz vonatkozásában a termék nem tért el, mivel a pontszámok átlaga 4,5 volt, és a bírálók a joghurtra jellemző, intenzív, kellemes ízt tapasztaltak. A probiotikus savós joghurt esetében szín, íz, és állomány tekintetében szignifikáns különbséget tapasztaltak ($P < 0,05$), míg az illat nem tért el a normál joghurttól. A savós szinbiotikus készítmény mindegyik tulajdonságát tekintve szignifikánsan eltért ($P < 0,05$) a normál joghurttól.

A szín az 50% savóval történő kiegészítés miatt a bírálók szerint kis mértékben a zöldesebb tartományba mozdult el. Más szerzők szerint azonban még a 65%-os savó részarány nem rontja a fermentált tejtermékek érzékszervi megítélését (Castro és mtsai., 2013).

13.táblázat A savós ivó-joghurtok és a tejes kanalazós joghurtok pontszáma a normál bolti joghurthoz képest (4,5 pont).

Ivó-joghurtok			
Normál joghurthoz képest eltér-e? (4,5)	Savós hagyományos joghurt	Savós probiotikus joghurt	Savós szinbiotikus joghurt
Szín	5,3±1,6*	5,5±1,4*	5,6±1,6*
Illat	3,9±2,0*	4,8±2,0	5,5±1,8*
Íz	4,5±2,2	6,5±1,8*	7,1±1,4*
Állomány	4,0±1,2*	3,9±1,2*	3,8±1,5*
Kanalazós joghurtok			
Normál joghurthoz képest eltér-e? (4,5)	Hagyományos joghurt	Probiotikus joghurt	Szinbiotikus joghurt
Szín	4,5±0,6	5,1±1*	4,9±0,7*
Illat	3,8±1,4*	4,7±1,8	4,7±2,0
Íz	4,0±1,4*	5,0±1,6*	5,5±1,8*
Állomány	4,4±0,7	4,7±1,1	4,1±1,1*

n=14 tréningezett kóistoló bevonásával.

* szignifikáns különbség (P<0,05).

Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag ± szórás értékét jelöli.

Az általam előállított hagyományos („kanalazós”) joghurt a bírálók szerint illat és íz szempontjából szignifikánsan eltért (P<0,05), míg színe és állománya azonban a bolti joghurtnak megfelelő volt. A probiotikus joghurt szintén különbözött ízében, valamint a színében is (P<0,05) a bolti joghurttól. A kanalazós (tejes) joghurtok közül a szinbiotikus joghurtot találták a legkülönbözőbbnek a bolti joghurthoz viszonyítva,

mivel csupán illatában nem tért el, színe, íze és állománya viszont különbözött a bolti joghurttól ($P < 0,05$).

Összességében elmondható, hogy a savóval kiegészített termékek szignifikáns mértékben eltértek a normál joghurttól szín, illat és íz és állomány tekintetében, azonban a pontszámok átlagai, az íz kivételével, nem tértek el drasztikusan a 4,5-ös (normál joghurthoz viszonyított) értéktől. A savós hagyományos joghurt ízében még nem éreztek eltérést a bírálók (13. táblázat); mikor viszont a joghurtok már nagyszámú (több, mint 10^8 CFU/ml, 7. és 8. táblázat) probiotikus baktériumot tartalmaztak (savós probiotikus és savós szinbiotikus joghurt), ízük, a többlet-fermentáció termékei miatt, túl savanykásnak bizonyult. A tejes („kanalazós”) termékeknél is érvényesült az a tendencia, hogy a probiotikumokat tartalmazó készítmények íze kissé savanykásabb volt, mint a normál joghurté, azonban kisebb mértékben, mint a savós készítményekben.

Kátay és munkatársai (2013) arról számoltak be, hogy az 50% valamint 75% savót tartalmazó termékek fogyasztói fogadtatása kedvező volt, továbbá a bírálóknál nem merült fel, hogy a készítmények savót tartalmaznak, azonban ebben az esetben a joghurtok hozzáadott aromát, gyümölcsíz is tartalmaztak, amely jelen vizsgálatban nem volt a receptúra része. Lendvai és munkatársai (2012) inulinnal kiegészített, magas csíraszámú szinbiotikus joghurtot készítettek. Az organoleptikus vizsgálatba 188 különösebb előtapasztalattal nem rendelkező egyént vontak be, és a készítmények minden fontosabb érzékszervi tulajdonságban (szín, illat, íz, állomány) elnyerték a kóstolók tetszését, esetükben is aromát és hozzáadott ízanyagot használtak ízesítésre.

A fentiekből következik, hogy a probiotikumokat is tartalmazó termékek esetében, a kedvezőbb érzékszervi fogadtatás érdekében a natúr joghurt helyett célszerűbb ízesített joghurtokat előállítani.

5.2 *Szimulált humán emésztési vizsgálat eredményei*

5.2.1 *In vitro Infogest emésztés*

A probiotikus baktériumokkal szemben alapvető követelmény, hogy az emésztőenzimeknek nagy mértékben ellenálljanak, mivel így tudnak kellően nagy számban eljutni hasznosulási helyükre, a vastagbélbe. A probiotikumok kiválasztásának fontos kritériuma, hogy tolerálják a gyomor savas kémhatását, valamint a vékonybélben az epesavak jelenlétét. Ennek vizsgálatára a nemzetközileg elfogadott standardizált Infogest modellt alkalmaztam.

A funkcionális probiotikus törzsekkel dúsított élelmiszerek népszerűsége egyre nagyobb, azonban mellettük igen elterjedtek a probiotikus étrendkiegészítő kapszulák is. Míg a liofilizált baktériumokat tartalmazó terápiás kapszulák stabilitása több hónapon keresztül különösebb probléma nélkül biztosított, addig az élelmiszerekbe kerülő baktériumok életképességére és szaporodására számos tényező gyakorol hatást, az élelmiszer mátrix összetételétől a gyártás egyes lépésein keresztül egészen a fogyasztást megelőző tárolásig. A fogyasztást követően, az emberi emésztőrendszerben tovább módosul a mikrobaszám, melynek mértékét az is befolyásolhatja, hogy a probiotikum élelmiszerral, vagy csak önmagában (kapszula formájában) kerül a szervezetbe, ugyanis az élelmiszer mátrix az emésztőrendszerben egyfajta védőhatást hozhat létre. Ennek vizsgálata érdekében az *in vitro* emésztés során a tejes és tejes-savós joghurtokon kívül a két probiotikus

baktériumot liofilizált formában tartalmazó, cellulózzal bevont kapszulákat is megvizsgáltam. A további *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok során végig ezt az elrendezést alkalmaztam, azaz a probiotikus baktériumok tranzittoleranciáját nemcsak az adott komplex élelmiszer mátrixban, hanem tiszta formában, étrendkiegészítőként alkalmazható kapszulában is elemeztem.

Az *in vitro* Infogest emésztés vizsgálat során a friss joghurtkészítmények komplexen a startert, valamint a starter kultúrát és két alkalmazott probiotikumot és/vagy prebiotikumot is egyaránt tartalmazták. A 14. táblázatban látható a starterkultúra baktériumok, valamint a probiotikus baktériumok csíraszámának alakulása az *in vitro* Infogest emésztési vizsgálat során. A vizsgálatokat az eddig használt hatféle joghurtkészítményen kívül a probiotikumokat tartalmazó kapszulával is elvégeztem. A vizsgálat megkezdésekor (0. perc, 14. táblázat) minden probiotikus joghurtminta tartalmazta a terápiás hatás eléréséhez a FAO/WHO által megkövetelt minimális probiotikus életképes sejtszámot, amelynek a minimálisan megállapított 1×10^6 CFU/ml felett kell lennie.

A két probiotikum kiváló gyomorsav-toleranciát mutatott (15. táblázat), túlélési arányuk a tejes probiotikus joghurtnál a LA-5 esetében 92,4%, a BB-12 esetében 93,8% volt, míg a szinbiotikus joghurtnál a LA-5 esetében 85,9%, a BB-12 esetében 93,3%-volt. A savós joghurtoknál a túlélési arányuk ennél alacsonyabb volt, a savós probiotikus joghurtnál a LA-5 89,6%-a, a BB-12 88,7%-a élte túl a gyomorfézist, míg a savós szinbiotikus joghurtnál a LA-5 85,3%-a, a BB-12 77,6%-a maradt életképes. Az étrendkiegészítő kapszuláknál az LA-5 esetében 84,8%, míg a BB-12 89,2% volt az arány élelmiszermátrix nélkül, cellulóz burokokban (15. táblázat). A jó tolerancia

képesség folytatódott a vékonybél fázis során is. A baktériumok gyomorsav toleranciáját tekintve, szignifikáns különbség volt a starter kultúrák, valamint a BB-12 és az LA-5 probiotikus baktériumok között ($P < 0,05$), azonban a két starter baktérium között nem volt szignifikáns eltérés a gyomor fázis során ($P \geq 0,05$). A starter kultúrák, ahogy várható volt, kisebb mértékű túlélési képességet mutattak. A hagyományos joghurt baktériumok (*Streptococcus thermophilus* és *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) nem rendelkeznek probiotikus tulajdonsággal, mivel sejtjeik sérülnek és elpusztulnak a gyomor-bél traktuson való áthaladás során; ennek ellenére, Vinderola és munkatársai (2003) szerint, alkalmasak a laktóz intolerancia tüneteinek enyhítésére. Napjainkban csak kevés *in vitro* vagy preklinikai vizsgálat támasztja alá a *S. thermophilus* vagy *L. bulgaricus* törzsek probiotikus hatását (Bailey, 2011), jelenleg, ezen baktériumokat nem soroljuk a probiotikus baktériumok közé. A szinbiotikus és savós szinbiotikus joghurtoknál a gyomor fázis után a *L. bulgaricus* csíraszámja erősen lecsökkent (1,4 CFU/ml), majd a vékonybél fázis után újra növekedett (3,8-3,6 CFU/ml). Az emésztés során a *L. bulgaricus* és *S. thermophilus* csíraszámja olyan nagy mértékben csökkenhet, hogy egyes kutatók szerint a székletmintából már ki sem mutathatók (Del Campo és mtsai., 2005, Pedrosa és mtsai., 1995), míg Mater és munkatársai (2005) szerint a rendszeresen fogyasztott joghurt mindkét starter baktériuma kimutatható volt. A starter baktériumok, a probiotikumokkal szemben, nem jól tolerálják az emberi gyomor erősen savas körülményeit, érzékenyek az alacsony pH-értékre (Conway és mtsai., 1987). Hood és munkatársai 2-es pH-értéken, 45 perc után már nem tudtak *Lactobacillus bulgaricus*-t kimutatni (1988).

A BB-12 kedvezőbb túlélése összekapcsolható a megnövekedett glikolitikus aktivitás pufferhatásával, amint azt más *Bifidobacterium* törzsekben (Ruiz és mtsai., 2011) kimutattak, vagy a tejből származó fehérjék pufferhatásával, amely védi a törzseket az emésztési körülmények káros hatásától, lehetővé téve a probiotikus törzsek jobb túlélését (Tamime és mtsai., 2017). Számos publikáció bizonyítja a *B. lactis* BB-12 gasztrointesztinális körülmények közötti jobb túlélését élelmiszermátrixban (Munoz és mtsai., 2018). A probiotikus baktériumok életképességét több tényező javíthatja, többek között a magasabb pH érték, a nagyobb pufferkapacitás, a jobb tápanyag-elérhetőség, valamint az alacsony oxigéntartalom (Kim és mtsai., 2018). A *L. acidophilus* a sav-stressz ellensúlyozására számos mechanizmussal rendelkezik, citoplazmája viszonylag nagy pufferkapacitású, amely lehetővé teszi, hogy az intracelluláris pH-ja savas körülmények között se változzon meg jelentős mértékben (Ng és mtsai., 2011). A tej, mint élelmiszermátrix fizikai és kémiai tulajdonságai javíthatják a probiotikus baktériumok életképességét, a mátrix nélküli kapszulához képest, ennek oka a magasabb pH-érték, nagyobb pufferkapacitás, jobb tápanyag-elérhetőség, alacsony oxigéntartalom valamint a zsír és a fehérje jelenléte, melyek a mátrixot sűrűbbé teszik (Kim és mtsai., 2018). Ez az állítás igazolódott esetünkben is a tejes probiotikus (LA-5: 92,4%, BB-12: 93,8%) és a tejes szinbiotikus joghurt (LA-5: 85,9%, BB-12: 93,3%) esetében, hiszen nagyobb mennyiségben élték túl a gyomor szakaszt, mint a kapszulában található baktériumok (LA-5: 84,8%, BB-12: 89,2%). Természetesen az emésztési fázisok kedvezőtlen körülményeivel szembeni ellenállás erősen függ az adott baktérium törzstől, vizsgálatomban ez meghatározóbb volt, mint az élelmiszermátrix jelenléte vagy hiánya, robosztus probiotikumok

esetében az adott baktérium valamennyi mátrixban kedvezően viselkedik.

Míg a gyomor fázis során nem volt különbség a starter baktériumok túlélési százalékában, a vékonybél fázis során a starter baktériumok szignifikánsan különböztek egymástól ebből a szempontból ($P < 0,05$).

A joghurtokhoz adagolt inulin esetében nem tapasztaltam, hogy kedvező hatást gyakorolt volna a joghurtkultúrák és a probiotikumok csíraszámára (15. táblázat). Pinto (2017) megállapítása szerint, az inulinnal mikrokapszulázott BB-12 esetében a prebiotikum nem befolyásolta lényegesen a probiotikum túlélését a humán emésztés során.

Vizsgálatomban a probiotikumok kellően magas számban érték el a vastagbelet, ami azt jelenti, hogy a terápiás célnak megfelelő 4 - 5 log CFU/ml számban voltak jelen a vékonybél fázis végén, mind a joghurtoknál, mind a kapszulánál (14. táblázat), (tejes probiotikus joghurtnál 5,2-5,5 CFU/ml, szinbiotikus joghurtnál 4,1-5,7 CFU/ml, savós probiotikus joghurtnál 5,2-5,4 CFU/ml, savós szinbiotikus joghurtnál 4,2-4,2 CFU/ml, a kapszuláknál pedig 4,6-5,6 CFU/ml). Az előállított savós joghurtok megfelelő probiotikus vivőanyagok voltak egészen a vékonybél fázis végéig, hiszen a probiotikumok túlélésének mértékében nem volt különbség a kapszulához vagy a tejes joghurtokhoz képest. Az Infogest emésztés vékonybél fázisa után 24 órás inkubációs idő leteltével beoltatlanul vizsgáltam meg a kapott digestát. A 24 óra alatt csupán fermentációs inkubálás történt, tehát itt már nem voltak hatással emésztőenzimek a beoltott anyagra, ennek következtében valósulhatott meg, hogy a baktériumok szaporodtak és a BB-12 túlélési százaléka magasabb értékkel rendelkezett, mint az előtte lévő fázisok során.

A bifidobaktériumok egyik fontos tulajdonsága, hogy képesek gátolni más baktériumok szaporodását pl. rövid szénláncú zsírsavak vagy antimikrobiális (bakteriocin) anyagok termelése által (Martinez és mtsai., 2013). A vastagbél fázist a BB-12 mindegyik közegben, nagyobb mértékben ($P < 0,05$) élte túl, mint a digestában jelen lévő többi baktérium (15. táblázat). A vastagbél szakasz folyamán a BB-12 szintje a tejes szinbiotikus és a savós probiotikus és szinbiotikus, valamint a kapszula esetében is növekedésnek indult. A rövid távú kevert inkubáció során a BB-12 képes volt kedvező körülményeket teremteni a szaporodása érdekében. Az egyik ilyen körülményt a kórokozók gátlásával tette lehetővé. A probiotikumok egyik kritériuma a kórokozókkal szembeni gátló hatás kifejeződése, gátló anyagok (szerves savak, H_2O_2 , bakteriocinek) előállítás, tápanyagverseny kialakulása révén (Jungersen és mtsai., 2014). Ez a későbbi patogén elleni hatásvizsgálatban (11. ábra) is látható, ahol a savós termékek és a kapszula képes volt visszaszorítani a *C. perfringens* mennyiségét. További antagonista hatásokat pl: verseny a tapadási helyekért, ez esetben, nem lehetett vizsgálni a modell limitált felépítése miatt. A BB-12 antagonista hatása széles körűen bizonyított több potenciális kórokozóval szemben (Collado és mtsai., 2007). Továbbá a BB-12 önmagában, illetve *L. rhamnosus* LGG-vel együttesen jelentősen csökkentette a patogének kitapadását bélhámsejt modellben (Collado és mtsai., 2007).

Összességében elmondható, hogy a BB-12 nemcsak a gyomor-bél traktuson való áthaladás során marad vissza kedvező számban, hanem átmenetileg kolonizálja a vastagbelet is. Három hétig tartó 10^{8-11} CFU/nap dózisú adagolás esetében a széklet mintában kimutatható volt a BB-12 jelenléte (Matto és mtsai., 2006, Jungersen és mtsai., 2014).

Hasonló tapasztalatra vezetett a fentiekben bemutatott *in vitro* vizsgálat is.

14. táblázat A vizsgált baktériumok csíraszámának alakulása tejes és savós joghurtokban az egyes humán emésztési fázisokban.

Emésztési fázis	Hagyományos joghurt Log CFU/ml		Probiotikus joghurt Log CFU/ml				Szinbiotikus joghurt Log CFU/ml			
	S.t.	L.b.	S.t.	L.b.	LA5	BB12	S.t.	L.b.	LA5	BB12
Kiindulás 0. perc	9,3±0,1	6,6±0,1	8,7±0,1	8,3±0,1	8,2±0,1	8,4±0,0	9,1±0,1	7,3±0,1	7,2±0,1	8,4±0,0
Gyomor fázis után 120. perc	6,3±0,2	3,4±0,0	5,2±0,2	7,1±0,1	7,6±0,0	7,8±0,1	6,6±0,0	1,4±0,0	6,2±0,1	7,9±0,1
Vékonybél fázis után 120 perc	4,5±0,1	3,4±0,0	3,4±0,0	3,4±0,0	5,2±0,0	5,5±0,0	4,2±0,1	3,8±0,2	4,1±0,0	5,7±0,1
Vastagbél fázis után 24 óra	1,4±0,0	1,4±0,0	1,4±0,1	1,4±0,0	3,1±0,4	3,2±0,3	1,4±0,0	3,1±0,4	3,8±0,1	6,5±0,1
Emésztési fázis	Savós joghurt Log CFU/ml		Savós probiotikus joghurt Log CFU/ml				Savós szinbiotikus joghurt Log CFU/ml			
	S.t.	L.b.	S.t.	L.b.	LA5	BB12	S.t.	L.b.	LA5	BB12
Kiindulás 0. perc	9,1±0,1	1,8±0,2	8,7±0,1	2,2±0,5	7,9±0,0	8,3±0,0	8,7±0,0	3±0,6	7,7±0,0	7,5±0,1
Gyomor fázis után 120. perc	3,8±0,1	1,4±0,1	5,1±0,1	5,1±0,0	7,1±0,1	7,4±0,1	4,4±0,1	1,4±0,0	6,5±0,0	5,9±0,2
Vékonybél fázis után 120 perc	1,4±0,0	1,4±0,1	3±0,0	1,4±0,0	5,2±0,1	5,4±0,1	4,1±0,1	3,6±0,0	4,2±0,1	4,2±0,0
Vastagbél fázis után 24 óra	1,4±0,0	1,4±0,1	1,4±0,0	1,4±0,0	3,5±0,1	6,6±0,2	1,4±0,0	1,4±0,0	2,5±0,3	7,3±0,1
Emésztési fázis	Kapszula Log CFU/ml									
	LA5	BB12								
Kiindulás 0. perc	8,6±0,1	8,3±0,1								
Gyomor fázis után 120. perc	7,3±0,1	7,4±0,2								
Vékonybél fázis után 120 perc	4,6±0,2	5,6±0,4								
Vastagbél fázis után 24 óra	2,8±0,1	7,7±0,1								

15. táblázat A vizsgált baktériumok túlélési százalékának alakulása tejes és savós joghurtokban az egyes humán emésztési fázisok során.

Baktérium túlélési százalék	Hagyományos joghurt (%)		Probiotikus joghurt (%)				Szinbiotikus joghurt (%)			
	S.t.	L.b.	S.t.	L.b.	LA5	BB12	S.t.	L.b.	LA5	BB12
Gyomor fázis után 120. perc	68,5 ^A	52,2 ^A	58,6 ^A	85,6 ^A	92,4 ^B	93,8 ^C	72,5 ^A	19,7 ^A	85,9 ^B	93,3 ^C
Vékonybél fázis után 120 perc	48,3 ^A	52,2 ^B	38,8 ^A	41,6 ^B	63,4 ^B	66,2 ^B	46,7 ^A	51,7 ^B	56,6 ^B	68,2 ^B
Vastagbél fázis után 24 óra	15,4 ^A	21,7 ^B	16,1 ^A	17,2 ^B	38,1 ^B	38,1 ^C	15,8 ^A	42,0 ^B	52,4 ^B	76,6 ^C
Baktérium túlélési százalék	Savós joghurt (%)		Savós probiotikus joghurt (%)				Savós szinbiotikus joghurt (%)			
	S.t.	L.b.	S.t.	L.b.	LA5	BB12	S.t.	L.b.	LA5	BB12
Gyomor fázis után 120. perc	41,5 ^A	78,1 ^A	58,4 ^A	n. a.	89,6 ^B	88,7 ^C	50,9 ^A	41,5 ^A	85,3 ^B	77,6 ^C
Vékonybél fázis után 120 perc	15,8 ^A	78,1 ^B	34,2 ^A	67,4 ^B	65,4 ^B	65,1 ^B	46,4 ^A	94,9 ^B	54,4 ^B	54,9 ^B
Vastagbél fázis után 24 óra	15,7 ^A	78,1 ^B	16,4 ^A	67,4 ^B	44,1 ^B	78,1 ^C	16,4 ^A	41,4 ^B	32,2 ^B	96,8 ^C
Baktérium túlélési százalék	Kapszula (%)									
	LA5	BB12								
Gyomor fázis után 120. perc	84,8 ^B	89,2 ^C								
Vékonybél fázis után 120 perc	53,3 ^B	67,2 ^B								
Vastagbél fázis után 24 óra	32,9 ^B	92,8 ^C								

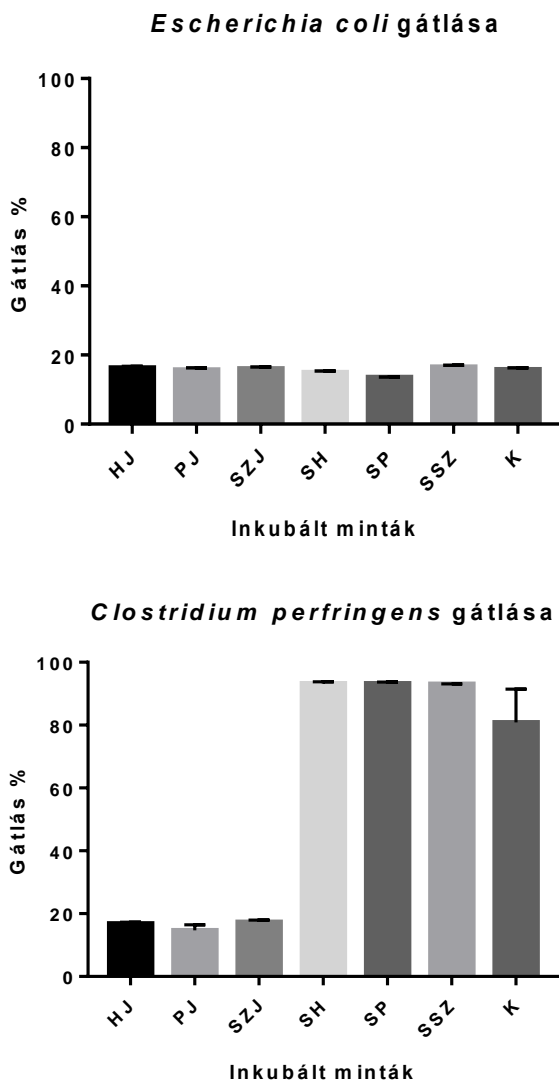
^{ABC}: az eltérő nagy betűkitekők a szignifikáns eltérést ($P < 0,05$) jelzik egy soron belül. Mindegyik adat 3 ismétlés átlag \pm szórás értékét jelöli, n.a.: nincs adat

5.2.2 Patogén gátlás

Ismeretes, hogy a tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok jelentős hányada gátolja más mikroorganizmusok szaporodását, ezért az általam alkalmazott probiotikumokat is megvizsgáltam ilyen szempontból. A vékonybél fázist követően a digestát patogén mikrobákkal oltottam be, a probiotikumok által kifejtett esetleges gátló hatás megfigyelése érdekében. A 11. ábrán látható, hogy a savót tartalmazó készítmények és a probiotikus kapszula erősen gátolta a *C. perfringens* növekedését, ezzel szemben csak kis mértékben tudták visszaszorítani az *E. coli* szaporodását. A *C. perfringens* gátlása magyarázható a probiotikum által termelt szerves savak (tejsav és ecetsav) pH csökkentő hatásával, valamint a bakteriális tevékenység során termelődő hidrogén-peroxiddal, vagy baktericid hatással rendelkező fehérjék jelenlétével (Gibson, 1995). A *C. perfringens* nagyobb arányban történő gátlása nem valósult meg, amikor a csak tej alapú készítményeket tartalmazó digestát inkubáltuk. Fontos azonban megjegyezni, hogy mikor négy baktériumos modellt alkalmaztam a beoltás során (*E. coli*+*C. perfringens*+*L. casei*+*B. longum* subsp. *infantis*), abban az esetben mind a tejes termékek, mind a savós termékek gátolták a *C. perfringens* szaporodását. Ennél fogva a tejes termékek *C. perfringens* gátlása további vizsgálatot igényel.

Az *E. coli* szennyeződés jelenléte a tej kezelésének és feldolgozásának nem megfelelő higiéniai színvonalát mutatja. Az *E. coli* pasztörözéskor elpusztul, így a már pasztörözött tejben való jelenléte reinfekcióra utal. Olyan aerob gázképző gram-negatív, mely a tejtermék puffadását, erőteljes szinerézisét okozza. Egészségre igen veszélyes O157:H7 szerotípusa a haemorrhagiás kolitist okozza, mely képes a joghurt fermentáció alatt is szaporodni akár 6 log CFU/ml

nagyságrendben, kedvezően adaptálódik a savas környezethez és képes különböző szénforrásokat felhasználni, mint például glükóz, laktóz vagy galaktóz (Cutrim és mtsai., 2017).



11. ábra: A joghurt készítmények hatása egyes patogén mikrobák növekedésére

Mindegyik adat 3 ismétlés átlag \pm szórás értékét tartalmazza. HJ: Hagyományos joghurt, PJ: Probiotikus joghurt, SZJ: Szinbiotikus joghurt, SH: Savós joghurt, SP: Savós probiotikus joghurt, SSZ: Savós szinbiotikus joghurt. K: Kapszula:BB-12+LA-5.

A 16. táblázatban az általam előállított joghurtok előnyeit és hátrányait összesítem a technológiai, valamint a szimulált humán emésztési vizsgálat eredményei alapján.

16.táblázat A termékek összehasonlítása a technológiai tulajdonságok és az *in vitro* humán emésztési vizsgálat alapján

Kísérleti termék	Előnyök	Hátrányok
Hagyományos joghurt	Tárolás 4 hete alatti stabilitás.	Normál bolti natúr joghurthoz viszonyítva íz és illat eltérést tapasztaltak a bírálók
Probiotikus joghurt	Tárolás 4 hete alatti stabilitás. *Humán emésztés során kedvező probiotikus csíraszám.	Normál bolti natúr joghurthoz viszonyítva íz és szín eltérést tapasztaltak a bírálók
Szinbiotikus joghurt	Tárolás 4 hete alatti stabilitás. *Humán emésztés során kedvező probiotikus csíraszám.	Normál bolti natúr joghurthoz viszonyítva íz, szín és állomány eltérést tapasztaltak a bírálók. Műszeres alvadékszilárdságot negatívan befolyásolta az inulin. Az adagolt prebiotikumnak nem volt hatása a csíraszámra a tárolás során, azonban a probiotikus csíraszám csökkenésének tendenciája kisebb volt (probiotikus joghurthoz képest).
Savós joghurt	Tárolás 4 hete alatti stabilitás. Alacsonyabb zsírtartalom (normál bolti joghurthoz képest). *Humán emésztés során kedvező probiotikus csíraszám. Gátolta a <i>C. perfringens</i> szaporodását.	Normál bolti natúr joghurthoz viszonyítva állomány, szín, illat eltér.
Savós probiotikus joghurt	Tárolás 4 hete alatti stabilitás. Magasabb tárolás alatti probiotikus csíraszám (tejes joghurtokhoz képest). Alacsonyabb zsírtartalom (normál bolti joghurthoz képest). *Humán emésztés során kedvező probiotikus csíraszám. Gátolta a <i>C. perfringens</i> szaporodását.	Normál bolti natúr joghurthoz viszonyítva állomány, szín, íz (túl savanykás) eltér.
Savós szinbiotikus joghurt	Tárolás 4 hete alatti stabilitás. Magasabb tárolás alatti probiotikus csíraszám (tejes joghurtokhoz képest). Az inulin az alvadék szilárdságot kedvezően befolyásolta. Alacsonyabb zsírtartalom (normál bolti joghurthoz képest). *Humán emésztés során kedvező probiotikus csíraszám. Gátolta a <i>C. perfringens</i> szaporodását.	Normál bolti natúr joghurthoz viszonyítva minden szempontból eltért (szín, íz, illat, állomány) eltér. Az inulin nem gyakorolt előnyös hatást a probiotikus csíraszámra a tárolás során.

*Humán emésztés (*in vitro*) vizsgálatok

5.3 *In vitro* vizsgálatok eredményei

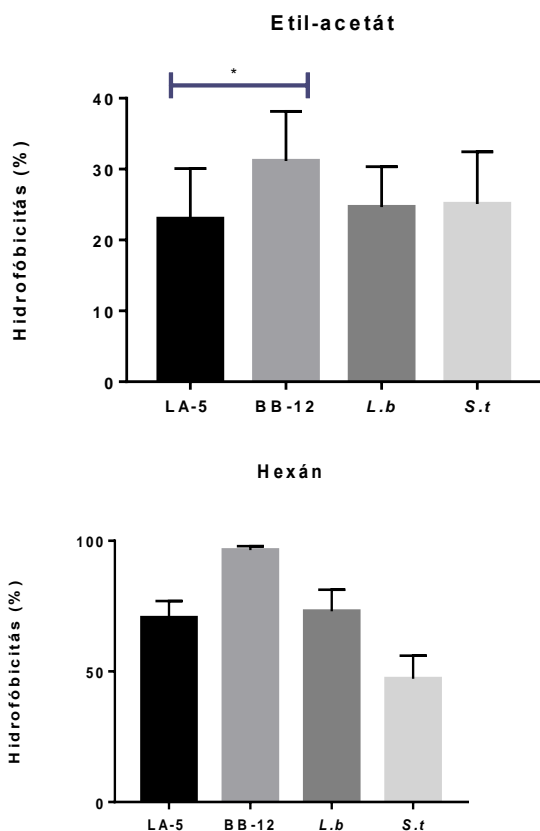
5.3.1 *Hidrofóbicitás és elektronakceptor képesség vizsgálata*

A baktériumok sejtekhez való tapadását számos tényező befolyásolja. A kialakuló reverzibilis kötést meghatározó fiziko-kémiai tulajdonságok közül kiemelkedően fontos a sejtfelület polaritása, hidrofil vagy hidrofób jellege, valamint, hogy a felület rendelkezik-e elektron donor/elektron akceptor sajátsággal (Da-Yong Ren és mtsai., 2013). A kolonizációt meg kell előznie az adhéziónak, ezért az adhéziós vizsgálatok tovább árnyalják a vizsgált törzsek probiotikus potenciáljáról alkotott képet. Ennek értelmében felderítettem, hogy milyenek a vizsgált mikrobák adhéziós képességei; tehát megvizsgáltam a baktériumok hidrofóbicitását, valamint elektronakceptor képességüket. A mikrobák oldószerekhez köthető adhéziós képességének vizsgálata (MATS) egy nem-specifikus adhéziós módszer, a baktériummembránok hidrofób jellegének és elektron fogadó tulajdonságainak felmérésére. A hidrofób és hidrofil tulajdonságokat, ezáltal az adhézió mértékét a baktériumsejtek felszínén levő fehérjék és poliszacharidok egyaránt befolyásolják (Chauviere és mtsai., 1992). A hexánnal való kioldás mértéke a baktériumok felületének hidrofób jellegét, az etil-acetáthoz való affinitás a baktériumsejt felszínének elektronakceptor tulajdonságait jellemzi (Kos és mtsai., 2003).

A BB-12 és az LA-5, valamint a starter kultúra összetevői (L.b. és S.t., 12. ábra) nagyobb affinitást mutattak a hexánhoz, mint az etil-acetáthoz. Az etil-acetáttal szembeni affinitás 31% vagy annál kevesebb volt, amely azt mutatta, hogy a vizsgált törzsek elektronakceptor sajátsága viszonylag alacsonyabbnak bizonyult.

A vizsgált törzsek között a hidrofobicitás-értékben csak a BB-12 esetén volt különbség (31%), amely szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb affinitást mutatott az etil-acetát felé, mint a másik probiotikus baktérium, a LA-5 (22%) (12. ábra). A két starter baktérium affinitása (25% *S.t.* és 24% *L.b.*) nem különbözött szignifikánsan a LA-5-től. Vinderola és Reinheimer (2003) vizsgálatai szintén igazolták a BB-12 hidrofób jellegét. Ebből adódóan a BB-12 sejtfelszíni adottságai olyanok, hogy a baktérium képes megtapadni és ezt követően kolonizálódni a bélrendszerben. A két probiotikus baktérium, a BB-12 96%, az LA-5 70%, az *L. bulgaricus* tenyészet 73%, a *S. thermophilus* pedig 47%-ban viszonylag nagy affinitást mutatott a hexánhoz. A legnagyobb értéket ebben az esetben is a BB-12 törzs esetében kaptuk, hasonlóképpen Vinderola és Reinheimer (2003) eredményeihez.

Shakirova (2012) szerint a sejtfal hidrofobicitása összefüggésben van azzal is, hogy milyen mértékben képesek elviselni a probiotikus baktériumok a szélsőséges környezeti körülményeket. A sejt felületi tulajdonságok és az ezekre kapott vizsgálati eredmények fontos információval szolgálnak a mikroorganizmus fiziológiai és technológiai tulajdonságaikról. Amikor kedvezőtlen körülményeknek tették ki az LA-5 és BB-12 baktériumokat (fagyasztás-felolvasztás, hosszú távú tárolás, epesavnak történő kitettség) sejtszámuk egyenes arányosságot mutatott a hidrofobicitás értékkel (Shakirova 2012). A BB-12 kiváló technológiai tulajdonságokkal rendelkezik, magas stabilitást mutat az élelmiszerekben és fagyasztva szárított készítményekben. A BB-12 törzs esetében *in vitro* vizsgálatokkal bizonyították, hogy képes erősen megtapadni a gyomor nyálkahártyán (Jungersen, 2014).



12. ábra: A starter kultúrát és a probiotikumot alkotó baktériumok sejt felszínének jellemzése MATS vizsgálattal

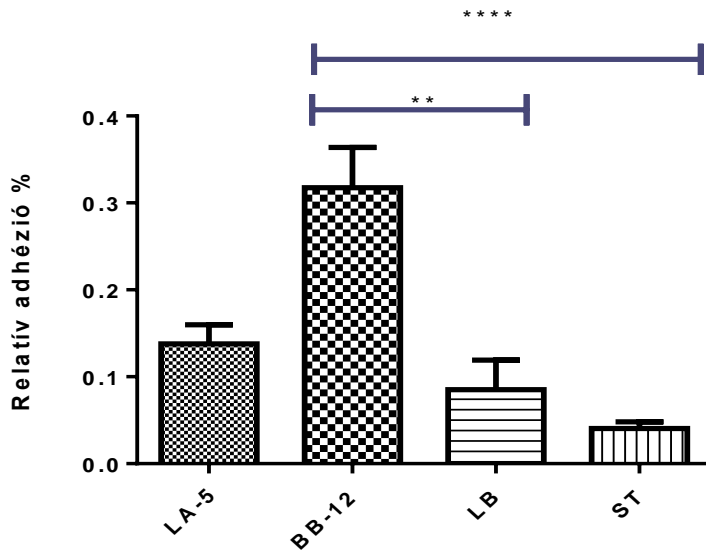
* a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,05$). Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag \pm szórás értékét tartalmazza. S.t.: *S. thermophilus*, L.b.: *L. bulgaricus*.

Vinderola és Reinheimer (2003) vizsgálatai szerint, a starter kultúrát alkotó baktériumok kevésbé hidrofób jellegűnek mutatkoztak, mint a vizsgált probiotikus baktériumok, esetünkben ez nem feltétlenül volt így a probiotikus LA-5 (70%) és a starter *L. bulgaricus* (73%) esetén.

5.3.2 Adhéziós vizsgálat

Miután a baktériumok túlélették a gyomor és bélrendszer számukra kedvezőtlen hatásait, képesnek kell lenniük arra, hogy megtapadjanak a bélhámsejtek felületén. A probiotikus törzsek kiválasztásánál a gazdahámsejtekhez és a nyálkahártya felületéhez való kitapadási képesség igen fontos kritérium. A probiotikumokat és a starter kultúra baktériumait HT-29 és az enterocita szerű Caco-2 emberi vastagbél karcinómából származó sejtvonalban vizsgáltam, melyeket a FAO/WHO iránymutatásai javasolnak probiotikus törzsek epiteliális sejtekhez való tapadási képesség vizsgálatára (13. és 14. ábra). A hosszabb ideig történő bélben való jelenlét és hatékonyabb gazda-mikrobiális kölcsönhatás előfeltétele a patogének versenyképes kizárásának. Az adhéziós képesség, akár csak a hidrofób képesség, szintén törzsfüggő. (Sharma és mtsai., 2017).

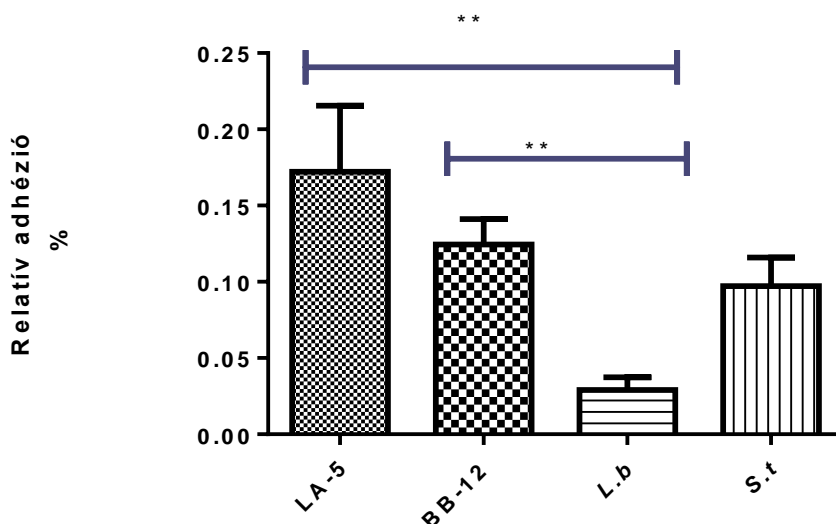
Összességében megállapítható, hogy BB-12 probiotikus törzs, ahogyan számítottunk rá, mindkét bélhámsejt vonalban nagyobb relatív adhéziót mutatott, mint a starter törzsek. A BB-12 a Caco-2 sejtek esetében szignifikánsan nagyobb ($P < 0,01$) tapadási képességet mutatott (0,31%), mint a két starter baktérium (LB. 0,08%, ST. 0,04%) (13. ábra).



13. ábra A starterkultúrát és a probiotikumot alkotó baktériumok adhéziós képességének vizsgálata Caco-2 bélhámsejthez

* a szignifikáns különbséget jelzi ** ($P < 0,01$), **** ($P < 0,0001$). Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag \pm szórás értékét tartalmazza..
S.t.: *S. thermophilus*, L.b.: *L. bulgaricus*

A HT-29 esetében (14. ábra) a LA-5 és a BB-12 szignifikánsan kedvezőbb ($P < 0,01$) kötődő képességet mutatott a HT-29 sejtvonalhoz (0,17% és 0,12%), mint a *L. bulgaricus* (0,02%).



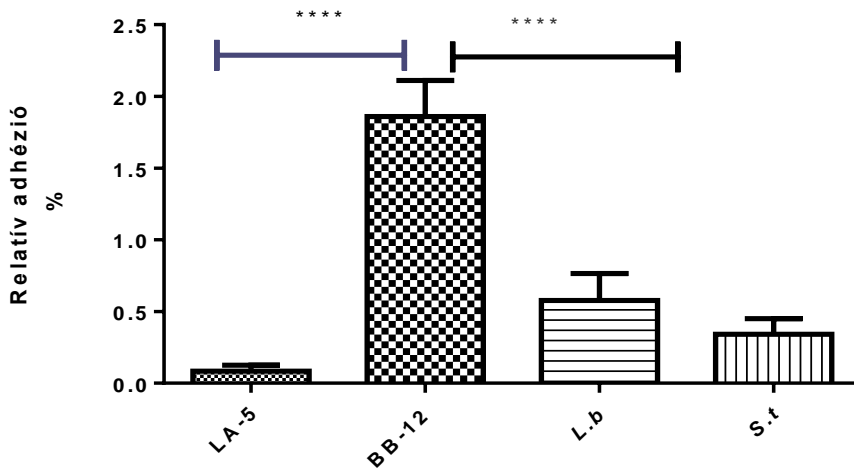
14. ábra A starterkultúrát és a probiotikumot alkotó baktériumok adhéziós képességének vizsgálata HT-29 bélhámsejthez

** a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,01$). Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag \pm szórás értékét tartalmazza. S.t.:*S. thermophilus*, L.b.:*L. bulgaricus*.

Többen korrelációt figyeltek meg a sejt felületének hidrofóbicitása és az adhézió között (Collado, 2007), míg mások nem találtak közöttük jelentős összefüggést, melyet a környezeti tényezők különbözőségének tulajdonítottak (Borecká & Melkusová, 2008, Högfors-Rönholm, 2010). Vizsgálataim során nem találtam egyértelmű kapcsolatot a hidrofóbicitás (MATS) és a HT-29 sejt kultúrához való adhézió között. A probiotikumok közül a BB-12 rendelkezett a magasabb hidrofóbicitás értékekkel (12. ábra), viszont a HT-29 sejt kultúrával végzett adhéziós kísérletben az LA-5-nél magasabb adhéziós értékeket kaptam, mint a BB-12 esetében (14. ábra). Ezzel szemben, korreláció figyelhető meg a hidrofóbicitás és a Caco-2 sejt kultúrával végzett adhéziós vizsgálat között, mivel a nagyobb hidrofóbicitást mutató BB-12 egyben nagyobb adhéziót is mutatott ehhez a sejtvonalhoz, mint a LA-5 (13. ábra).

Xu és munkatársai szerint (2009) a baktériumok hidrofóbicitás értéke erősen korrelál patogén gátló képességükkel, valamint az *in vitro* adhézió és *in vivo* kolonizáció mértékére is lehet a segítségével következtetni. Ennél fogva ajánlatos vizsgálni a baktériumok sejtfalának hidrofóbicitását, hiszen fontos információt ad az *in vitro* interakciókról a gazdaszervezet epithéliális sejtjeivel kapcsolatban. A HT-29 és Caco-2 sejtvonalak használata igen gyakori, azonban a módszer még távol áll az *in vivo* sejteken történő tapadásvizsgálat tökéletes modellezésétől. Az eredmények ugyan iránymutatóak, azonban hosszú távú következtetéseket nem vonhatunk le, hiszen a módszer keverten használja a vastag és vékonybél fenotípusokat, valamint a karcinogén sejtek felülete és összetétele eltér a normál sejtektől (Vinderola és mtsai., 2017).

Mivel a bélnyálka az első védelmi gát, amely lefedi a béltraktus hámsejtjeit, a bélnyálka-adhézions képesség szintén fontos kiválasztási kritérium a potenciális probiotikumok számára. A nyálka réteg komplex glikoproteineket (mucin) és glikolipideket tartalmaz, amelyek védelmet nyújtanak a gazdatest számára a káros antigénekkal szemben, valamint tápanyagot és tapadási helyet is szolgáltat. A mucinhoz való tapadás a bélben történő kolonizáció előfeltételének tekinthető (Carasi és mtsai, 2014). A bélnyálka dinamikusan változó közegéhez történő tapadás átmeneti, mivel amely mikrobák nem érik el a hámsejteket, azok kimosódnak a leválasztódott mucinnal együtt, majd a széklettel együtt távoznak a bélből. A két probiotikum és a starter kultúra mucinhoz történő tapadási képességét a 15. ábra szemlélteti.



15.ábra A starterkultúrát és a probiotikumot alkotó baktériumok mucinhoz való adhéziós képességének vizsgálata

**** a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,0001$). Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag \pm szórás értékét tartalmazza. S.t.: *S. thermophilus*, L.b.: *L. bulgaricus*

A BB-12 szignifikánsan ($P < 0,0001$) nagyobb mértékben tapadt a mucinhoz (1,86%), mint a LA-5 (0,08%) és a starter kultúrák (L.b. 0,57%, S.t. 0,34%) (15. ábra). A törzsek egy bizonyos része tehát nem képes megtapadni a bélfalon és kolonizációra sem képes, azonban a tranzitutasok hasznossága sem kérdőjelezhető meg, mivel képesek elősegíteni a probiotikumok adhézióját és a visszaszorítani a rothasztó baktériumok növekedését (Szakály, 2004).

Általában véve a BB-12 nagyobb adhéziós képességgel rendelkezett a sejtekhez és a mucinhoz egyaránt, mint a starter kultúra mikrobái. A starter kultúra két baktériuma között nem volt szignifikáns különbség e tekintetben. A BB-12 adottságai a megtapadás szempontjából előnyösnek mutatkoztak mind a hidrofób jelleg, mind az adhéziós tulajdonságok szempontjából.

A sejtvonalakhoz való kötődés mértékét becsülő, különböző alapokon nyugvó adhéziós tesztek eredményei között néha igen jelentős különbségek vannak; például a *L. rhamnosus* GG vagy a *L. casei* Shirota nagyon alacsony kötőképességet mutattak a Caco-2 sejtekhez műanyag felületeken, ehhez képest a normális bélfunkciót modellező rendszerekben mintegy 50%-os adhéziót tapasztaltak (Cencic & Langerholc, 2010). Az alkalmazott sejtvonalak az érett enterociták morfológiai és funkcionális tulajdonságaival rendelkeznek és a legtöbb receptort, enzimet, transzporter fehérjét expresszálják, azonban mégsem képesek tökéletesen modellezni a humán emésztőrendszert. Ugyanis ezeknél a vizsgálatoknál sok olyan tényező nincs jelen, amely az adhéziót szintén befolyásolja, mint például a béltartalom perisztaltikus áramlása, vagy az eredetileg a bélben jelen lévő mikrobapopuláció (Jensen és mtsai., 2011). Fentiekből következik, hogy a tényleges adhéziós képességről pontosabb képet kapunk, amennyiben az *in vivo* vizsgálatok eredményeit is figyelembe vesszük. Általános, nemzetközileg elfogadott protokoll nincsen ezekre a vizsgálatokra, ezért az adatok összehasonlításánál figyelembe kell venni, hogy szinte ahány kutatócsoport, annyi féle protokoll által elvégzett vizsgálat van.

5.3.3 *Immunválasz vizsgálat*

A baktériumok bélfelszínen történő megtapadása és kolonizációs képessége a probiotikus hatás kifejtésének fontos előfeltételei. A megtelepedett fajok kölcsönhatásba lépnek a bél nyálkahártyájával és a GALT-al, amely megteremti annak a lehetőséget, hogy immunválasz módosító hatást fejtsenek ki. Az ideiglenesen, átmenetileg kötődő mikrobapopuláció is képes ilyen hatást kifejteni. Vizsgálatom során a

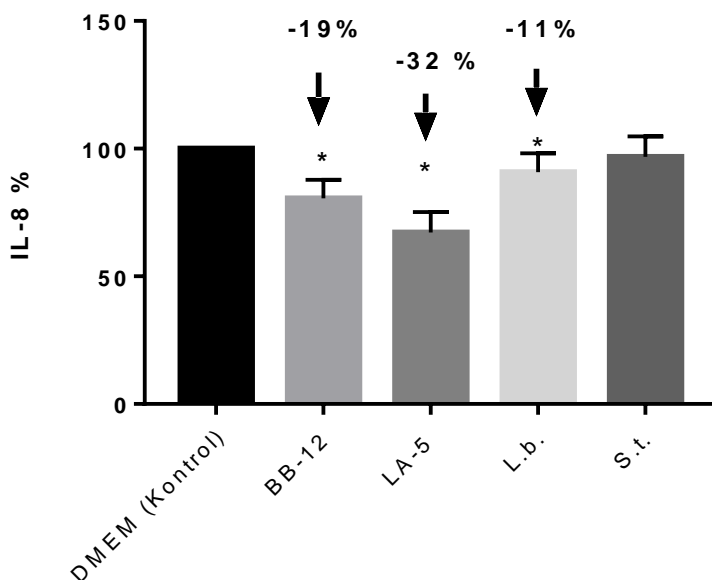
probiotikus baktériumok és a starter kultúra egyes mikrobáinak IL-8 szintre gyakorolt hatását elemeztem. A bél nyálkahártyája alkotja az immunrendszer szöveteinek jelentős hányadát, becslések szerint az immunsejtek mintegy 70%-a itt van jelen (Russo és mtsai., 2014). A bélhámsejtek képviselik az első érintkezési pontot a citokin termelést indukáló baktériumokkal, ennél fogva a probiotikus baktériumok immunmoduláló képessége a probiotikus törzsek értékelésének egyik fontos kritériuma. Mikor patogén mikrobák telepednek meg a bélben, gyulladást elősegítő anyagok kerülnek kiválasztásra. Az IL-8 egy nagyon hatékony gyulladást elősegítő mediátor. Ennek a citokinnak a magas szintjét összefüggésbe hozták olyan gyulladással járó betegségek kialakulásával, mint például a rheumatoid arthritis vagy a fekélyes vastagbélgyulladás. Mivel az IL-8 a gyulladás előjelének számító gyulladáskeltő mediátor (gyulladást elősegítő citokin), ezért a szekréciót fokozó baktériumokat gyulladáskeltőnek vélik, míg a szekréciót meggátoló baktériumoknak gyulladásgátló hatást tulajdonítanak. A gyulladással járó folyamat modellezése érdekében az IL-8 termelést TNF α -val váltottam ki HT-29 sejtenyészetekben, amely alkalmas a gyulladt bélszakasz modellezésére. A gyulladással járó bélbetegségek kialakulása során a bélepithelium oxidatív stressz hatására károsodik. Ilyenkor oxigén és nitrogén tartalmú reaktív szabad gyökök képződnek (RONS) melyek oxidálják az epithelialis sejtmembránok lipid rétegét. A RONS termelődése automatikusan fokozza az olyan gyulladáskeltő citokinek kiválasztását, mint például a TNF- α . A hosszantartó akut gyulladással járó immunválasz sejtkárosodáshoz, az epithelialis gát diszfunkciójához (a bél átteresztőképességének megnövekedéséhez) és patofiziológiai elváltozásokhoz vezethet (Candela és mtsai., 2008).

A vizsgálat során a teszt kimutatta, hogy mind a BB-12 (-19%), mind az LA-5 (-32%) probiotikus törzsek szignifikánsan ($P < 0,05$) csökkentették az IL-8 szekréciónak szintjét (16. ábra). A *S. thermophilus* jelenléte nem csökkentette szignifikánsan az IL-8 szintjét a kontrollhoz képest. A *L. bulgaricus* kisebb mértékben csökkentette az IL-8 kiválasztását, mint a probiotikus törzsek (-11%), azonban IL-8-csökkentő hatása szignifikáns volt.

A BB-12 törzs általam megfigyelt immunmoduláló hatásáról már mások is beszámoltak (Jungersen, 2014). Azonban nemcsak a probiotikus törzsek, hanem az egyik starterkultúra baktérium (*L. bulgaricus*) is szignifikáns mértékben csökkentette a gyulladáskeltő citokin termelést, míg a *S. thermophilus* esetében a hatás nem érte el a szignifikáns szintet.

Megfigyeléseink összhangban vannak több vizsgálat eredményével, melyek a probiotikumok immunmoduláló hatására vonatkoznak. Egy tanulmányban kimutatták, hogy a *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *B. bifidum* probiotikum-keverék és a *S. thermophilus* starter kultúra együttesen képes szabályozni a gazdaszervezet veleszületett és adaptív immunválaszát (Yan & Polk, 2011). Továbbá Vemuri (2018) bizonyította, hogy a *L. acidophilus* és a *B. longum* törzsek szignifikánsan csökkentik a lipopoliszachariddal együtt inkubált HT-29 sejtvonalak IL-8 termelését. Li és munkatársai (2019) megfigyelték, hogy a *L. acidophilus* és a *B. longum* kombinációja csökkentette az IL-8 szekréciónak szintjét és elősegítette a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokkal összefüggő fehérjék expressziójának gátlását. Ezenkívül úgy tűnik, hogy maga az élelmiszer-mátrix, konkrétan a joghurtkészítmény összetétele is hatást gyakorolhat az immunmoduláló tulajdonságok érvényesülésére. Például az alacsony zsírtartalmú joghurt jelentősen csökkentette a gyulladáshoz

folyamatban részt vevő Caco-2 sejtek IL-8 termelését, míg a zsírmentes joghurt nem befolyásolta az IL-8 szekréciót, vagy az IL-8 termelését kisebb hatékonysággal gátolta. A szerzők úgy találták, hogy az alacsony zsírtartalmú joghurt a bélhámsejt-réteg integritásának megtartása révén enyhítette a bélgyulladást (Zhai, 2019).

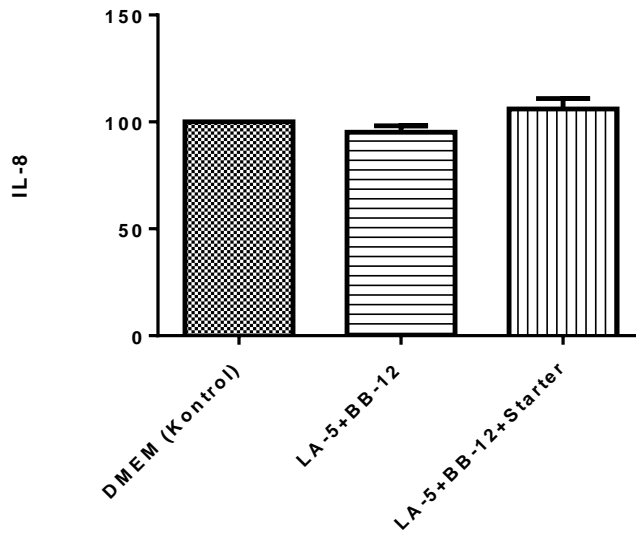


16.ábra A starterkultúrát és a probiotikumot alkotó baktériumok IL-8 szintre gyakorolt hatása

* a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,05$). Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag \pm szórás értékét tartalmazza. S.t.: *S. thermophilus*, L.b.: *L. bulgaricus*

Következő célom az volt, hogy a joghurt készítmények *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását megfigyeljem, ezt megelőzően azonban szükség volt arra, hogy az esetleges bakteriális kölcsönhatásokat is feltérképezsem, mivel a termékekben a vizsgált baktériumok együtt voltak jelen. Ennek érdekében elemeztem, hogy a joghurtokban általam

alkalmazott baktériumok együttes jelenléte milyen hatást gyakorol az IL-8 szintre. A 17. ábrán a probiotikumok együttes hatása (LA-5+BB-12), valamint a starter baktérium plusz a két probiotikum együttes IL-8 szintre kifejtett hatása látható. A két probiotikum együttes hatása messze elmaradt attól, mint amikor azokat külön-külön vizsgáltam (BB-12 19%-os IL-8 csökkenés, LA-5 32%-os IL-8 csökkenés). Amikor a starter kultúrát is hozzáadtam a probiotikumokhoz, akkor az IL-8 szekréciónak további fokozását tapasztaltam, amely azzal járt, hogy a gyulladás csökkentő hatás elmaradt. A 6 órás sejtvonalba történő koinkubáció után nem feltétlenül várható a kevert kultúra alkalmazásakor IL-8 szintre kifejtett csökkentő hatás, így elmondható, hogy szinergens hatást ebben az esetben nem tapasztalható. Hasonlóan nem tapasztaltak szinergikus hatást Candela és munkatársai (2008) amikor *L. acidophilus* és *B. longum* Bar33 együttesen inkubált és vizsgálta az IL-8 citokin szintjére történő hatásukat. Lammers (2002) eredményeiben a starterben előforduló *S. thermophilus* inkubálásakor növekedett az IL-8 szintje, míg ez a növekedés a *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* és több *Bifidobacterium* törzs jelenlétében elmaradt. A probiotikumok bél nyálkahártyán kifejtett citokin indukciója törzs specifikus és dózis függő (Candela, 2008; Nemeth 2006). Ranadheera és munkatársai (2012) véleménye szerint a dózisonál lényegesebb hatást gyakorol a citokin szintre a probiotikumok özetétele.



17. ábra A probiotikumok együttes, valamint a starter kultúrával történt koinkubációjuk utáni IL-8 szintre kifejtett hatása

Mindegyik adat kilenc vizsgálati eredmény (3 párhuzamos x 3 ismétlés) átlag ± szórás értékét tartalmazza. Starter: *S. thermophilus* + *L. bulgaricus*

A vizsgált probiotikumok és starterkultúra baktériumok legfontosabb *in vitro* tulajdonságait a 17. táblázatban foglaltam össze.

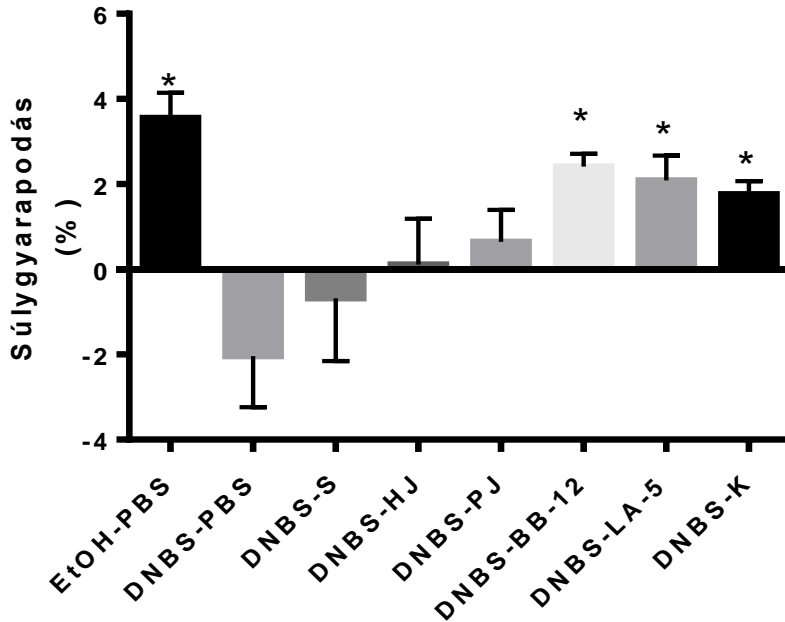
17. táblázat A probiotikumok és starterkultúra törzsek összehasonlítása a vizsgált *in vitro* tulajdonságok tekintetében.

Vizsgált baktériumok/Vizsgált <i>in vitro</i> tulajdonság	Hidrofób jelleg (MATS)	Adhézió (HT-29)	Adhézió (Caco-2)	Mucin adhézió	Gyulladásgátló hatás (IL-8)
LA-5		X			X
BB-12	X	X	X	X	X
L.b.					X
S.t.					

X = A nem jelölt törzs(ek)hez képes jelentősen előnyös hatás.

5.4 *In vivo* vizsgálatok eredményei

A probiotikus és nem probiotikus joghurt vastagbélgyulladásra gyakorolt hatását DNBS (dinitrobenzol-szulfonsav) által kiváltott colitis modellben vizsgáltam. A DNBS hasonló hatást gyakorol a bélrendszerre, mint az IBD patogenezisét kiváltó körülmények, például a nyálkahártya sérülés. A DNBS intrakolonálisan történő bejuttatása során az IBD-s betegségekre jellemző tünetegyüttesek alakulnak ki; olyan makroszkópikus (szabad szemmel látható), szöveti és immunológiai elváltozások, melyeket a modell segítségével megfelelően vizsgálni tudtuk. Az egerek átlagos súlygyarapodása a kontrollcsoportban (EtOH-PBS-csoport, DNBS nélkül) 4% körül volt (18. ábra). A DNBS kezelés szignifikánsan alacsonyabb ($P < 0,05$) értéket okozott, mivel az e csoportba tartozó állatok átlagos tömege a vizsgálat végén 2%-kal csökkent, ez a DNBS által kiváltott gyulladásos folyamatokkal függ össze. A DNBS-sel kezelt csoportokban a probiotikus és a nem probiotikus joghurtok etetése által képesek voltunk csökkenteni a DNBS által okozott súlyvesztést, azonban az ezekkel táplált állatok tömege még mindig szignifikánsan kisebb volt a vizsgálat végén, mint a DNBS nélküli kontroll csoportba tartozóké. A probiotikus törzsek kapszulák formájában történő közvetlen alkalmazása hatékonyabb védelmet nyújtott a DNBS által kiváltott súlycsökkenés ellen, mint a joghurt, mivel a kapszula formájában adott probiotikumok keveréke, és a BB-12 vagy LA-5 probiotikummal kezelt egerek átlagos súlya nem különbözött a kolitisz nélküli kontrolltól (EtOH-PBS).

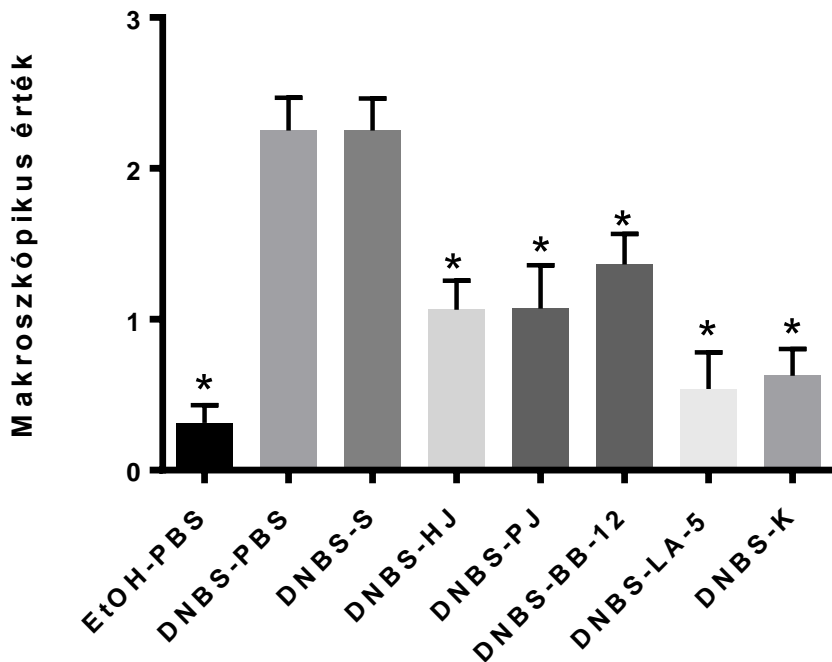


18. ábra Állatok súlygyarapodásának alakulása

* a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,05$) a kolitisz kontrollhoz képest (DNBS-PBS). Mindegyik adat 16 egér átlag \pm szórás értékét tartalmazza.

EtOH-PBS: kolitisz nélküli kontroll, DNBS-PBS: kolitisz kontroll, DNBS-S: Starter kultúra (*S.thermophilus*+*L.bulgaricus*), DNBS-HJ: Hagyományos joghurt, DNBS-PJ: Probiotikus joghurt, DNBS-BB-12: BB-12, DNBS-LA-5: LA-5, DNBS-K: Kapszula: BB-12+LA-5.

A kontroll makroszkopikus (EtOH-PBS) pontszáma szignifikánsan különbözött a DNBS-sel kezelt állatokétól (19. ábra). Ebben a vizsgálatban a probiotikus törzsek mindkét formában, azaz joghurtban és kapszulában is hatékonyan bizonyultak a DNBS káros hatásának enyhítésében. A joghurt a benne lévő törzsekkel együtt ugyanazt a hatást gyakorolta a pontszámokra, mint a probiotikumok önmagukban, élelmiszer-mátrix nélkül. A kontroll és a probiotikus törzseket tartalmazó készítmények és kapszulák között nem volt szignifikáns különbség a pontszámokban (19. ábra).



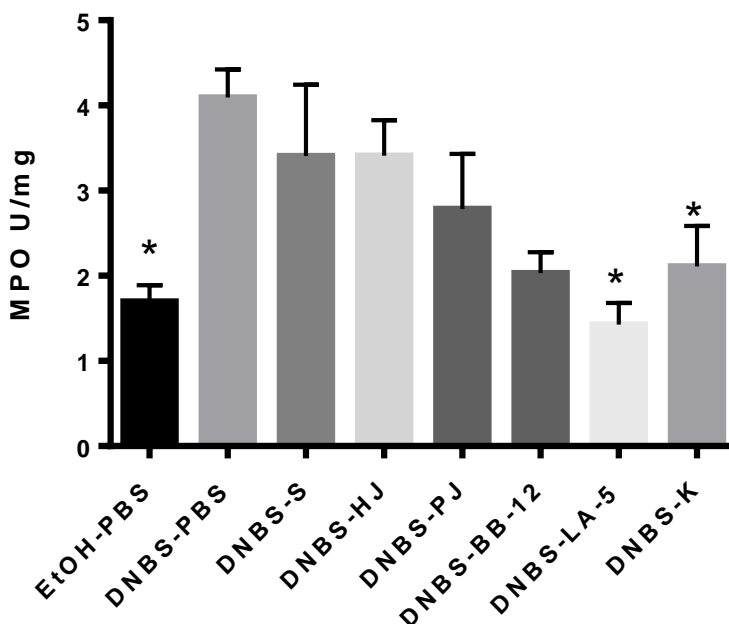
19. ábra Makroszkópikus értékek alakulása

* a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,05$) a kolitisz kontrollhoz képest (DNBS-PBS). Mindegyik adat 16 egér átlag \pm szórás értékét tartalmazza.

EtOH-PBS: kolitisz nélküli kontroll, DNBS-PBS: kolitisz kontroll, DNBS-S: Starter kultúra (*S.thermophilus*+*L.bulgaricus*), DNBS-HJ: Hagyományos joghurt, DNBS-PJ: Probiotikus joghurt, DNBS-BB-12: BB-12, DNBS-LA-5: LA-5, DNBS-K: Kapszula: BB-12+LA-5.

A polimorfonukleáris (vagy karéjos magvú) neutrofilek általi beszivárgás mértékét a szöveti MPO-aktivitással mértük (20. ábra). Az MPO-értékek magasabbak voltak a DNBS-PBS csoportban (4,2 MPO U/mg szövet), mint az EtOH-PBS kontrollcsoportban (1,87 MPO U/mg szövet), mivel a DNBS gyulladást váltott ki. A LA-5 törzs (1,5 MPO U/mg szövet), valamint a két probiotikum együttesen (DNBS-K) meg tudta akadályozni a DNBS miatti granulocita infiltráció növekedést, míg

a BB-12 önmagában, valamint a joghurtok etetése nem okozott szignifikáns csökkenést az MPO aktivitásban a DNBS-PBS kolitisz csoporthoz viszonyítva.



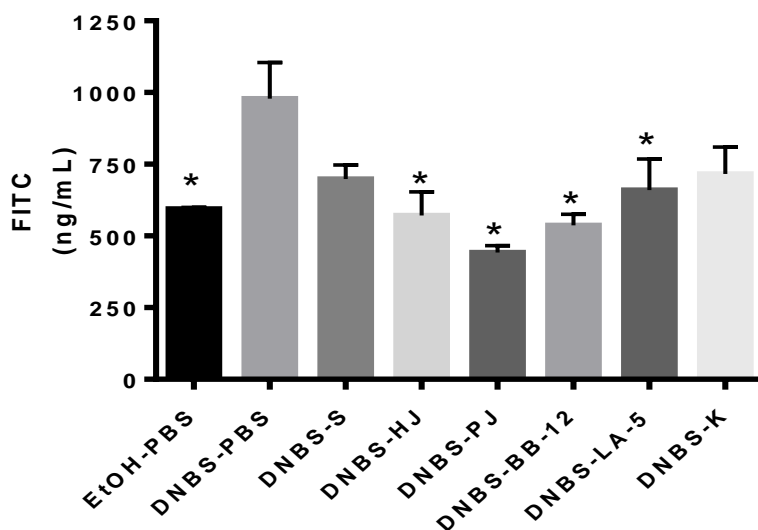
20. ábra Mieloperoxidáz enzim aktivitásának alakulása

* a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,05$) a kolitisz kontrollhoz képest (DNBS-PBS). Mindegyik adat 16 egér átlag \pm szórás értékét tartalmazza.

EtOH-PBS: kolitisz nélküli kontroll, DNBS-PBS: kolitisz kontroll, DNBS-S: Starter kultúra (*S.thermophilus*+*L.bulgaricus*), DNBS-HJ: Hagyományos joghurt, DNBS-PJ: Probiotikus joghurt, DNBS-BB-12: BB-12, DNBS-LA-5: LA-5, DNBS-K: Kapszula: BB-12+LA-5.

A bélnyálkahártya barrier funkciójának romlását FITC-dextrán bejutásának mértékével értékeltük ki DNBS-sel kezelt egerekben. Amint a 21. ábrán látható, a DNBS-sel kezelt egerek bélnyálkahártyája nagyobb permeabilitást mutatott, mint a kontroll egereké ($P < 0,05$), ami igazolja, hogy a barrier funkció a permeabilitás szempontjából megváltozott. A BB-12 és a LA-5 közvetlen beadása, valamint a joghurtok fogyasztása révén elkerülhető volt, hogy a DNBS szignifikáns

permeabilitás növekedést okozzon, mivel ezeknek a csoportoknak a FITC értékei nem különböztek a kolitisz nélküli kontrolltól (EtOH-PBS).



21. ábra in vivo bél permeabilitás vizsgálat

* a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,05$) a kolitisz kontrollhoz képest (DNBS-PBS). Mindegyik adat 16 egér átlag \pm szórás értékét tartalmazza.

EtOH-PBS: kolitisz nélküli kontroll, DNBS-PBS: kolitisz kontroll, DNBS-S: Starter kultúra (*S.thermophilus*+*L.bulgaricus*), DNBS-HJ: Hagymányos joghurt, DNBS-PJ: Probiotikus joghurt, DNBS-BB-12: BB-12, DNBS-LA-5: LA-5, DNBS-K: Kapszula: BB-12+LA-5.

A bél nyálkahártya barrier funkciójának romlása együtt jár a bélfal vizenyő és a permeabilitási markerek fokozott kifejeződésével. A tight-junction zárókapcsolatok romlása baktérium-traszlokációt eredményezhet. A joghurt szájon át történő bevitele immunmoduláló hatást eredményezhet IBD-s betegekben (Shadnoush, 2013), elősegítheti a neutrofilek, bazofilek és T-limfociták irányított vándorlását. Saját vizsgálatom alapján, mikor a BB-12 és LA-5 törzseket tartalmazó joghurt probiotikus tulajdonságait egér DNBS-indukált kolitisz-modellben teszteltem, levonható az a következtetés, hogy a BB-12 és az

LA-5 önmagában vagy kapszulákban, kombinációban szignifikánsan javította a krónikus vastagbél-gyulladás néhány tünetét, mint a súlycsökkenés, a makroszkopikus elváltozások, az MPO aktivitás és a bélrendszer integritásának megbomlása a vastagbélben. Ez a hatás azonban korlátozott volt, amikor a BB-12 és az LA-5 törzseket joghurtkészítményekben adagoltam (18. táblázat).

A joghurtkészítmények tartalmazták a starter kultúrákat is, beleértve a *S. thermophilus* törzset is, amelyet általában nem tekintenek probiotikus baktériumnak. Noha a *S. thermophilus* probiotikus tulajdonságai gyakran összefüggenek a kórokozók kompetitív kizárásával, azt találták, hogy egyes törzsek, például a *S. thermophilus* ST28, a DSS által kiváltott kolitiszes egerekben a bélgyulladást legalább részben enyhítik a gyulladáscsökkentő Th17cellák elnyomásával (Ogita, 2011). Itt az általunk alkalmazott *S. thermophilus* törzs nem volt képes gátolni az IL-8 szint növekedését a HT-29 sejtekben.

A joghurtban található tápanyagkomponensek és a mikrobák egymással komplex kölcsönhatást alakíthatnak ki. Ezek az interakciók módosíthatják a probiotikum jótékony tulajdonságait. Például a *L. casei* 01 törzs, amely gyulladásgátló tulajdonságokkal rendelkezik, nem tudta megakadályozni a dextrán-nátrium-szulfát által kiváltott kolitist, amikor sajt volt a vivőanyag (Cordeiro, 2019). Ezért a probiotikumok továbbítására alkalmas élelmiszer-mátrixok megválasztása alapvető fontosságú tényező, amelyet figyelembe kell venni a funkcionális probiotikus élelmiszerek kidolgozásakor. Mindamellett, a *S. thermophilus* probiotikus státusza továbbra is megkérdőjelezhető, mivel a legtöbb esetben a *S. thermophilus*-t egy másik tejsavbaktérium-törzssel (*L. bulgaricus*) legtöbbször joghurtban adják be (Uriot, 2017).

A *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségébe tartozó probiotikumok sikeres felhasználása az élelmiszerekben és gyógyszerekben a jól bevált egészségfenntartó hatásaikon, és technológiai robusztusságukon alapul. Megállapítottam, hogy a BB-12-nek és az LA-5-nek számos megfelelően igazolható *in vitro* tulajdonsága van, például kiváló gyomorsav-tolerancia, jó bélrendszeri túlélési képesség, adhéziós képesség az emberi bélséjtvonalakhoz és a mucinhoz, valamint immunmoduláló hatás. Ezenkívül a BB-12 és az LA-5 önmagában vagy kapszulákban, kombinációban szignifikánsan javította a krónikus vastagbélgyulladás néhány tünetét *in vivo* (18. táblázat). Ez a hatás azonban korlátozott volt, amikor a BB-12 és az LA-5 törzseket joghurtkészítményekben adták be a starter tenyésztéssel. Következésképpen az indító kultúra befolyásolhatja az élelmiszermatrixba beépített probiotikumok jótékony hatását. Vizsgálatom rámutat arra, hogy a joghurt starter kultúrát megfelelő módon kell kiválasztani annak érdekében, hogy fenntartsuk a probiotikus baktériumok hatékony egészségmegőrző képességét. A kiválasztás során nemcsak a technológiai paramétereket (például a baktériumok életben maradását) kell figyelembe venni, hanem a probiotikus baktériumok jótékony hatásainak fenntartását is.

18. táblázat A joghurtok, a kapszula, a probiotikus törzsek és a starterkultúra vastagbélgyulladásra gyakorolt hatásának összehasonlítása DNBS (dinitrobenzolszulfonsav) által kiváltott colitis modellben

Kísérleti termékek, baktériumok/Kedvező élettani hatás	Súlygyarapodás elősegítése (kolitisz esetén)	Bélfal károsodás enyhítése	Kolitisz miatt kialakuló granulocita infiltráció csökkentése	Bél áteresztő képesség csökkentése
Hagyományos joghurt (<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>)		x		x
Probiotikus joghurt (LA-5+BB-12)		x		x
Kapszula (LA-5+BB-12)	x	x	x	
LA-5	x	x	x	x
BB-12	x	x		x
Starterkultúra (<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>)				

x = Jelentősen előnyös hatás a kontrollhoz képest.

6. Következtetések és javaslatok

- Érdeemes felülvizsgálni a savóról, mint környezetszennyező melléktermékről alkotott elképzelésünket és egy opcionálisan felhasználható, magas biológiai értékkel rendelkező, pozitív élettani hatással rendelkező alapanyagként tekinteni rá. Előnyös összetétele mellett azonban hátrány, hogy gyors mikrobiológiai romlásnak indul nagy víztartalma miatt. A savó hasznosításának egyik lehetséges módja különböző koncentrált termékek előállítása dehidratálással, azonban ennek megvalósításához beruházásigényes technológiai géppark kiépítésére van szükség. Az egyik megoldás a frissen történő felhasználásának megkönnyítésére a fermentációs eljárással történő feldolgozása jelentené közvetlenül a melléktermék keletkezési helyén.
- Az 50% tejsavó 50% tej alapanyagból készült fermentált termékek fizikai, kémiai tulajdonságai és organoleptikus sajátosságai eltértek a csak tej alapanyagból készült termékekétől. A savó alkalmazása, annak kis szárazanyag-tartalma miatt, ivójoghurt jellegű termék létrejöttét eredményezte (alvadék szilárdság vizsgálat). Az inulin – 3%-os mennyiségben (prebiotikumként történő alkalmazása mellett) – kedvezően befolyásolta a savós termékek reológiai tulajdonságait. A savó tartalmú termékek állagának javítására ezért alkalmas lehet a prebiotikumként is használt inulin.
- A savó kiegészítéssel előállított alacsony zsírtartalmú pro- és szinbiotikus joghurt készítmények probiotikus csíraszama 4 hetes

hűtve tárolás alatt az előírt érték felett maradt, illetve a tej felének savóval helyettesítése probiotikus csíraszám-növekedést eredményezett, ezért az 50% tejsavó 50% tej alapanyag alkalmas közeg megfelelő probiotikus csíraszám (BB-12 és LA-5) kialakítására és fenntartására joghurtban.

- A joghurt gyomor-bél traktuson történő áthaladás során (az *in vitro* humán emésztési vizsgálatok eredményei alapján) a savó-mátrix (50% savó-50% tej) csíraszámra gyakorolt hatása nem tért el a tej-mátrixétól. Ebből következik, hogy a probiotikus baktériumok (BB-12 és LA-5) túlélését a savó alkalmazása nem befolyásolta.
- Az emésztési fázisok kedvezőtlen körülményeivel szembeni ellenállás erősen függ az adott baktérium törzstől, vizsgálatomban ez meghatározóbb volt, mint az élelmiszer mátrix jelenléte vagy hiánya. Az általam használt két probiotikum (LA-5 és BB-12) rendkívül robusztusnak bizonyult ebből a szempontból.
- Az alkalmazott starter kultúrában jelen lévő *L. bulgaricus* törzs immunválaszt indukáló hatása (IL-8) további *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat igényel. Az említett baktérium nem probiotikum, azonban az általa kiváltott hatást csak a probiotikusnak számító baktériumok váltják ki.
- A két probiotikum együttesen, illetve a starterkultúra a két probiotikummal együttesen nem indukált jelentős immunválaszt (IL-8), szemben az egyedi vizsgálatokkal. Az antagonista hatás hátterének felderítése további vizsgálatokat igényel.
- Az *in vivo* DNBS-indukált kolitisz állatkísérleti modellben a probiotikus kultúrák (LA-5 és BB-12) ömagukban csökkentették

a betegség tüneteit, azonban ez a hatás kevesebb esetben volt kimutatható, amikor joghurt jellegű készítményekkel együtt adagoltuk azokat. Még kérdéses, hogy ezt az eltérést az élelmiszermatrixban lévő mikro- és makronutriensek, vagy a starterkultúra egyes törzsei okozták-e.

7. Új tudományos eredmények

1. Az 50% savóból és 50% tejből készült, joghurt starter kultúrával (*S. thermophilus*+ *L. bulgaricus*) alvasztott, probiotikus (LA-5 és BB-12, 10^8 CFU/ml) alacsony zsírtartalmú (normál joghurthoz képest $P < 0,05$) ivójoghurt kiegészítése 3% inulinnal kedvezően befolyásolta az alvadék szilárdságot. A négy hetes hűtve tárolási periódus során a probiotikumok csíraszám a kezdeti beállított érték fölött maradt (10^8 CFU/ml), továbbá nem változott a termék pH-ja, színkoordináta értékei, valamint az illata, állománya és íze.
2. A 100% tejből, valamint az 50% tej és 50% savó keverékéből készült, joghurt starter kultúrával (*S. thermophilus*+ *L. bulgaricus*) alvasztott, probiotikus (LA-5 és BB-12 10^8 CFU/ml) joghurtoknál, és a szinbiotikus (3% inulin) joghurtoknál, a szimulált humán emésztési vizsgálatok során, a probiotikumok minden esetben a terápiás célnak megfelelő mértékben (4-5 log CFU/ml) voltak jelen a vékonybél szakasz végén, ugyanúgy, mint a liofilizált farmakológiai kapszula esetében. Ebből következik, hogy a vizsgált probiotikumok emésztési fázisok kedvezőtlen körülményeivel szembeni ellenállása *in vitro* függetlennek bizonyult az élelmiszermatrix összetételétől, valamint annak jelenététől vagy hiányától.
3. Az *in vitro* immunválasz (IL-8) vizsgálat során a starter kultúra *L. bulgaricus* törzse gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki, mivel csökkentette az IL-8 szekréciónak TNF- α -val stimulált HT-29 sejtvonalban.

4. A 100% tejből készült, joghurt starter kultúrával (*S. thermophilus* és *L. bulgaricus*) alvasztott hagyományos joghurt; a probiotikus (LA-5 és BB-12 10^8 CFU/ml) joghurt; valamint a LA-5 és BB-12 probiotikus kultúrák önmagukban, egyaránt enyhítették a DNBS-sel kiváltott kolitisz egyes tüneteit egerekben. Gátolták a makroszkópikus elváltozások kialakulását a bélfalban, valamint használatukkal elkerülhető volt a bél átteresztőképességének jelentős megnövekedése.

8. Összefoglalás

A fermentáció az egyik legrégebbi tartósítási eljárás; már az Ószövetségben is említést tesznek róla, mivel Ábrahám hosszú életét a rendszeres joghurt fogyasztással hozták összefüggésbe, anélkül, hogy ismerték volna a jelenség tudományos hátterét. Napjainkra számos kutatási eredmény bizonyítja a rendszeresen, megfelelő mennyiségben fogyasztott probiotikum egészségre gyakorolt kedvező hatását. Manapság a probiotikus élelmiszerek választéka széleskörű (pl. probiotikus fermentált tejtermékek, italok, gabonapelyhek, hústermékek) valamint táplálékkiegészítő kapszulák formájában is elterjedt a használatuk. Amikor a bélrendszer mikrobiomjának az összetétele kedvezőtlené válik, diszbiózis alakulhat ki, amely előnytelen a gazdaszervezet egészségére nézve. Az egyik legmegfelelőbb módja az „elfeledett szerv” bakteriális újbóli kolonizálására a jótékony bifidobaktériumok és laktobacilluszok alkalmazása. Számos baktériumról bizonyították, hogy probiotikus hatásokkal rendelkezik, közülük a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségből származó törzseket alkalmazzák a leggyakrabban a tejtermékekben és a nem tej alapú élelmiszerekben egyaránt.

A tejtermékek, és köztük a joghurt, alkalmasak olyan nagy hozzáadott értékkel rendelkező funkcionális élelmiszerek előállítására, melyek a probiotikumokat – természetes vivőanyagként – az emberi bélrendszerbe juttatják. A funkcionális élelmiszerek egyfajta határvonalat képeznek az élelmiszerek és a gyógyszerek között, ennél fogva napjainkban egyre inkább a figyelem középpontjába kerülnek egészségmegőrzést elősegítő képességük miatt. Bölcs alternatíva a kiegyensúlyozott étrendbe beilleszteni ezeknek az egészségvédő

komponenseknek a fogyasztását is. A tej és a fermentált tejtermékek gazdag forrásai olyan ágenseknek, melyek képesek kedvező hatást gyakorolni az emésztőrendszer működésére, a mikrobiomra és az immunrendszerre. Ez a kedvező hatás vagy közvetlen probiotikus hatás (kölcsonhatás a mikroflórával), vagy közvetett biogén hatás (mikrobiális metabolitok termelése) révén valósul meg. Napjainkban a fogyasztók érdeklődése növekszik az egészség védelmét támogató, a primer prevenciót elősegítő élelmiszerek iránt. A közegészségügy stratégiai céljai közé tartozik a kiegyensúlyozott étrend élethosszigan való fenntartása, mivel ezzel számos betegség és betegséget megelőző/kiváltó állapot elkerülhető. Ide tartoznak az úgynevezett „nyugati betegségek” kialakulásával szorosan összefüggő állapotok, és megbetegedések, mint például az irritábilis bélszindróma (IBD), Crohn-betegség (CD), rák, kóros elhízás, 1-es és 2-es típusú cukorbetegség, policisztás ovárium szindróma (PCOS), bakteriális vaginózis (BV) és asztma.

A tejtermékek gyártása során keletkező tejsavó számos az egészségre nézve előnyös funkcióval rendelkezik, kedvező energiaforrás, magas esszenciális aminosav és oldható vitamintartalom, azonban hátránya, hogy viszonylag gyorsan romlásnak indul. A savó hasznosításának egyik lehetséges módja frissen történő felhasználása, fermentációs eljárással történő feldolgozása, közvetlenül a melléktermék keletkezési helyén.

A doktori disszertáció témája olyan pro- és szinbiotikus ivójoghurt jellegű tejtermék kifejlesztésének megalapozása volt, amelyben a tej egy részét savóval helyettesítettem. Megvizsgáltam, hogy a készítményekben felhasznált LA-5 és BB-12 probiotikumok, az inulin prebiotikum, valamint a savó alkalmazása milyen mértékben változtatja meg a készítmények tulajdonságait a hagyományos joghurthoz

viszonyítva. A termékgyártás jövőbeni megalapozása érdekében a készítményeket egy négy hetes hűtve tárolási periódus alatt is vizsgáltam, melynek során meghatároztam, hogy az idő függvényében és egymáshoz viszonyítva hogyan változik azok hasznos baktérium tartalma, savassága, alvadék szilárdsága, CIELAB színkoordinátái, valamint humán érzékszervi jellemzői.

Ezt követően *in vitro* Infogest humán emésztési modellben megvizsgáltam, hogy a probiotikus baktériumok eljutnak-e kellően nagy csíraszámokban hasznosulási helyükre, a vastagbélbe, illetve savó kiegészítés esetén is megvalósul-e a hatékony csíraszám fennmaradása. Az élelmiszer-mátrix hatás értelmezése miatt, a joghurt jellegű készítmények mellett, a probiotikumokat tartalmazó kapszulákat is megvizsgáltam ebből a szempontból.

A probiotikus hatás egyik napjainkban elismert aspektusa az immunmodulációs hatás kifejtése, melynek előfeltétele azonban a probiotikus baktériumok megtapadása és kolonizációja a vastagbélben. Ezért a következő lépésben ebből a szempontból vizsgáltam meg az általam alkalmazott joghurt starter kultúrát és probiotikus kultúrákat. Meghatároztam a készítményekben található mikrobák *in vitro* hidrofobicitást, bélhámsejtekhez történő tapadási hajlandóságát (HT-29, Caco-2), mucin adhézióját, valamint immunválaszra kifejtett hatását (IL-8). Ezt követően *in vivo* állatkísérletben DNBS indukált kolitisz egér modellt alkalmaztam a vizsgált mikrobák és a velük előállított tejes készítmények vastagbélgyulladásra gyakorolt hatásának megfigyelésére. Ennek értelmében az alábbi vizsgálatokat végeztem el: súlygyarapodás, makroszkopikus elváltozások értékelése, mieloperoxidáz aktivitás (MPO), és bél permeabilitás vizsgálat (FITC).

A tárolhatósági vizsgálat során megállapítottam, hogy a probiotikus törzsek (LA-5 és BB-12) csíraszám a négy hetes hűtve tárolási periódus alatt egyik készítmény esetében sem csökkent 10^8 CFU/ml alá. A savós termékek probiotikus csíraszám szignifikánsan nagyobb volt, mint a tejes termékeké ($P < 0,05$). A probiotikus savós és a szinbiotikus savós készítmények is szignifikánsan különböztek egymástól ($P < 0,05$), a probiotikus joghurtok csíraszám magasabb volt. A 100%-ban tejet tartalmazó probiotikus és a 3%-ban inulin hozzáadásával létrehozott szinbiotikus készítmények csíraszám nem különbözött szignifikánsan egymástól ($P \geq 0,05$), tehát a tejes és a savós termékek esetében sem tapasztaltam, hogy az inulin pozitív hatást gyakorolt volna a csíraszámra a négy hetes hűtve tárolás során.

A készítmények pH-ja a tárolás időtartama alatt nem változott meg szignifikáns mértékben ($P \geq 0,05$). A tejes joghurtok esetében, a starter kultúrát tartalmazó hagyományos joghurt pH-értéke kis mértékben, de szignifikánsan nagyobb volt, mint a probiotikus és szinbiotikus joghurtoké ($P < 0,05$) ennek oka, feltehetőleg, a probiotikus törzsek jelenlétéhez köthető savanyító hatás. Az inulin prebiotikumnak nem volt hatása a pH-értékre. A hűtve tárolás során a savót tartalmazó és a tejes termékek esetében sem figyeltem meg szignifikáns változást a színkoordinátákban az idő függvényében. Azonban, a készítményeket összehasonlítva, az inulinnal kiegészített savós szinbiotikus termék világossága (az L^* színkoordináta) szignifikánsan különbözött a többiétől, a termék kis mértékben sötétebb volt.

A savós termékek fehérjetartalma szignifikánsan ($P < 0,05$) alacsonyabb volt, mint a tejes termékeké, valamint alacsonyabb ($P < 0,05$) zsírtartalommal is rendelkeztek. Az alvadékszilárdság változatlan maradt a hűtve tárolás során ($P \geq 0,05$). A tej alapú joghurtnál az inulin

hozáadása előnytelen volt a kialakult gél szilárdsága szempontjából, azonban a savós termékek esetében az inulin kedvező hatást gyakorolt az alvadék-szilárdságra ($P < 0,05$).

Az érzékszervi vizsgálat eredményei alapján megállapítottam, hogy a tárolás hatására nem változott meg a 100%-ban tejalapú készítmények színe, illata, íze és állománya, és a savót is tartalmazó készítményeknél – a szín kivételével – szintén nem volt eltérés a vizsgált érzékszervi tulajdonságokban. Az értékelők a probiotikus termékeket túl savanykásnak találták, ezért a probiotikumokat is tartalmazó savós termékek esetében a natúr joghurt helyett célszerűbb lenne a jövőben ízesített joghurtokat előállítani.

Az *in vitro* humán emésztési modell vizsgálat során – mátrixtól függetlenül (joghurt, vagy kapszula) – a probiotikumok a terápiás célnak megfelelő mértékben (4-5 log CFU/ml) voltak jelen a vékonybél szakasz végén. A két probiotikum (LA-5 és BB-12) a gyomor szakaszban, egyaránt rendkívül jó, közel 90%-os túlélési arányt mutatott, függetlenül attól, hogy kapszulákban vagy joghurt jellegű készítményekben történt a vizsgálatuk. Az inulin védő hatását nem tapasztaltam a gyomor traktus vizsgálata során.

A vékonybél szakaszban továbbra is érvényesült az a tendencia, hogy a két probiotikum ellenállóbbnak bizonyult az emésztőenzimokkal szemben, mint a starterkultúra törzsei. A LA-5 és BB-12 túlélési aránya közel azonos volt a savót is tartalmazó közegben, mint a csak tejet tartalmazóban. A BB-12 stabilabb volt a tejes közegben és a kapszulában a gyomor és a vastagbél szakasz során, mint az LA-5. Az inulin védő hatása a vékonybél szakasz során sem volt tapasztalható. Az emésztési fázisok kedvezőtlen körülményeivel szembeni ellenállás erősen függ az adott baktérium törzstől, vizsgálatomban ez

meghatározóbb volt, mint az élelmiszermatrix jelenéte vagy hiánya, robusztus probiotikumok esetében az adott baktérium valamennyi matrixban kedvezően viselkedik. A BB-12 mennyisége a vastagbél szakaszban növekedésnek indult.

A termékek patogén gátlását tekintve, a probiotikumok önmagukban és a savós joghurt jellegű készítmények egyaránt képesek voltak gátolni, 80% feletti mértékben, 24 órás inkubálás során a *C. perfringens* növekedését, ezzel szemben egyik készítmény sem volt hatékony az *E. coli* szaporodásának gátlásában.

A hidrofobicitás vizsgálat során megállapítottam, hogy a BB-12 hidrofób jellege és kedvező elektron akceptor tulajdonsága a bélben való jó megtapadási (jó adhézíós) képességét valószínűsíti, amely be is igazolódott a Caco-2 sejtvonallal és a mucinnal végzett adhézíós vizsgálatoknál. A HT-29 sejtvonalhoz azonban a LA-5 szignifikánsan nagyobb mértékben ($P < 0,05$) kötődött, mint a BB-12.

Az immunválasz vizsgálat esetében megfigyelhető volt, hogy a két probiotikum (LA-5 és BB-12) és a starter kultúra törzsek közül a *L. bulgaricus* szignifikáns mértékben csökkentette az IL-8 szekréciónak a TNF- α -val stimulált HT-29 sejtekben. Amikor a baktériumokat együttesen inkubáltam, a kedvező immunválasz elmaradt.

Végezetül az *in vivo* állatkísérletekben, a BB-12 és az LA-5 törzsek liofilizált kapszula formában, valamint hagyományos és probiotikus joghurtban képesek voltak enyhíteni a DNBS-sel kiváltott vastagbélgyulladás egyes kedvezőtlen hatásait egerekben. Ezek a probiotikumok önmagukban vagy élelmiszermatrixban elősegítették a súlygyarapodást, csökkentették a bélfal károsodást és a granulocita infiltrációt, valamint használatukkal elkerülhető volt a bél

áteresztőképességének jelentős megnövekedése a DNBS-sel kezelt egerekben.

Summary

Fermentation is one of the oldest methods for preservation, known to in the Old Testament, Abraham's long life was connected to his regularly yogurt consumption without understanding the scientific basis of their effects. Nowadays there are a number of strong evidences about the beneficial effect on human health of using probiotics daily in an adequate number. Probitics are known to have a long history of use, nowadays can be formulated in different types of form such as fermented milk products, drinks, cereals, meat products and also pharmaceuticals tablets. When the diverse collection of microbes, the human intestinal microbiota is disrupted it may become deleterious, to the host health is termed dysbiosis. One of the appropriate way for the bacterial reshape and colonization of the „forgotten organ” is the application of healt-positive bacteria, such as the well known bifidobacteria and lactobacilli. Numerous bacterial species have been suggested to have probiotic effects, but strains from the genera of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are added most commonly as probiotics to the variety of dairy and non-dairy products.

Yogurt and all dairy products can be the most natural media/food matrix for introduce probiotics to the human intestinal tract, thereby with added value, like a functional food. Functional foods seems to be the parting-line between food and medicine, they have gained much interest in nowadays due to their ability of health-promoting capacity. Should be a wise alternative to be consumed the health related component day by day as a part of a balanced diet. Milk and fermented dairy products are a rich source of beneficial compounds which have a good effect for the

digestive, gastrointestinal function, microflora and immunoregulation with a direct probiotic effect (interaction with the microflora) and with an indirect biogenic effect (production of the microbial metabolites) too. Fortunately, consumers demand for the consumption of these healthy, bio-defend functional foods are increasing nowadays due to the growing awareness about the impact of their diet on the health (primer prevention). Well-balanced diet is a major focus of public health strategy aimed at maintaining the human health throughout life, and prevent several common disease which is closely related with the „western disorders” such as inflammatory bowel disease (IBD), Crohn-disease (CD), cancers, obesity, both type 1- and type 2-diabetes, polycystic ovarian syndrome (PCOS), bacterial vaginosis (BV) and asthma.

Whey has a number of functions which are beneficial to the health, good energy source, high content of essential amino acids and soluble vitamins also. The increasing amount of whey produced during dairy processes cause an increasing environmental protection problem, however it can be solved with a favourable opportunity by conversion of whey into value-added products.

The topic of the doctoral dissertation was to establish a pro- and synbiotic drinking yoghurt-type dairy product in which part of the milk is replaced by whey. I investigated the extent to which the use of LA-5 and BB-12 probiotics, inulin prebiotics, and whey used in the formulations changed the properties of the formulations compared to conventional yogurt. In order to establish the future of yogurt production, I also tested the formulations during a four-week refrigerated

storage period, during I determined how their acidity, curd strength, CIELAB color coordinates, and human organoleptic characteristics change over time and relative to each other. Subsequently, in an *in vitro* Infogest human digestion model, I examined whether the probiotic bacteria reach their utilization site in a sufficiently large number of germs, in the colon, and whether the effective bacterial count is maintained in the case of whey supplementation. Due to the interpretation of the food matrix effect, in addition to yogurt-like preparations, I also examined capsules containing probiotics from this point of view. One of the recognized aspects of the probiotic effect is the action of the immunomodulatory impact which, presupposes the adhesion and colonization of probiotic bacteria in the colon. Therefore, in the next step, I examined the yogurt starter culture and probiotic culture I used from this perspective. I determined the *in vitro* hydrophobicity, the tendency of the microbes in the preparations to adhere to intestinal epithelial cells (HT-29, Caco-2), the adhesion of mucin, and its effect on the immune response (IL-8). Subsequently, in an *in vivo* animal experiment, I used a DNBS-induced mouse model of colitis to observe the effect of the studied microbes and the milk products prepared with them on colitis. Accordingly, I performed the following studies: weight gain, evaluation of macroscopic scores, myeloperoxidase activity (MPO), and intestinal permeability assay (FITC).

During the shelf life study, I found that the bacterial counts of the probiotic strains (LA-5 and BB-12) did not decrease below 10^8 CFU / ml for either formulation during the four-week refrigerated storage period. The probiotic bacterial count of whey products was significantly higher

than the dairy products ($P < 0.05$), and the probiotic whey and synbiotic whey preparations also differed significantly ($P < 0.05$), the germ count of probiotic yoghurts was higher. The bacterial counts of the probiotic preparations containing 100% milk and the synbiotic preparations containing 3% inulin did not differ significantly ($P \geq 0.05$), so I did not find that inulin had a positive effect in the case of milk and whey products either the number of germs during four weeks of refrigerated storage. The pH of the formulations did not change significantly during storage ($P \geq 0.05$). In the case of milk yoghurts, the pH of conventional yoghurt containing starter culture was slightly but significantly higher than the probiotic and synbiotic yoghurts ($P < 0.05$), presumably due to the acidifying effect associated with the presence of probiotic strains. The inulin prebiotic had no effect on pH. During refrigerated storage, I did not observe a significant change in color coordinates as a function of time for whey-containing and dairy products. However, when comparing the formulations, the brightness of the whey synbiotic product supplemented with inulin (L^* color coordinate) was significantly different from the others, the product darkened slightly. The protein content of whey products was significantly ($P < 0.05$) lower than the dairy products and they also had a lower ($P < 0.05$) fat content. Curd strength remained unchanged during refrigerated storage ($P \geq 0.05$). In the case of milk-based yoghurt, the addition of inulin was unfavorable in terms of the strength of the formed gel, however, in the case of whey products, inulin had a favorable effect on the strength of the curd ($P < 0.05$). Based on the results of the sensory evaluation, I found that the color, aroma, taste and texture of the 100% milk-based preparations did not change as a result of storage, and there was no difference in the organoleptic properties of the preparations containing whey with the exception of

color. The evaluators found the probiotic products to be too sour, so it would be more appropriate to produce flavored yogurts in the future instead of natural yoghurt for whey products that also contain probiotics.

During the *in vitro* human digestion model study, regardless of matrix (yogurt or capsule), probiotics were present in the appropriate amount for the therapeutic purpose (4-5 log CFU / ml) at the end of the small intestinal stage. The two probiotics (LA-5 and BB-12) in the gastric stage, both showed extremely good survival rates of nearly 90%, regardless of whether they were tested in capsules or yogurt-like formulations. The protective effect of inulin was not observed in the gastrointestinal tract. In the small intestine stage, there was still a tendency for the two probiotics to be more resistant to digestive enzymes than the strains of the starter culture. The survival rates of LA-5 and BB-12 were nearly the same in the whey-containing medium, and BB-12 was more stable in the milky medium and the capsule. The protective effect of inulin was not detected in the small intestine either. Resistance to the unfavorable conditions of the digestive phases strongly depends on the given bacterial strain, in my study it was more decisive than the presence or absence of food matrix, in case of robust probiotics the given bacterium behaves favorably in all matrices. The amount of BB-12 started to increase in the colon stage. In terms of pathogenic inhibition of the products, both probiotics alone and whey yoghurt formulations were able to inhibit *C. Perfringens* growth by more than 80% during 24 h incubation, whereas none of the formulations was effective in inhibiting *E. coli* growth.

In the hydrophobicity experiment, I found that the hydrophobic nature and favorable electron acceptor properties of BB-12 suggest a good ability to adhere (good adhesion) in the gut, which was also confirmed in the adhesion studies with the Caco-2 cell line and mucin. However, LA-5 bound to the HT-29 cell line to a significantly greater extent ($P < 0.05$) than BB-12. In the immune response study, it was observed that among the two probiotics (LA-5 and BB-12) and the starter culture strains, *L. bulgaricus* significantly reduced IL-8 secretion in TNF- α -stimulated HT-29 cells. When the bacteria were incubated together, the favorable immune response was missed.

Finally, in the *in vivo* experiments, strains BB-12 and LA-5 in lyophilized capsule form as well as probiotic yogurt form were able to alleviate some of the adverse effects of DNBS-induced colitis in mice. These probiotics alone or in food matrix inhibited the development of macroscopic lesions and their use avoided a significant increase in intestinal permeability in DNBS-treated mice.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Vargáné Dr. Visi Éva egyetemi docensnek, aki iránymutatásával, tanácsaival és dolgozatom javítását szolgáló kritikai észrevételeivel segítette munkámat.

Köszönettel tartozom a Kaposvári Egyetem Doktori Iskolájának, hogy megteremtették a kutatómunkám elvégzéséhez szükséges feltételeket, a Fino-Food Kft-nek a kísérleti termékek gyártásának megvalósításáért.

Köszönöm a budapesti NAIK-ÉKI Élelmiszer-tudományi Intézet munkatársainak, Dr. Antal Ottiliának, Dr. Naár Zoltánnak segítségüket valamint, hogy az emésztéses vizsgálathoz megteremtették a feltételeket.

Köszönöm a Campus France-nak, hogy biztosították a franciaországi államközi ösztöndíjat a kutatásomhoz. Továbbá hálás köszönet az INRAE kutatóintézetben Rebeca Martin-Rosiquenak, Edgar Torres-Maravillanak és Philippe Langellanak az *in vivo* állatkísérlet és további *in vitro* vizsgálatok elvégzésében nyújtott közreműködésükért.

10. Irodalomjegyzék

AACC Report (2001) The Definition of Dietary fiber. Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association Of Cereal Chemists. Submitted January 10.

Abd El-Salam MH, Hippen AR, El-Shafie K, Assem FM, Abbas H, Abd El-Aziz M, El-Aassar M. (2011) Preparation and properties of probiotic concentrated yoghurt (labneh) fortified with conjugated linoleic acid. *Int J Food Sci Technol.* 46:2103–2110.

Agerberth, B.-Gudmundsson, G.: (2006) Host antimicrobial defense peptides in human disease. *Microbiology and Immunology*, 01 Jan 2006, 306:67-90 DOI: 10.1007/3-540-29916-5_3 PMID: 16909918

Akalin, A. S. Fenderya, S., Akbulut, N. (2004) Viability and activity of bifidobacteria in yogurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 613-621.

Akobeng, A. K., Ramanan, A. V., Heller, R. F.: (2006) Effect of breast feeding on risk of coeliac disease *Arch Dis Child*2006;91:39–43. doi: 10.1136/adc.2005.082016

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M.: (2012) Survival and activity of bifidobacteria during refrigerated storage of yogurt containing *Mangifera pajang* fibres polysaccharides. *Journal of Food Science*, 77

Alves, L. Richards, N. S P S, Mattanna, P. , Andrade D. F, Rezer. Milani , A. P S, L Cruz, A. G Faria, J. A. F.: (2012) Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin, *International journal of Dairy Technology* Volume 66, Issue 1 Pages 1–153

Arató, A.: (2013) Mérföldkövek az immunmediált bélbetegségek patomechanizmusának megértésében az elmúlt 35 évben. *Orvosi Hetilap*, 154 (38). pp. 1512-1523. ISSN 0030-6002

Aryana, K. J., Plauche, S., Rao, R. M. McGrew, P. Shah, N. P. (2007) Fat-free plain yoghurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, 72. M79-M84.

Babulka P.: (1998) A magyar népi orvoslásban használt gyógynövények. Bp. Komplementer medicina, 8p.

Bailey JR, Probert CSJ, Cogan TA (2011) Identification and Characterisation of an Iron-Responsive Candidate Probiotic. *PLOS ONE* 6 (10):e26507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026507>

Ballard, O.-Morrow, A. L. (2013) Human milk composition:nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013 60 (1) 49-74

Barreteau, H., Delattre, C., Michaud, P.: (2005) Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology and Biotechnology*, 44
Beutheu, Y., Belmonte, L. ; Galas, L. Boukhettala, L. Bôle-Feysot, N. Déchelotte, C. Coëffier, P. Moïse: (2012) Methotrexate modulates tight junctions through *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*: April 2012 - Volume 54 - Issue 4 - p 463-470

Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franchesi C, Brigidi P: (2012) Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *34:247-267*.

Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majowska, A. (2002) Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*. 35. 125-131.

Bogovic Matijasic, B. Obermajer, T. Lipoglavsek, L. Sernel, T. Locatelli, I. Kos, M. Smid, A. Rogelj, I.: (2016) Effects of symbiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 on the fecal microbiota of adults with irritable bowel syndrome: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J. Dairy Sci.* 99:5008-5021

Borecká-Melkusová, S. Bujdáková, H. (2008) Variation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among genotypes of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* under antifungal treatment. *Canadian Journal of Microbiology* 54. 718-724.

Bornet FR., Brouns F. Tashiro Y., Duvillier Y., (2002) Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides : natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Dig Liver Dis.* 34. Suppl 2. 111-120.

Bosscher D., Breynaert, A., Pieters, L., & Hermans, N. (2009). Foodbased strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60 (Suppl. 6), 5–11.

Bozanic, R., Rogelj, I., Tratnik, L., (2002) Fermentation and storage of probiotic yoghurt from goat milk. *Mijekarstvo*, 52., 93-111

Bradley, P. P. Dennis M.D. A.PriebatM.D.Robert D.ChristensenM.D.GeraldRothsteinM.D. (1982) Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker *Journal of Investigative Dermatology* Volume 78, Issue 3, March Pages 206-209

Brownawell, A. M., Caers, W., Gibson, G. R., Kendall C. W. C., Lewis, K. D., Ringel, Y., & Slavin, J. L. (2012). Prebiotics and the health benefits of fiber: Current regulatory status, future research, and goals. *The Journal of Nutrition*, 124, 962–974.

Cais-Sokolinska D, Pikul J., (2006) Use of colour measurement to evaluate yoghurt quality during storage. *January, Italian Journal of Food Science* 18(1):63-71

Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M., Brigidi, P. (2008) Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties,

competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology* 125 286-292

Carasi, P., Ambrosio, N. M., Antoni, D. L. G., Bressollier, P., Urdaci, M. C. Serrsdell M. (2014) Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research* (2014) 81 16-23.

Cario, E.: (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005 Aug;54(8):1182-93 doi: 10.1136/gut.2004.062794.

Castro, W.F., Cruz, A.,G, Bisinotto, S., Guerreiro, L. M. R. (2013) Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. *J. Dairy Sci.*, 96, 16-25

Cencic, A., & Langerholc, T., (2010). Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 140, S4-S14.

Chassaing, B. Gewirtz, A. T., (2018) in *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Sixth Edition) szerk Hamid, M. S.,

Chatterjee, S, Kar, P., Das, T., Ray, S. Ganguly, S., Rajendiram, C., Mitra, M., (2013) Randomised Placebo-controlled Double Blind Multicentric Trial on Efficacy and Safety of *Lactobacillus acidophilus* LA-5® and *Bifidobacterium* BB-12® for Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhoea. *JAPI*;61:708-712

Chauviere, G., Coconnier MH, Kerneis, S., Fourniat, J., Servin, AL. (1992) Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol* 138:1689-1696.

Chr. Hansen Nu-trish Kézikönyv átdolgozott kiadás (2006) szeptember Copyright © 2006 Chr. Hansen A/S.

Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Tworney C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW: (2011) Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:4586-91.

Clair, E., Turka, L. A. Saxon, A. Matthews, J. B. Sayegh, M. H. Eisenbarth, G. S. Bluestone, J: (2007) New reagents on the horizon for immune tolerance *Annu Rev Med* 2007;58:329-46 doi: 10.1146/annurev.med.58.061705.145449.

Collado, M.C.; Grzeskowiak, L.; Salminen, S. (2007) Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr. Microbiol.* 2007, 55, 260–265.

Conway, P. L., S. L. Gorbach, and B. R. Goldin. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70:1–12.

Cordeiro, B.F., Lemos, L., Oliveira, E.R., Silva, S.H., Savassi, B., Figueiroa, A., Faria, A.M.C., Ferreira, E., Esmerino, E.A., Rocha, R.S., Freitas, M.Q., Silva, M.C., Cruz, A.G., Carmo, F.L.R., Azevedo, V., (2019) Prato cheese containing *Lactobacillus casei* 01 fails to prevent dextran sodium sulphate-induced colitis, 2019. International Dairy Journal

Costa M. F., Pimentel C. T., Guimaraes, J. T. Balthazar, C. F. (2019) Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt DOI: 10.1016/j.lwt.2019.02.007

Csapó J., Csapóné Kiss ZS. (2002): Tej és tejtermékek a táplálkozásban. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 464 p

Csiki Z.: (2008) Pre-probiotikumok és az egészséges élet In. Nagy János (szerk) A jövő élelmiszerei és az egészség. Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma. Debrecen, 197.

Csiki, Z.: (2012) Magyar gasztroenterológia lap. Debrecen. 1 különszám. 8-12 pp, 17-20

Cummings JH., Macfarlane GT. (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. Appl. Bacteriol 70 443-459.

Cummings JH., Pomare EW., Branch WJ., Naylor CPE., Macfarlane GT., (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal hepatic and venous blood. Gut 28 1221-1227

Cutrim C. S. Barros R. F. de R Franco M., Cortez M. A. S. (2017) Escherichia coli O157:H7 Survival in traditional and low lactose yogurt during fermentation and cooling periods Cienc. anim. bras., Goiânia, v.18, 1-9, e-39554

Da-Yong-Ren, Chang Li, Yan-Qing Qin, Rong-Lan Yin, Shou-Wen Du, Fei Ye, Hong-Feng Liu, Mao-Peng Wang, Yang Sun, Xiao Li, Ming-Yao Tian, Ning-Yi Jin: (2013) Lactobacilli reduce chemokine IL-8 production in response to TNF- α and Salmonella challenge of Caco-2 cells: 2013. Hindawi Publishing Corporation Bio Med Research International, Volume 2013, ID 925219, 9p

Del Campo, R., D. Bravo, R. Canton, P. Ruiz-Garbajosa, R. Garcia-Albiach, A. Montesi-Libois, F.-J. Yuste, V. Abaira, and F. Baquero. (2005) Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. Appl. Environ. Microbiol. 71:547–549.

Della Ragione F., Crinti V., Della Pietra V., Borriello A., Oliva A., Indaco S., Yamamoto T., Zappia V., (2001) Genes modulated by histone acylations as a new effectors of butyrate activity FEBS Lett 499. 199-204.

Dobi S.: (2010) BÉlfertőzések, Szerzői kiadás, 5-6

Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N. P. (2006) Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal* 17. 657-665.

Drgalic, I, Trawnik, L, Bozanic, R, (2005) Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *Lait*, 85, 171-179

Eckburg PB, Elisabeth MB, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005): Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 308(5728):1635-1638.

Falus, A. (1998) *Az Immunológia élettani és molekuláris alapjai*. Semmelweis Kiadó Budapest

FAO WHO (2002): Guidelines for evaluation of probiotics in food

Fehér, J. Kovács, I., Pacella, E. Radák, Zs.: (2014) A mikroflóra és a bélnyálkahártya kölcsönhatása az irritábilis bél, irritábilis szem és irritábilis elme szindróma kórtanában és kezelésében *Orvosi Hetilap* 155 37 1454-1460

Fernandez J., Redondo-Blanco S., Gutiérrez-Del-Río I., Miguelez E. M., Villar C.J., Lombo F (2016) Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review In. *Journal of Functional Food* (25) 511-512

Figler, M., Rab, R., & Bonyárné Müller, K. (2004). Probiotikumok a humán egészség szolgálatában. *Élelmiszer, Táplálkozás és Marketing*, 1(1-2), 25–29.

Franck, A. (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87 52 S287-S291

Gecse, K., Róka, R. Séra T. Rosztóczy A. Annaházi A. Izbéki F. Nagy F. Molnár T. Szepes Z. Pávics L. Bueno L. Wittmann T. (2012) Leaky gut in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and inactive ulcerative colitis *Digestion* 2012;85:40–46

Gere T.: (2010) A vastagbél, A pre-és probiotikumok In *Természetgyógyászat mindenkinek*. Szerk. Gere T. Bp. Magánkiadás. 298-301p 278-279 p.

German, B., Schiffrin E. J., Reniero, R., Mollet, B., Pfeifer, A., Neeser, J. R. (1999) The development of functional foods, lessons from the gut. *Elsevier*, 12 492-499.

Gibson, G R.-Williams, C R, (2000) *Functional Foods 1st edition Concept to product* Woodhead Publishing

Gibson, G. R., Roberfroid, M. B.: (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *Journal of Nutrition*, 125.

Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U., Eberhard, P. (2008) Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International dairy Journal*, 19. 107-115.

Guo Mingruo, Hao Wang, and Cuina Wang (2018) Interactions between whey protein and inulin in a model system *J Food Sci Technol.* Oct; 55(10): 4051–4058.

Güttler, J. (2012): Casein whey as booster for anaerobic co-digestion of primary sludge. MSc thesis. Massey University, Palmerston North, New Zealand, 142.

Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., & Brummer, R.-J. (2008). Review article: The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2),

Hamilton-Miller, J. M. Gibson, G. R. Bruck, W.: (2003) Some insights into the derivation and early uses of the word „probiotic”. *British Journal of Nutrition*

Hijova, E. Chmelarova A, (2007.) Short chain fatty acids and colonic health. *Topical Review, Bratisl Lek Listy* 108 (8) 254-358

Hogfors-Rönholm, E. Wiklund, T. (2010) Phase variation in *flavobacterium psychrophilum*: Characterization of two distinct colony phenotypes. *Diseases of Aquatic Organisms Journal* 90, 43-53.

Holm F. (2003) New functional food ingredients. Cancers and oxidative degradations. *Flair Flow 4 Synthesis report*. Institut national de la Recherche, Paris, France, 32. p.

Hood, S. K., Zoitola E. (1988) A Effect of Low pH on the Ability of *Lactobacillus acidophilus* to Survive and Adhere to Human Intestinal Cells, *Chemistry Journal of Food Science* 1988 DOI:10.1111/J.1365-2621.1988.TB09312.X

Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT (2001): Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture. 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 48, 198–205.

Hoverstadt, T., & Midtvedt, T. (1986). Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *The Journal of Nutrition*, 116(9), 1772–1776.

Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P (2007): Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat protoc.* 2(9):2111-9.

Hue, S. H.,-Kim, M. H.:(1997) *The moderns health and health supplement food* Seoul:Hongikjae

Hutkins, R.-Goh, YJ. (2014) *Streptococcus thermophilus* *Encyclopedia of Food Microbiology Reference Module in Food Science* 554-559 p.

Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV. (2015) Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *J Food Sci Technol.* 2015;52:4679–4696.

Isolauri, E. (2001): Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease *Pediatric Allergy Immunology* 12 56-59

Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L., (2011.) In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 153 (2012)216-222

Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D (2014) The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms* 2 (2):92-110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092>.

Kabeerdoss, J. Devi, R. S. Mary, R. R. Prabhavati, D. Vidya, R. Mechenro, J. Mahendri, NV. Pugazhendhi, S. Ramakrishna, B. S.: (2011) Effect of yogurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition J.* 10:138

Kátay, G., Ágoston, P., Varga, L. (2013) Savó alapú funkcionális tejtermékek fejlesztése. Development of whey-based functional dairy foods. *Tejgazdaság, LXXIII. évfolyam* 1-2. szám

Keita, A. V. Söderholm, J.: (2010) The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors *Neurogastroenterology & Motility* 22 7 718-733

Kim M, Oh S, Imm J-Y (2018) Buffering Capacity of Dairy Powders and Their Effect on Yoghurt Quality. *Korean J Food Sci Anim Resour* 38 (2):273-281. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.2.273>

Kip, P., Meyer, D., Jellema, R. H. (2005) Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16. 1098-1103.

Klaasens ES, Boesten RJ, Haarman M, Knol J., Schuren FH, Vaughan EE, de Vos WM: (2009) Mixed species Genomic Microarray Analysis of Fecal Samples Reveals Differential Transcriptional Responses of *Bifidobacteria* in Breast and Formula-Fed Infants. *Appl Environ Microbiol.*75(9):2668-76.

Kok, N., Roberfroid, M., Robert, A., Delzenne, N.: (1996) Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *British Journal of Nutrition*, 76.

König, J.,- Brummer, R. J.: (2014) Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome. *Benef Microbes* 2014 Sep;5(3):247-61.[doi: 10.3920/BM2013.0033](https://doi.org/10.3920/BM2013.0033).

Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosic, S., (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, J. *Appl. Microbiol.* 94 981-987.

Kwak, N. S.-Jukes, D. J.: (2001) Functional foods, the development of a regulatory concept. *Elsevier Food Control* 12, 99-107 p.

Lakatos. L.-Lakatos, P. L.:(2006) Antibiotikum kezeléshez társuló hasmenés és pseudomembranosus colitis *Diarrhoea and pseudomembranus colitis associated with antibiotic*). *Lege artis medicinae*, 16 (7). pp. 609-616.

Lammers, K.M., Helwig, U., Swennen, E., Rizzello, F., Venturi, A., Caramelli, E., Kamm, M. A. Brigidi, P., Gionchetti, P., Campieri, M., (2002) Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT-29 cells. *American Journal of Gastroenterology* 97. 182-186

Lapis, K.: (2009) Az antimikrobiális peptidek és a mintázatfelismerő receptorok szerepe a bélrendszer homeosztázisának fenntartásában. *Orvosi Hetilap* 2009 150 47 2146-2149

Lee H.M. and Lee Y. (2008) A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254 doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02371.x

Lendvai Edina, Krisch Judit, Kárnyáczky Zsuzsanna, Fenyvessy József, Tóth Zsuzsanna, Csanádi József: (2012) Új szinbiotikus joghurt fejlesztésének értékelése Evaluation of the development of sinbiotic yogurt, *Tejipar: A Tejipari Igazgatóság és a MITE Tejipari Szakosztályának Közleményei* 72: (1-2) pp. 37-45.

Leon, F.: (2011) Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease *J. Immunol Methods* 2011 Jan 5;363(2):177-86. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.002. Epub 2010 Sep 15.

Li S-C, Hsu W-F, Chang J-S, Shih C-K (2019) Combination of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Shows a Stronger Anti-Inflammatory Effect than Individual Strains in HT-29 Cells. *Nutrients* 11 (5):969. <https://doi.org/10.3390/nu11050969>

Lichtman, S. M.:(2001) Bacterial translocation in humans *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001 Jul;33(1):1-10.

Lynch DB, Jeffery IB, O'Toole (2015) PW: The role of the microbiota in ageing: current state and perspectives. *WIREs Syst Biol Med*; doi: 10.1002/wsbm.1293

Magalhaes JG, I Tattoli, SE Girardin (2007) The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens- *Seminars in immunology*, Elsevierjohnsonii NRRL B-2178 in whey. *International Dairy Journal* 34. 109-115.

Magarinos, H. Selaive, S. Costa, M. Flores, M. Pizarro (2007) Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream *International Journal of Dairy Technology* 60 2 128-134

Makinen, K. Berger, B. Bel-Rhliid, R. Ananta, E.: (2012) Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Elsevier Journal of Biotechnology*

- Marchesi JR (2011): Human distal gut microbiome. *Environ Microbiol.* 13(12):3088-102.
- Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C: (2010) Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol.*, 21:149-156.
- Martin R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM: (2009) Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 75(4):965-969.
- Martinez F. A. C. Balciunas E. M. Conventi A. Cotter P. D. Souza P. Oliveira (2013) Bacteriocin production by Bifidobacterium spp. *Biotechnology Advances* Volume 31, Issue 4, July–August, Pages 482-488
- Marzorati M, Vanhoecke B, Ryck TD, Sadabad MS, Pinheiro I. (2014): The HMI™ module: a new tool to study the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract in vitro. *BMC Microbiol.* 14:133.
- Mater, D. D. G., L. Bretigny, O. Firmesse, M.-J. Flores, A. Mogenet, J.-L. Bresson, and G. Corthier. (2005) *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yoghurt. *FEMS Microbiol. Lett.* 250:185–187
- Matteoli, G. Mazzini, E., Iliev, I. D. Mileti, E., Fallarino, F. Puccetti, P. Chieppa, M. Rescigno, M. (2010) CD10+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T-regulatory/T-effector cell balance and oral tolerance induction *Gut* 2010 May;59(5):595-604. doi: 10.1136/gut.2009.185108.
- Matto, J.; Fonden, R.; Tolvanen, T.; Vonwright, A.; Vilponensalmela, T.; Satokari, R.; Saarela, M. (2006) Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 1174–1180.
- Menzel, K.-Rogler, G.: (2009) Defective barrier-therapeutic implications. In: *Intestinal Disorders* (pp.57-70)
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Boulieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Goldong M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Brodkorb A (2014): A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 5(6):1113-24.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M. (2001): Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 1294-1309. p.
- Mitsuoka T (1990): Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.* 6:263–267.

Mohan, R., Koebnick, K., Schildt, J., Schmidt, S., Mueller, M., Possner, M., Radke, M., Blaut, M. (2006) Effects of Bifidobacterium lactis BB12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind placebo controlled randomized study. *J.Clin.Microbiol.* 2006;44(11):4025-4031

Mowat, A. M., Millington, O. R., Chirido, F.: (2004) Anatomical and cellular basis of immunity and tolerance in the intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004 Jun;39 Suppl 3:S723-4.

Mowat, A. M., Bain, C. C.: (2011) Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J. Innate Immun.* 3(6) 550-564

Munoz, B. I. Verruck, S. Machado Canella, MH. Dias, CO. Mello Castanho Amboni, RD. Prudencio, ES. (2018) The use of soft fresh cheese manufactured from freeze concentrated milk as a novelty protective matrix on Bifidobacterium BB-12 survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions *LWT* 97:725-729 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.009>

Murakami, et al. (2006) Safety and effect of yoghurt containing Bifidobacterium lactis Bb-12 on improvement of defecation and fecal microflora in healthy volunteers. *J Nutr Food* 2006:12-12

Nemeth, E., Fajdiga, S., Malago, J., Koninkx, J., Tooten, P., van Dijk, J., (2006) Inhibition of Salmonella-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology* 112, 266-274

Ng, EW. Yeung, M. Tong, PS. (2011) Effects of yogurt starter cultures on the survival of Lactobacillus acidophilus. *Int J Food Microbiol.* 31;145(1):169-75. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.

O'Toole P, Claesson MJ: (2010) Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal* 20 2010; 281-291.

Ogita, T. Nakashima, M. Morita, H. Saito. Y, Suzuki. T, Tanabe. S, (2011) Streptococcus thermophilus ST28 Ameliorates Colitis in Mice Partially by Suppression of Inflammatory Th17 Cells. *BioMed Research International* Volume 2011 |Article ID 378417

Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A. (2009) Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. *LWT-Food Science and Technology* 44. 520-523.

Oliveira, R. P., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M. N. (2009) Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with Streptococcus thermophilus. *Journal of Food Engineering* 91 133-139

- Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C (2012) The function of our microbiota: who is out there and what they do? *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012; 2:1-11.
- Ozcan, T. Yilmaz-Ersan, L. Akpinar-Bayazit, A. Sahin, O. I. Aydinol P.: (2010) Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 in Rice Pudding *Mljekarstvo* 60 (2), 135-144
- Ozer, B. Salih Uzun, Y. Avni Kirmaci, H.: (2008) Effect of Microencapsulation on Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 During Kasar Cheese Ripening 61 3 237-244
- Ozer, B.: (2008) Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation
- Ozer, D., Akin, S., Ozar, B. (2005) Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 in acidophilus yoghurt. *Food Science and Technology International*. 11, 19-24.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO: (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007, 5:e177.
- Panesar, P. S.-Kumari S. (2011) Lactulose: Production purification and potential application. *Biotechnology Advanced* 29 (6) 940-948
- Parkes, G. C., Rayment, N. B. B. N. Hudspith L. Petrovska M. C. Lomer J. Brostoff K. Whelan J. D. Sanderson (2012) Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome *Neurogastroenterology & Motility* 24 1 31-39
- Paseephol, T., Sherkat, F. (2009) Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. *Journal of functional foods* I. 311-318.
- Payne AN, Chassard C, Banz Y, Lacroix C (2012): The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads in an *in vitro* model of colonic fermentation. *FEMS Microbiol Ecol*. 80(3):608-23.
- Payne AN, Zihler A, Chassard C, Lacroix C (2012): Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*, 30(1):17-25.
- Pedrosa, M. C., B. B. Golner, B. R. Goldin, S. Barakat, G. E. Dallal, and R. M. Russell. (1995) Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 61:353–359.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE: (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy *Pediatrics* 118(2):511-21.

Pinto Stephanie S. , Bianca DM Cavalcante, Silvani Verruck, Lara F. Alves, Elane S. Prudêncio, and Renata DMC Amboni (2017) Effect of the incorporation of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with sweet whey and inulin on the properties of Greek-style yogurt J Food Sci Technol. 2017 Aug; 54(9): 2804–2813.

Pitt, W. M., Harden, T. J., Hull, R. R. (2000): Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 63 (7) 916-920. p.

Quigley, GJ Hudson, HN Englyst (1999) Determination of resistant short-chain carbohydrates (non-digestible oligosaccharides) using gas-liquid chromatography-Food chemistry, 1999 – Elsevier

Ranadeera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., Baines, S. K. (2012) In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. Food Research International 49. 619-625

Rasmussen, S. B., Reinert, L. S., Paludan S. R.: (2009) Innate recognition of intracellular pathogens. APMIS 2009 May;117(5-6):323-37

Rastall, B., Gibson, G.: (2006) Prebiotics: development and application.

Rigó, J. (1996): Növényi rostok. In Barna, M. (eds.): Táplálkozás - Diéta. Budapest, Medicina. 54-56.

Roberfroid, M. B. (2000) A European consensus of scientific concepts of functional foods Nutrition 16 (7-8) 689-91

Roberfroid, M. B. (2005) Introducing Inulin type fructans. The British Journal of Nutrition 2005 1S 13-25

Roberfroid, R. M. (1999) Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. J. Nutr. 1999 129 7 1398S-401S

Rodler (a) I.: (2005) Élelmezés- és táplálkozás egészségtan, Medicina Könyvkiadó, Budapest

Rodler I.: (2005) A bélflóra, Prebiotikumok, A gyomor-bél traktus immunrendszere és működése In Élelmezés és táplálkozás egészségtan. Szerk. RODLER I. Bp. Medicina Könyvkiadó 35-40p. 118-119 p.

Román, A. (2010): Tejsavó nano- és diaszürésének vizsgálata. PhD értekezés. Budapest Corvinus Egyetem, Élelmiszer-tudományi Kar, Budapest pp. 147.

Rondanelli M, Giacosa A, Faliva MA, Perna S, Allieri F, Castellazi AM: (2015) Review on microbiota and effectiveness of probiotics use in older, World J Clin Cases, 3(2):156-162.

Rosero, O., Kovács, T., Onodi, P., Harsányi, L., Szijártó, A., : (2014) Bakteriális transzlokáció: rés a pajzson. Bacterial translocation: gap in the shield. *Orv. Hetil.*, 2014, 155(8), 304–312.

Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Sánchez B (2011) How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes Nutr* 6 (3):307-318. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0207-5>

Russo, R. C. Cristiana C Garcia, Mauro M Teixeira & Flavio A Amaral (2014) The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases, *Expert Review of Clinical Immunology*, 10:5, 593-619

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M.: (2013) An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 50(1)1-16

Saarela, M., G Mogensen, R Fonden, J Mättö (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties *Journal of Biotechnology Elsevier* 84 3 197-215

Salazar N, Arboleya S, Valdés L, Stanton C, Ross P, Ruiz L,, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG: (2014) The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet.* 5:406.

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F (2005): The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 21(1):1-26.

Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M-E, Thiboutot, H, Laurin, É, Roy, D. (2011) Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int. J.Food Microbiol.* 1 149 50-7

Shadnoush, M. Shaker Hosseini R, Mehrabi Y, Delpisheh A, Alipoor E, Faghfoori Z, Mohammadpour N, Zaringhalam Moghadam J.. (2013) Probiotic yogurt Affects Pro- and Anti-inflammatory Factors in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Iran J Pharm Res.*

Shakirova,L. Grube,M. Gavare, M. Auzina, L.Zikmanis, P. (2013) *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013 Jan;40(1):85-93.doi: 10.1007/s10295-012-1204-z. Epub 2012 Oct 9.

Sharma, S., Kanwar, S. S., (2017) Adherence potential of indigenous lactic acid bacterial isolates obtained from fermented foods of Western Himalayas to intestinal epithelial Caco-2 and HT-29 cell lines. *J Food Sci Technol* (Oct 2017) 54(11):3504-3511

Sheikhi, A. Shakerian, M. Giti, H. Baghaeifar, M. Jafarzadeh, A. Ghaed, V. Heibor, M. R. Baharifar, N. Dadafarin, Z. Bashirpour, G.:(2016) Probiotic yogurt culture

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 modulate the cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from patients with ulcerative colitis

Sheu, B-S., Cheng, H-C. Kao, A-W. Wang, S-T Yang, Y-J. Yang, H-B.. Wu, J.-J (2006) Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *Am.J.Clin.Nutr.* 2006;83:864-869

Shi, J.: (2007) Defensins and Paneth cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Oct;13(10):1284-92. doi: 10.1002/ibd.20197.

Shoveller, A.K., Stoll, B., Ball, R.O., Burrin D.G. (2005): Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 135 (7) 1609-1612. p.

Skryplonek, K.-Jasinska, M. (2015.):Fermented probiotic beverages based o nacid whey. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14(4) 2015, 397-405

Sollid, L. M., Molberg, McAdam, S., Lundin K. E. A. (1997) Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase Gut, December

Solowiej, B. G. Nastaj, M. (2015) Relevance and Production of Dairy Analogues and Restructured Dairy Products December 2015 DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03098-5 In book: Reference Module in Food Sciences. (pp.1–6.) 2015 Elsevier Inc. All rights reserved. Academic Press.

Szakály, S. (2003) *Tejgazdaságtan Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet. Pécs.* 1991.

Szakály, S. (2009): A pro-és prebiotikumok kérdése és jelentősége. In: A tej szerepe a humán táplálkozásban. Szerk:Kukovics, S. Melánia Kiadó, Budapest207-215

Szakály, Z. (2008) Trendek és tendenciák a funkcionális élelmiszerek piacán:Mit vár el a hazai fogyasztó? *The hungarian journal of food, nutrition and marketing.*2008 V. 2-3.

Szakály. S.: (2004) Probiotikumok és humánegészség. A probiotikumokkal kapcsolatos alapismeretek

Székely, O., (2004) Sajtok vásárlási és fogyasztói szokásainak vizsgálata dél-dunántúli régióban. *Élelmiszer Táplálkozás Marketing* 1-2, 125-128

Taipale, T., Pienihäkkinen, K. Isolauri, E., Larsen, C., Brockmann, E., Alanen, P.,Jokela, J., Söderling, E. (2011) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br.J.Nutr.* 2011;105:409-16

Tambuwala MM, Cummins EP, Lenihan CR, Kiss J, Stauch M,Scholz CC, Fraisl P, Lasitschka F, Mollenhauer M, Saunders SP,Maxwell PH, Carmeliet P, Fallon PG, Schneider M, Taylor CT (2010) Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitisthrough reduced epithelial cell apoptosis and increased barrierfunction. *Gastroenterology* 139:2093–2101

Tamime AY, Saarela M, Wszolek M, Ghoddousi H, Linares DM, Shah NP (2017) Production and Maintaining Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. In: Probiotic Dairy Products. pp 67-164. <https://doi.org/10.1002/9781119214137.ch4>
Teixeira, P. 2014 Encyclopedia of Food Microbiology (2nd edition) Reference module in Food Science 424-431

Tejada-Simon, M.V.: (2000) Ingestion of yogurt with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate Immunoglobulin A responses to Cholera toxin in mice. Journal of Dairy Science Volume 82, Issue 4, 649-660

Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N: (2010) Human intestinal microbiota and healthy ageing. Ageing Res Rev 2010; 9(2):107-16.

Turnbaugh, P. J., Gordon, J.: (2009) The core gut microbiome, energy balance and obesity J. Physiol 2009 Sep 1;587(Pt 17):4153-8. doi: 10.1113/jphysiol.2009.174136.

Uriot, O. Denis, S. Junjua, M. Roussel Y, Mourot, AD. Blanquet-Diot, S. (2017) Streptococcus thermophilus: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate. Journal of Functional Foods Volume 37, October 2017, Pages 74-89

Varga, L., Szigeti, J., Csengeri, E. (2003). Effect of oligofructose on the microflora of an ABT-type fermented milk during refrigerated storage. Milchwissenschaft, 58, 55-58.

Varga-Visi; É., Pápai, G., (2015) How to maintain the effective levels of probiotics throughout the shelf life in yoghurt: A review Acta Agraria Kaposváriensis 19 : 1 pp. 65-74. , 10 p.

Vass, N., Czeglédi, L., Jávora, A.,: (2008) Állati eredetű funkcionális élelmiszerek a táplálkozásban. In. Nagy János (szerk) A jövő élelmiszerei és az egészség. Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma. Debrecen. pp. 49-66

Veldhoen, M.-Brucklacher-Waldert, V.: (2012) Dietary influences on intestinal immunity. Nat Rev Immunol 2012 Oct;12(10):696-708. doi: 10.1038/nri3299.

Vemuri R, Shinde T, Shastri MD, Perera AP, Tristram S, Martoni CJ, Gundamaraju R, Ahuja Kdk, Ball M, Eri R. (2018) A human origin strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 exhibits superior *in vitro* probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. *Int J Med Sci* 2018; 15(9):840-848

Venema K,-van den Abbeele P (2013): Experimental models of the gut microbiome. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 27(1):115-26.

Vinderola CG, Reinheimer JA (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res Int 36 (9):895-904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)

Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L. Salminen, S., (2017) Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. Trend in Food Science & Technology 68 (2017) 83-90

Voreades N, Kozil A, Weir TL: (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol* 2014; 5:494.

Vrese, M., Kristen, H., Rautenberg, P., Laue, C., Schrezenmeir, J. (2011) Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. *J.Dairy Res.* 2011;78(4):396-403

Wacha, J. A, Szijarto (2011) Probiotics and pregnancy *Orvosi hetilap* Volume 152: Issue 11

Walter, T.: (1999) Bread goes prebiotic. *International Food Ingredients*, 2. 20-21

Weizman,-Alsheikh. (2006) Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *J.Am.Coll.Nutr.* 2006;25:415-419

Westenbrink, S, Brunt, K. Kamp, J. W: (2013) Dietary fiber, challenges in production and use of food composition data. *Food Chemistry* 1-3 p. 562-7

Wildt, S. Nordgaard , I. Hansen , U. Brockmann , E. Rumessen, E. J. (2011) A randomised double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis *Journal of Crohn's and Colitis* Volume 5, Issue 2, April 2011, Pages 115–121

Williams CF, Walton GE, Jiang L, Plummer S, Garaiova I, Gibson GR (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annu Rev Food Sci Technol.* 6: 329-50.

Woodmansey EJ: (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 2007; 102(5):1178-86.

Wu, J. C.: (2012) Physiological co-morbidity in functional gastrointestinal disorders: epidemiology, mechanisms and management *J Neurogastroenterol Motil.* 2012 Jan; 18(1): 13–18.

Xu H., Jeong, H.S. Lee, H, Y, Ahn, J. (2009) Assesment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Aoolied Microbiology* 2009

Yan, F. Polk, D. B. (2011.) Probiotics and immune health. *NIH Public Access Author Manuscript. Curr. Opin. Gastroenterol.* Oct 27(6):496-501

Zhai, Z., et al. (2019). Low-fat yogurt alleviates the pro-inflammatory cytokine IL-1 β -induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Journal of Dairy Science* 102(2): 976-984.

Zhang, Nan Li, Shee-Mei Lok, Lian-Hui Zhang , Kunchithapadam Swaminathan: (2003) Isomaltulose Synthase of *Klebsiella* sp. LX3crystal structure and implication of mechanism Received for publication, March 14, 2003, and in revised form, June 20,

2003Published, JBC Papers in Press, June 20, 2003, DOI
10.1074/jbc.M302616200Daohai

Zwiehner J, Liszt K, Handshur M, Lassl C, Lapin A, Haslberger AG: (2009)
Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shift in fecal
population sizes and diversity of *Bacteroides*, bifidobacteria and Clostridium cluster IV
in institutionalized elderly. Exp Gerontol 2009; 44(6-7):440-6.

11. A disszertáció témaköréből megjelent publikációk

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Pápai; G.-Torres-Maravilla, E., Chain, F., Varga-Visi, É., Antal, O., Naár, Z., Bermúdez-Humarán, L., G., Langella, P., Martín, R. (2020) The administration matrix modifies the beneficial properties of a probiotic mix of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Probiotics and Antimicrobial Proteins 2020 August DOI:10.1007/s12602-020-09702-2 IF2020=3,53

Pápai, G., Szabó-Fodor, J.; Bóta, B.; Andrássyné, Baka G.; Antal, O. T.; Naár, Z.; Vargáné, Visi É., (2017) Savó hozzáadásának hatása pro- és szinbiotikus fermentált tejtermékek minőségére a tárolás során Élelmiszer - Tudomány Technológia 71 : 2 pp. 27-33. , 7 p.

Szabó-Fodor; J. Bónai; A., Bóta; B., Szommerné, Egyed; L., Lakatos; F., Pápai; G., Zsolnai; A., Glávits; R., Horvatovich; K., Kovács, M. (2017) Physiological Effects of Whey- and Milk-Based Probiotic Yogurt in Rats Polish Journal Of Microbiology 66 : 4 pp. 483-490. , 8 p. 2017

Varga-Visi; É. - Pápai, G. (2015) How to maintain the effective levels of probiotics throughout the shelf life in yoghurt: A review Acta Agraria Kaposváriensis 19 : 1 pp. 65-74. , 10 p.

Konferencia kiadványban megjelent összefoglalók

Pápai, G.; Szabó-Fodor, J. ; Bóta, B.; Naár, Z.; Vargáné, Visi É., (2017) A savó mint melléktermék felhasználása, magas hozzáadott értékű, pre- és probiotikus funkcionális fermentált tejtermék előállítására céljából pp. 16-16. In: Gelencsér, É; Horváth, Zné; Rurik, I; Tömösközi, S (szerk.) Táplálkozástudományi Kutatások VII. PhD konferencia : program és előadás összefoglalók Budapest, Magyarország: Magyar Táplálkozástudományi Társaság, 2017 p. 23

Pápai, G., Antal, O., Szabó, G., Szabó-Fodor, Judit., Vargáné Visi, É., Naár, Z. (2017) Szokványos, Probiotikus és Szinbiotikus joghurtok kölcsönhatása in vitro emésztési rendszerben alkalmazott vastagbél mikrobiota modellel Magyar Táplálkozástudományi Társaság XLII. Vándorgyűlés Siófok 2017. október12-14.

Pápai; G., Bónai; A., Bóta; B., Szabó-Fodor; J., Kovács; M., Varga-Visi, É. (2015) Whey is a promising media for producing a high microbial content pro- and synbiotic yogurt Journal Of Probiotics And Health 3 : 3 pp. 80-80. , 1 p.

Bónai, A.; Toldi, M.; Bóta, B.; Ölbeiné, Horvatovic, K.; Bagóné, Vántus, V.; Tuboly, T.; Kachlek, M.; Hafner, D.; Pápai, G.; Zsolnai, A. (2014) Néhány probiotikus baktérium törzs mikrobiológiai vizsgálata – *in vitro* szimulált humán emésztést megelőzően és követően – tejipari termékfejlesztés céljából In: Anon (szerk.) XXXV. Óvári Tudományos Nap : A magyar és nemzetközi agrár- és élelmiszer-gazdaság lehetőségei Mosonmagyaróvár, Magyarország : Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 2014 pp. 49-49. , 1 p.

12. A disszertáció témakörén kívüli publikációk

Jribi, S., Antal, O., T., Füstös, Z., Pápai, G., Naár, Z., Kheriji, Oussema, D. H. (2018) Influence of sprouting bioprocess on durum wheat (*Triticum durum*) prebiotic properties Bari, Olaszország 2018.09.18. - 2018.09.20.

Nagy, É., Daróczi; L., Pápai; G., Prokisch; J., Jekő; J., Harangi, J. (2014) Medicinal drug components in honey In: L, Mondello (szerk.) 38th International Symposium on Capillary Chromatography Messina, Olaszország (2014) p. 539

13. Rövid szakmai önéletrajz

Pápai Gréta a Debreceni Egyetemen végzett alapszakon gazdasági agrármérnökként, majd élelmiszerbiztonsági- és minőségbiztosítási mérnökként szerzett mester diplomát 2013-ban. Karrierje 2012-ben a SIÓ-ECKES-nél kezdődött, ahol minőségellenőr mérnök gyakornokként a termékek gyártásközi megfelelőségének ellenőrzéséért volt felelős. 2014-ben kezdte meg állami ösztöndíjas PhD képzését a Kaposvári Egyetemen, ahol új funkcionális, egészségvédő joghurtok gyártásának megalapozását és technológiai valamint fogyasztói megfelelőségét vizsgálta. Ezt követően 2016-tól a NAIK-ÉKI Élelmiszer-tudományi Intézet tudományos segédmunkatársa volt, ahol funkcionális és egészségvédő élelmiszerek *in vitro* humán emésztés modellben történő vizsgálatait végezte. 2017-től Franciaországban az INRAE Institute-nél helyezkedett el, ahol francia államközi ösztöndíjas doktoranduszként a joghurtok gyártásánál alkalmazott baktériumkultúrákat humán sejtmódellben és rágcsáló állatmodellben vizsgálta. Jelenleg a MOL csoport tagjaként működő OT-Industries Kivitelező Zrt.-nél dolgozik, mint minőségügyi mérnök. Feladata az akkreditált Anyagvizsgáló Laboratórium minőségügyi rendszerének működtetésének és a Zrt szintű tanúsított minőség-, környezet- és munkahelyi egészségvédelmi és biztonságirányítási rendszerek koordinálása.

A disszertáció elkészítése során az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 projekt anyagi támogatásban részesültem.