

SZAKDOLGOZAT

Sályi Gábor Szakdolgozat

Sályi Gábor

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék



szózat

***Lactiplantibacillus plantarum* 299v kapszulázása és
életképességének vizsgálata almalében**

Sályi Gábor Szak

Sályi Gábor

Budapest

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológia

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: Sályi Gábor

A szakedolgozat címe: *Lactiplantibacillus plantarum* 299v kapszulázása és életképességének vizsgálata almaleben

Konzulens: Dr. Bujna Erika, egyetemi docens
Sun Weizhe, PhD hallgató

Beadás dátuma: 2023. május 3.


szakedolgozat készítés helyének vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang


konzulensek
Dr. Bujna Erika, Sun Weizhe


modul szerinti tanszék vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang

Tartalom

1. Bevezetés	1
2. Munka Célja	3
3. Irodalmi Áttekintés	4
3.1. Funkcionális élelmiszerek	4
3.1.1. Probiotikumok	5
3.1.1.1. Lactiplantibacillus plantarum 299v	5
3.1.1.2. Probiotikus élelmiszerek	7
3.1.2. Prebiotikumok	8
3.2. Kapszulázás	9
3.2.1. Mikrokapszulázás	10
3.2.2. Mikrokapszulázási technikák	11
3.2.2.1. Porlasztva szárítás	11
3.2.2.2. Liofilizálás	12
3.2.3. Kapszulázó anyagok	13
3.2.3.1. Tejsavófehérje	13
3.2.3.2. Maltodextrin	14
3.2.3.3. Inulin	15
3.2.3.4. Alginát	16
3.2.3.5. Rezisztens keményítő	16
4. Anyagok és Módszerek	18
4.1. Anyagok	18
4.1.1. Alkalmazott mikroorganizmus	18
4.1.2. Felhasznált oldatok, pufferek, tápközeg	18
4.1.3. Bevonó anyagok	19
4.1.4. Felhasznált eszközök	19
4.2. Módszerek	20
4.2.1. Törzsfenntartás	20
4.2.2. Sejttömeg előállítás kapszulázásra	20
4.2.3. Kapszulázás	20
4.2.4. Liofilizálás	22
4.2.5. Sejtszám meghatározása	22
4.2.6. Pásztázó elektronmikroszkópia	22
4.2.7. Mikrokapszulázott probiotikumokkal dúsított almálé tárolása 4 °C-on	22

4.2.8.	Kapszulák jellemzőinek meghatározása	23
4.2.8.1.	Hozam meghatározása	23
4.2.8.2.	Sűrűség meghatározása	23
5.	Kísérleti eredmények és értékelésük	24
5.1.	A kapszulák készítése és jellemzése	24
5.1.1.	Hozam és sűrűség meghatározása	24
5.1.2.	A kapszulák morfológiája	26
5.2.	<i>Lp. plantarum</i> 299v életképességének vizsgálata almalében 4°C-on történő tárolás során	29
5.3.	Mikrokapszulázott <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 299v fermentációja almalében	32
6.	Összefoglalás	36
7.	Irodalmi hivatkozás	38

Sályi Gábor Szakdolgozat

1. BEVEZETÉS

A probiotikumokat tartalmazó kereskedelmi termékek döntő többsége a tejtermékekhez, például a joghurthoz, a fagylalthoz és a sajthoz sorolhatók. A nem-tej alapú probiotikus termékek új alternatívát jelentenek azon fogyasztók számára, akik nem szeretik vagy nem fogyaszthatják a tejtermékeket, beleértve a laktózérzékenyeket, a tejfehérjékre érzékeny, hiperkoleszterinémiával küszködő vagy szigorúan vegetáriánus embereket. Napjainkban a fogyasztók egyre inkább érdeklődnek az úgynevezett "funkcionális élelmiszerek" iránt. A funkcionális élelmiszerek, a hagyományos összetevőkön kívül, - mint vitaminok, ásványi anyagok és mikrotápanyagok -, többek közt probiotikumokat, prebiotikumokat, telítetlen zsírsavakat, valamint fitonutrienseket tartalmazhatnak.

A probiotikumok védelmet nyújthatnak a gyomor-bélrendszeri rendellenességek ellen az egészséges bélmikrobióta fenntartása érdekében, beleértve a belfertőzéseket és gyulladós szindrómákat, enyhítik a székrekedést, megelőzik a húgyúti fertőzéseket, valamint immunstimuláló hatást fejtenek ki. A FAO/WHO meghatározása szerint a probiotikumok "olyan élő mikroorganizmusok, amelyeket megfelelő mennyiségben fogyasztva egészségügyi előnyöket biztosítanak a gazdaszervezet számára".

A gyümölcslevek különösen értékesek a probiotikumok hordozójaként az egészségre gyakorolt hatásuk miatt. A gyümölcslevek savas pH-ja következtében azonban a probiotikumok életképességének megőrzése problémát jelent. A gyümölcslevekben lévő savak ugyanis károsítják a citoplazmát, gátolják az enzimes reakciókat, valamint növelik a baktérium intracelluláris pH-jának fenntartásához szükséges energiafelhasználást. A probiotikumok ilyen körülmények között gyorsan elpusztulnak. Ennek következtében csökken a termék funkcionalitása, mivel az életképes baktériumok száma a probiotikus hatást kiváltó elegendő sejtszám alá csökken ($<7 \log_{10}$ TKE/ml). A gyümölcslében lévő probiotikum életképességét befolyásolja a törzs, a kultúra készítésének módja, a beoltott sejtek állapota, a tárolási hőmérséklet, az oxigénszint és a rostok jelenléte.

A probiotikus baktériumok savas környezetben való túlélésének növelésére, több módszerrel is próbálkoztak. Vitaminok vagy nagy antioxidáns tartalmú növényi kivonatok hozzáadása némi védelmet mutatott a *Lactocaseibacillus rhamnosus* HN001, a *Bifidobacterium lactis* HN001 és a *Lactocaseibacillus paracasei* LPC 37 számára gyümölcslében. Zabrost hozzáadása a gyümölcsléhez szintén javította a *Bifidobacterium breve* 99 életképességét

tárolás során. Továbbá a fehérje és az élelmi rostok javították a *Bifidobacterium longum* túlélését savas modelloldatokban és gyümölcslevekben a tárolás során.

Mindezek alapján célul tűztem ki a *Lactiplantibacillus plantarum* 299v mikrokapszulázását és a kapszulázott probiotikum életképességének vizsgálatát almalében.

Sályi Gábor Szakdolgozat

2. MUNKA CÉLJA

A mikrobióta baktérium összetételének változását elsősorban a táplálkozási szokások, az antibiotikum-adagolás, a fertőző ágensek, a gyulladásos betegségek és a rákellenes kezelés mellékhatásai okozhatják. A mikrobiális egyensúly fenntartása kifejezetten fontos, mivel ezek a változások nagy mértékben befolyásolhatják a kezelések hatékonyságát, valamint eredményét. Manapság számos probiotikumot ismerünk, amelyek élő mikroorganizmusok mono- vagy kevert kultúrái, és amelyek állati vagy emberi szervezetben alkalmazva jótékonyan hatnak a gazdaszervezetre az őshonos mikrobióta tulajdonságainak javítása révén. A rendelkezésre álló törzsek közül a *Lactiplantibacillus plantarum* 299v fogyasztásának pozitív hatása van a bél mikrobiótára, emiatt fontos szerepe van a funkcionális élelmiszerek körében probiotikumként.

Mikrokapszulázási technikákkal szélsőséges körülmények között is növelni tudják a probiotikumok túlélését. A mikrokapszulázott probiotikus por készítmény kényelmesebb adagolást tesz lehetővé a felhasználás során. A fagyasztva szárított probiotikus készítmények előállításánál különböző hordozóanyagokat – szénhidrátokat, fehérjéket – alkalmaznak, melyek megvédik a probiotikumot a gyomor-bél traktus közege által okozott stressztől.

A kereskedelemben kapható gyümölcslevek főként két probiotikus tejsavbaktérium törzset tartalmaznak, ezek a *Lp. plantarum* 299v és a *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. A gyümölcslevek tartalmazhatnak olyan összetevőket, amelyek elősegítik a probiotikumok életképességét a tárolás során, azonban összetételükből kifolyólag nem mindig alkalmasak probiotikus alkalmazásra. Ebből kifolyólag kutatómunkám során a *Lactiplantibacillus plantarum* 299v mikrokapszulázását és életképességének vizsgálatát terveztem, melyhez az alábbi részfeladatok megvalósítását tűztem ki célul:

- Különböző összetételű mikrokapszulák létrehozása
 - Maltodextrint fizikailag módosított rezisztens keményítővel kombinálva
 - Tejsavófehérjét denaturált tejsavófehérjével kombinálva
 - Maltodextrint tejsavófehérjével kombinálva 1:1 arányban
- A mikrokapszulák jellemzése
- A mikrokapszulázott probiotikum életképességének vizsgálata savas pH-jú almalében tárolás során

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Funkcionális élelmiszerek

A funkcionális élelmiszerek tudománya az étrendnek és az egészségnek a találkozása. Az élelmiszerek és a betegségek közötti összefüggés széles körben elismert, mint a megelőző táplálkozás alapja.

A funkcionális élelmiszerek kifejlesztésére irányuló meggyőződés először Japánban alakult ki az 1980-as években, amikor szembesültek az egészségügyi ellátás növekvő költségeivel. Az Egészségügyi és Jóléti Minisztérium szabályozási rendszert indítványozott bizonyos, dokumentált egészségügyi előnyökkel rendelkező élelmiszerek jóváhagyására. Ennek a fő célja, az ország öregedő lakosságának egészségügyi helyzetének javítása volt. 1984-ben az Oktatási, Tudományos és Kulturális Minisztérium Japánban nemzeti projektet indított az élelmiszerek és az orvostudományok közötti kapcsolat feltáráására. A Nature magazin 1993-as a „Japán feltárja az élelmiszer és az orvostudomány határát” című cikkében láthattuk először a "funkcionális élelmiszer" kifejezést ([Swinbanks és O'Brien, 1993](#)).

Ma Japán az egyetlen olyan ország, amely a funkcionális élelmiszereket külön kategóriaként ismeri el. A funkcionális élelmiszerpiacuk mára a világ egyik legfejlettebbjévé vált. A meghatározott egészségügyi célú élelmiszerek (FOSHU néven ismert élelmiszerek) olyan funkcionális összetevőkből állnak, amelyek hatással vannak a szervezet működésére, és amelyeket meghatározott egészségügyi állapotok fenntartására vagy szabályozására használnak ([Swinbanks és O'Brien, 1993](#)). A legfrissebb adatok szerint 2020 végéig Japánban már 1071 élelmiszer kapta meg a FOSHU-státuszt ([Internet 1](#)).

Ez az elmélet és koncepció közvetlen hatással volt a funkcionális élelmiszerek fejlesztésére. A funkcionális élelmiszerek fogalmát mára kiterjesztették az olyan élelmiszer-összetevőkre, amelyek csökkentik a krónikus betegségek kockázatát. Napjainkban a táplálkozástudomány új határán állunk, ahol megfigyelhető az átmenet a "megfelelő" táplálkozásról az "optimális" táplálkozásra. A funkcionális élelmiszereknek tehát kulcsszerepük van a táplálkozással összefüggő krónikus betegségek csökkentésében ([Swinbanks és O'Brien, 1993](#)).

A funkcionális élelmiszerek kategóriájába tartoznak a probiotikus és prebiotikus összetevőket tartalmazó élelmiszerek. A probiotikumok meghatározás szerint olyan "élő

mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva egészségügyi előnyöket biztosítanak a gazdaszervezet számára". A tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok a probiotikumok területén leginkább vizsgált és széles körben alkalmazott baktériumok és emellett a bélmikrobióta normális összetevői. A hasznos mikroorganizmusok számos törzsét használják az élelmiszerekben, ezáltal azok probiotikus jellegűek.

A prebiotikumok olyan nem emészthető élelmiszer-összetevők, mint a keményítők, élelmi rostok, egyéb nem felszívódó cukrok, cukoralkoholok és oligoszacharidok, amelyek a vastagbélben lévő egy vagy korlátozott számú baktérium növekedésének és/vagy aktivitásának serkentésével jótékonyan hatnak a gazdaszervezetre, ezáltal javítva a gazdaszervezet egészségét ([Gibson és Roberfroid, 1995](#)). A probiotikummal és prebiotikummal dúsított élelmiszerek fogyasztása, - pl. probiotikus joghurtok, prebiotikus kenyér - egészségügyi előnyökkel járnak, és a funkcionális élelmiszerek közé sorolhatók ([Kaur és Das, 2011](#)).

3.1.1. Probiotikumok

A probiotikum kifejezés technikai meghatározása a FAO/WHO szerint ([Internet 2](#)) "élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben történő fogyasztásukkor az általános táplálkozáson túlmutató egészségügyi előnyökkel járnak". Egészségügyi hatásuk táplálkozási és terápiás előnyeiknek köszönhető, különösen a káros mikroorganizmusok elleni védelemnek és az immunrendszer javításának.

A probiotikumok alkalmazása potenciálisan számos egészségügyi előnnyel jár, amelyek jól dokumentáltak. A probiotikus törzseknek bizonyított biztonságosságuk mellett jó funkcionális jellemzőkkel, valamint technológiai és fiziológiai tulajdonságokkal is rendelkezniük kell, hogy a termékekben megfelelő mennyiségben jelen legyenek ahhoz, hogy a fogyasztók számára az egészségre gyakorolt előnyeiket elősegítsék ([Barbosa és Teixeira, 2017](#)).

3.1.1.1. *Lactiplantibacillus plantarum* 299v

A *Lp. plantarum* faj a *Lactobacillaceae* család tagja. A faj nevét 2020-ban változtatták meg *Lactobacillus*-ról *Lactiplantibacillus*-ra ([Internet 3](#)).

A *Lp. plantarum* 299v egy probiotikus törzs, amely a Firmicutes törzsbe és a Gram-pozitív tejsavbaktériumok (LAB) közé tartozik. Általában megtalálható a növényi eredetű

tejsavasan fermentált élelmiszerekben, például a savanyú káposztában, a sózott olajbogyóban, a sós uborkában vagy a kovászbán. Az is bebizonyosodott, hogy ez törzs szájon át beadva képes kolonizálni az emberi bélnyálkahártyát, mivel az éhbél és a végbél nyálkahártyájának biopsziás anyagában megtalálható ([Każmierczak-Siedlecka és munkatársai, 2020](#)).

A *Lp. plantarum* 299v iránti érdeklődés a probiotikum nagyszámú kedvező tulajdonságának köszönhető. Jól tolerálja mind a gyomor savas pH-értékét, mind a nyombélben lévő epesók jelenlétéből adódó lúgos közeget. Ezenkívül lehetővé teszi, hogy a baktériumok az emésztőtraktuson keresztül a bélbe jussanak, ahol befolyásolhatják a bél mikrobiomját. A *Lp. plantarum* 299v az emberi bélrendszerben természetesen előforduló tejsavbaktériumok probiotikus törzse, amely képes modulálni az immunrendszert. Immunmoduláló tulajdonságai többek között a gyulladáscsökkentő citokinek szintjének csökkentésében figyelhetők meg. A *Lp. plantarum* 299v fogyasztása csökkenti az irritábilis bél szindróma tüneteit és javítja ezen betegek életminőségét, továbbá a *Clostridium difficile* okozta hasmenés kezelésében is szerepet játszik ([Każmierczak-Siedlecka és munkatársai, 2020](#)).

A *Lp. plantarum* 299v más patogén baktériumok túlélését is befolyásolhatja, attól függetlenül, hogy a készítmény a *Lp. plantarum* 299v-t önállóan vagy több törzssel együtt tartalmazza. Kimutatták, hogy tejsavbaktérium-keverék fogyasztása után a LAB szintje megnőtt az emberi székletben és az éhbél nyálkahártyájában ([Johansson és munkatársai, 1993](#)). Másrészt a szulfid-redukáló *Clostridium*-ok, az anaerob Gram-pozitív baktériumok, valamint a végbélnyálkahártya Gram-negatív anaerob baktériumainak mennyisége nagy mértékben csökkent a *Lp. plantarum* 299v készítmény beadása után ([Johansson és munkatársai, 1998](#)). A *Lp. plantarum* 299v befolyásolhatja a bél-asszociált nyirokszövet (GALT) veleszületett immunitását is. Növeli mind a mucinokat (MUC2 és MUC3) kódoló gének transzkripcióját és a gének goblet sejtekben történő kiválasztódását.

A mucinok olyan glikoproteinek, amelyek védelmet nyújtanak a bélnyálkahártya felszínének. Meggátolhatják a patogének kolonizációját és invázióját, és a vírusreplikációt befolyásolva hatékonyan korlátozhatják a vírusos megbetegedéseket. Emiatt (a mucinok termelésének és felszabadulásának stimulálásával) a *Lp. plantarum* 299v közvetve gátolhatja az enteropatogén *Escherichia coli* bélhámsejtekhez való tapadását. A *Lp. plantarum* 299v represszáló aktivitása gátló vegyületek, például szerves savak termelésének köszönhető ([Każmierczak-Siedlecka és munkatársai, 2020](#)).

[Johansson és munkatársai](#) kimutatták (1998), hogy (5×10^7 TKE/ ml dózisban) 21 napon keresztül egészséges önkénteseken végzett kísérletben a *Lp. plantarum* 299v adagolása jelentősen megnövelte a rövid szénláncú zsírsavak-, az ecetsav és a propionsav-koncentrációját a székletben, amelyek, befolyásolják a bél helyi pH-ját. A pH csökkentésével szabályozzák a patogének szaporodását. Gátolhatja a potenciálisan patogén baktériumok, például a *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* és *Enterococcus faecalis* növekedését is. valamint a bélereken keresztül történő véráramlás befolyásolásával szabályozzák az emésztőtraktust.

Emellett a *Lp. plantarum* 299v befolyásolhatja más baktériumok metabolikus aktivitását a vastagbélben. A tapadás a mannóz-kötődés mechanizmusán alapul, amely alapvető fontosságú a törzs immunmoduláló hatásaihoz. A törzs képes a CD4+ és CD8+ T-limfociták felszínén az aktivációs markerek kifejeződését a legjelentősebb mértékben növelni, ami arra utal, hogy a baktériumok fogyasztása az APC (antigénprezentáló sejtek) és a T-sejtek aktiválásához, illetve a szerzett immunitás általános növekedéséhez vezet. A veleszületett immunitásra gyakorolt hatás nem volt ennyire egyértelmű ([Kazmierczak-Siedlecka és munkatársai, 2020](#)).

3.1.1.2. Probiotikus élelmiszerek

A probiotikus élelmiszerek fogyasztása világszerte jelentősen megnőtt az elmúlt években. A probiotikus baktériumokat főként tejtermékekbe, tejporba, jégkrémbe, fagyasztott desszertekbe építik be, s alkalmazzák fermentált tejtermékek például joghurt, sajt előállítására. A tejtermékek fogyasztásával kapcsolatos hátrányok, mint a laktóztolerancia, tejfehérje allergia, magas koleszterintartalom miatt, valamint a fogyasztók vegetáriánizmusának növekedésével is egyre nagyobb igény mutatkozik a növényi alapú probiotikus termékek iránt a fejlett országokban. Világszerte számos hagyományos, nem tejalapú és alkoholmentes erjesztett italok, például Boza, Bush, Pozol, probiotikus szójatej és probiotikus gyümölcslevek készülnek. A gyümölcsleveket a probiotikus baktériumok ideális hordozójaként javasolták ([Tuorila és Cardello, 2002](#); [Luckow és Delahunty, 2004](#); [Prado és munkatársai, 2008](#)), mivel hasznos tápanyagokat, például ásványi anyagokat, vitaminokat és antioxidánsokat tartalmaznak, ízprofiljuk minden korosztály számára kellemes, valamint egészségesnek és frissítőnek érzékelik őket. A gyümölcsök ráadásul nem tartalmaznak olyan allergéneket, mint a tejben jelenlévő kazein és a laktóz.

Több tudományos cikk is foglalkozik ([Saarela és munkatársai 2006](#); [Perricone és munkatársai 2014](#); [Nag és Das 2013](#); [Tsen és munkatársai 2004](#); [Ding és Shah 2008](#)) a probiotikumok stabilitásának megőrzési lehetőségeinek növelésével a gyümölcslevekben. A legsikeresebb módszerek közé tartoznak a prebiotikumokkal, cellulózzal, β -glükánokkal történő dúsítás, alacsony hőmérsékleten, szén-dioxiddal dúsított légkörben történő tárolás, antioxidánsok hozzáadása vagy a probiotikumok kapszulázása. Legtöbbször, az alginát, kitozán, zselatin vagy cellulózszármazék bevonóval történő extrudálási módszert használják ([Nualkaekul és munkatársai, 2013](#)).

A kereskedelemben kapható gyümölcslevek főként két mikroba törzset tartalmaznak, ezek a *Lp. plantarum* 299v vagy a *Lc. rhamnosus* GG. A gyümölcslevek összetételükből kifolyólag nem mindig alkalmasak probiotikumok alkalmazására. Néhány gyümölcslé tartalmazhat olyan összetevőket, amelyek fokozzák a probiotikumok életképességét. A gyümölcslevekben a probiotikumok stabilitását befolyásolja az alkalmazott törzs és az inokulum, a gyümölcslé összetétele, az oxigénkoncentráció, az antimikrobiális vegyületek, a mesterséges színezékek és aromák jelenléte, valamint a gyártási folyamatok és a további kezelések ([Horácková és munkatársai, 2018](#)).

3.1.2. Prebiotikumok

A prebiotikumokat "szelektíven fermentálható összetevőkként határozzák meg, amelyek lehetővé teszik a bélmikrobióta összetételének és/vagy aktivitásának specifikus megváltoztatását, oly módon, hogy előnyöket biztosítsanak a gazdaszervezet jólétére és egészségére" ([Robertoid, 2007](#)). Az endogén flóra modulációja és az emésztőrendszer ozmotikus változásai a prebiotikumok hatásmechanizmusai.

Sokféle prebiotikum létezik. Többségük a szénhidrátsoportok egy alcsoportja, és többnyire nem emészthető oligoszacharidok. A fruktánok az inulinból és a frukto-oligoszacharidból vagy oligofruktózból álló kategória. Szerkezetük: $\beta(2\rightarrow1)$ kötéssel kapcsolódó fruktóz molekulák lineáris láncolata, mely tartalmaz egy láncvégi glükóz molekulát. A galakto-oligoszacharidok, laktózból felépülő termékek, melyek két alcsoportba sorolhatók: a galakto-oligoszacharidok a C₃, C₄ vagy C₆ helyen felesleges galaktózból és a laktózból enzimatis transzglykozilációval előállított galakto-oligoszacharidok. A transzglykolizációs reakció végterméke főként tri- és pentaszacharidok keveréke, amelyekben a galaktóz $\beta(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow3)$ és $\beta(1\rightarrow4)$ kötésekben található. Prebiotikumok közé tartozik továbbá a rezisztens keményítő, amely a felső bélrendszeri emésztéssel szemben rezisztens. A

rezisztens keményítő hasznosítása során keletkező nagy mennyiségű butirát elősegítheti az egészséget, ezért prebiotikumnak minősül. A polidextróz egy glükózból származó oligoszacharid. Sok elágazással és glikozidos kötéssel rendelkező glükánból áll. Egyes oligoszacharidok a pektinből származnak. Az ilyen típusú oligoszacharidot pektin oligoszacharidnak nevezik, melyek alapja a galakturonsav vagy a ramnóz. ([Davani-Davari és munkatársai, 2019](#)).

A prebiotikus tulajdonságokkal rendelkező poliszacharidokat, például inulint és maltodextrint használták a probiotikus baktériumok védelmére a fagyasztva szárítás során és a tárolás alatt. Avila-Reyes és munkatársai ([2014](#)) a *Lc. rhamnosus* életképességét vizsgálták porlasztva szárítás során, két prebiotikum felhasználásával, melyet az életképesség fokozása érdekében alkalmaztak. Az életképességi és stabilitási eredmények azt mutatták, hogy mindkét prebiotikum-kolloid (natív rizskeményítő és inulin) alkalmas a *Lc. rhamnosus* védelmére a porlasztva szárítás során. Corcoran és munkatársai ([2004](#)) nagy sejtszámmal és jó életképességgel rendelkező probiotikus laktobacillusokat, valamint prebiotikumokat tartalmazó porokat fejlesztettek ki kombinálva, melyek hasznosak lehetnek probiotikus élelmiszerek előállításához. A stationárius fázis kultúrái voltak a legalkalmasabbak a porlasztva szárítási eljárásra, míg a lag fázisúak voltak a legérzékenyebbek. A polidextróz és inulin jelenléte nem növelte az életképességet a porlasztva szárítás vagy tárolás során.

3.2. Kapszulázás

A kapszulázást olyan folyamatként határozzák meg, amely egy anyagot egy másik anyagba zár be, nanométeres (nanokapszulázás), mikrométeres (mikrokapszulázás) vagy milliméteres méretű részecskéket létrehozva. A kapszulázott anyagot általában maganyagnak, hatóanyagnak, töltőanyagnak, belső fázisnak vagy hasznos fázisnak nevezik. A kapszulázáshoz használt anyagot bevonó membránnak, héjnak, hordozó- vagy falanyagnak, külső fázisnak vagy mátrixnak nevezik. Speciális kapszulázási eljárásoknál, mint például a fagyasztva szárítás, a kapszulázáshoz használt anyagokat krioprotektánsoknak is nevezik ([Serna-Cock, L., és Valleio-Castillo, 2013](#)).

Az élelmiszeripari termékekben vagy eljárásokban használt falanyagnak élelmiszeripari minőségűnek kell lennie, és képesnek kell lennie arra, hogy gátat képezzen a hatóanyag és a

környezete között. Különböző típusú bevonó anyagokat, mint tartály, mátrix és bevonatos mátrix lehet megkülönböztetni. A tartály típusnál a maganyagot egy réteg veszi körül. A mátrix típusnál a hatóanyag a hordozóanyagban diszpergálva van, és a felületen is megtalálható. E két típus kombinációja adja a harmadik kapszulát, a bevonatos mátrixot, amelyben a hatóanyag egy további réteggel borított kapszula ([Serna-Cock, L., és Valleio-Castillo, 2013](#)).

Lehetőség van a baktériumok körüli üres terek megfigyelésére is. A transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) a mátrix mikroszerkezetének tanulmányozására, a baktériumok és a mátrix finom változásainak kimutatására használható, és részletesebb képet adhat a baktériumokkal töltött és baktériumok nélküli kapszulák porozitásának különbségeiről is ([Serna-Cock, L., és Valleio-Castillo, 2013](#)).

3.2.1. Mikrokapszulázás

Egy funkcionális termék kifejlesztése során a probiotikum életképessége kulcsfontosságú, és számos szakértő tanulmányozta a túlélés maximalizálásának különböző módjait. A probiotikumok mikrokapszulázása az egyik leghatékonyabb módszer arra, hogy a baktériumsejteket megvédjék az élelmiszerekben mind a külső környezet által okozott károsodásoktól, mind a gyomor-bélrendszeren való áthaladás során, hogy nagy számban jussanak el a bélbe. A maximális túléléssel párhuzamosan, a funkcionális tulajdonságoknak is meg kell maradniuk a termék szárítása, tárolása és emésztése után. Továbbá a probiotikus baktériumoknak a termék feldolgozása és tárolása során nem szabad befolyásolniuk a termék érzékszervi jellemzőit ([Gandomi és munkatársai, 2016](#)).

A gyümölcslevekbe vagy bármely más mátrixba beépítendő probiotikum kiválasztását körültekintően kell elvégezni. A probiotikus gyümölcslevek előállítása összetettebb, mint a tejtermékeké, mivel alacsony pH-értékük (3-4,5) korlátozza a probiotikus baktériumok növekedését és stabilitását. Számos tanulmány ([Ortakci és Sert, 2012](#); [Abbaszadeh és munkatársai, 2014](#); [Krasaekoopt és munkatársai, 2004](#)) számolt be probiotikumok mikrokapszulázásáról alginát, rezisztens keményítő, zselatin, kitozán és növényi gumi alkalmazásával, hogy védelmet biztosítson a *Bifidobacterium*-ok és tejsavbaktériumok számára.

3.2.2. Mikrokapszulázási technikák

3.2.2.1. Porlasztva szárítás

A porlasztva szárítás, mint a probiotikus kultúrák mikrokapszulázási technikája nagyon elterjedt gyakorlat, hogy könnyen tárolhatóvá és a kedvezőtlen körülményekkel szemben ellenállóbbá tegyék őket ([Barbosa és Teixeira, 2017](#)). A porlasztva szárítás egy régi szárítási technika, amely abból áll, hogy a folyékony mintát egy porlasztó berendezéssel kis cseppekké alakítják. A forró levegővel érintkezve a cseppek elveszítik nedvességtartalmukat, és száraz szilárd részecskék keletkeznek.

A probiotikus és starter kultúráként alkalmazható baktériumokat általában szárítják, hogy könnyen felhasználható, stabil és rugalmas összetevőket állítsanak elő az élelmiszer-, takarmány- és gyógyszeriparban való alkalmazáshoz. A szárított probiotikus baktériumok iránti kereslet a gyorsan növekvő piaccal együtt megnőtt, emiatt nagyobb léptékű termelésre van szükség. A baktériumok porlasztva szárítása nagyobb mértékű termelést tesz lehetővé, mint a jelenleg alkalmazott fagyasztva szárítás, mivel az energiaköltségek alacsonyabbak és az eljárás jobban fenntartható. Egyúttal ez ígéretes módja a baktériumok mikrokapszulázásának különböző védőmátrixokban, hogy biztosítsák jobb ellenálló képességüket a tárolás, a technológiai folyamatok és az emésztés során ([Huang és munkatársai, 2017](#)).

Különböző probiotikus törzsek esetén, eltérő összetételű mátrixokban történő porlasztva szárításával végzett vizsgálatok ([El-Salam és El-Shibiny, 2015](#); [Martín és munkatársai, 2015](#); [Rokka és Rantamäki, 2010](#)) azonosították azokat a főbb tényezőket, amelyek befolyásolják életképességüket a porlasztva szárítás előtt, alatt és után. Ezen tulajdonságok, többek közt a higroszkóposság, a nedvességtartalom, az oldhatóság vagy a szín, hatással vannak bizonyos porlasztva szárítási paraméterekre vagy körülményekre, mint például a minta adagolásának hőmérsékletére és sebességére, a szárítási segédanyag típusára és koncentrációjára, a belépő levegő hőmérsékletére stb. A legjobb szárítási körülmények kiválasztása és optimalizálása alapvető fontosságú a kiváló minőségű termék előállításához ([Barbosa és Teixeira, 2017](#)).

A porlasztva szárítás alkalmazása a probiotikumot tartalmazó gyümölcslelő előállításához olcsó és egyszerű módszer lehet a termék tárolásának, szállításának és kereskedelmi forgalomba hozatalának megkönnyítésére. Több vizsgálatot végeztek ([Cal és Sollohub 2010](#);

[Gharsallaoui és munkatársai 2007](#)) különböző gyümölcslevek porlasztva szárításával kapcsolatban, amelyek egyértelműen kimutatták, hogy ezek nem száríthatók tiszta állapotukban, segédanyagok hozzáadása nélkül, mivel magas cukortartalmú termékekről van szó.

A nagy mennyiségű kis molekulatömegű cukor jelenléte hozzájárul az alacsony üvegesedési hőmérséklethez, és következésképpen a porlasztva szárítás során a ragadósodáshoz, valamint a por tárolása során a csomósodáshoz. A nagy molekulatömegű szárítási segédanyagokat, például maltodextrint vagy gumiarábikumot, általában a keverék üvegesedési hőmérsékletének növelésére és a ragadósodási problémák minimalizálására használják. Használatuk hozzájárul a funkcionális gyümölcslé előállításához is, mivel ezen összetevők prebiotikus tulajdonságai már bizonyítottak ([Barbosa és Teixeira, 2017](#)).

3.2.2.2. Liofilizálás

A liofilizálás a probiotikumnak a hordozóanyaggal együtt történő fagyasztásával történik (jellemzően -30 és -20°C között), majd a víz vákuumos szublimálásával $0,05-0,1$ mBar abszolút nyomáson és -50 és -30°C közötti hőmérsékleten. A liofilizáláskor krioprotektánsokat alkalmaznak a probiotikus aktivitás és stabilitás megőrzésére a tárolás során. A leggyakoribb krioprotektánsok a laktóz, a trehalóz, a szorbit, a szacharóz, a tejfehérje és a sovány tej. A liofilizálással kapszulázott probiotikumok jobb tárolási stabilitással rendelkeznek, különösen alacsony hőmérsékleten és inert légkörben (nitrogén vagy vákuum). Sajnos a liofilizálás 4-7-szer drágább, mint a porlasztva szárítás ([Serna-Cock, és Valleio-Castillo, 2013](#)).

Carvalho és munkatársai ([2003](#)) 11% sovány tejben oldott szorbit és mononátrium-glutamát hatását vizsgálták a liofilizált probiotikumok - *L. bulgaricus*, *Lp. plantarum*, *Lc. rhamnosus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* életképességére szobahőmérsékleten megvalósított tárolás során. Mind a szorbit, mind a mononátrium-glutamát erős védőhatásáról számoltak be a vizsgált baktériumok esetén, mely törzsenként eltérőnek bizonyult. A vizsgált törzsek között különböző túlélési mintázatokat figyeltek meg. Következésképpen az egyes védőanyagok hatását egy adott törzs életképességére a liofilizálás alatt vagy után eseti alapon kell meghatározni.

Khoramnia és munkatársai ([2011](#)) válaszfelület-módszertant (RSM) használtak központi elrendezésű kísérlettervezési módszerrel (CCD), hogy tanulmányozzák a krioprotektánsok

(sovány tej, szacharóz és laktóz) hatását a *Limosilactobacillus reuteri* C10 probiotikus törzs túlélési arányára a liofilizálás és a tárolás során a baromfikon történő közvetlen alkalmazás céljából. A tervezés során használt központi pontok 12,5% (w/v) sovány tej, 8% (w/v) szacharóz és 12,5% (w/v) laktóz voltak. Az eredmények azt mutatták, hogy a krioprotektánsok különböző kombinációiban történő együttes alkalmazása kevésbé csökkentette a sejtek életképességét a liofilizálás során. Az életképesség-veszteség 0,26 és 0,66 log TKE/ml között mozgott, míg krioprotektánsok nélkül 1,65 log TKE/ml értékeket figyeltek meg. A krioprotektánsok optimális kombinációját a *Ll. reuteri* C10 tartósításához és tárolásához 19,5% sovány tej, 1% szacharóz és 9% laktóz alkalmazásával kapták. A liofilizált *Ll. reuteri* C10 túlélési aránya 6 hónapos 4 és 30°C-on megvalósított tárolás során a krioprotektánsok legjobb kombinációját használva 96,4, illetve 73,8% volt.

Jin és munkatársai (1998) liofilizált *Lactobacillus* kultúrákkal kiegészített takarmányt használva brojlersirkék takarmányozására azt tapasztalták, hogy a *Lactobacillus* kultúrák jelenléte jelentősen növelte a brojlersirkék testtömegét és takarmány: nyereség arányát 0-6 hét alatt. Huang és munkatársai (2006) RSM-et alkalmaztak a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB14 életképességének javítására szacharóz, glicerin, szorbit és sovány tej felhasználásával a liofilizálás során. A *L. bulgaricus* LB14 optimális védőközegét a következőképpen határozták meg: szacharóz 66,40 g/l, glicerin 101,20 g/l, szorbit 113,00 g/l és sovány tej 130,00 g/l. Ez a védőközeg 86,53%-os életképességet eredményezett a fagyasztva szárított *Lp. bulgaricus* LB14 esetében.

Szintén sovány tejet vagy szacharózt használtak krioprotektánsként *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* fagyasztva tárolása során, és azt találták, hogy a szacharóz jobb védőhatást eredményezett a gyümölcsleiben, mint a fehérjetartalmú készítmény (Ying és munkatársai, 2013).

3.2.3. Kapszulázó anyagok

3.2.3.1. Tejsavófehérje

A tejsavófehérjéket használták először probiotikumok mikrokapszulázására. Kémiai és fizikai tulajdonságaik miatt a tejfehérjék, mint például a sajtgyártás melléktermékeként nyert tejsavófehérje-izolátum, könnyen felhasználható probiotikus mikrokapszulák előállításához. A tejsavófehérje-izolátum gazdag forrása a funkcionális fehérjéknek (90-96%), és fizikai-kémiai tulajdonságai lehetővé teszik az intermolekuláris keresztkötést más polimerekkel. A

tejsavófehérjéket gyakran adják szénhidrát biopolimerekhez a mikrokapszulák stabilitásának növelése érdekében ([Kowalska és munkatársai, 2022](#)).

Doherty és munkatársai (2012) a *Lc. rhamnosus*-t, azaz az egyik legismertebb baktériumtörzset tartalmazó, tejsavófehérje-alapú mikrokapszulák tulajdonságait vizsgálták. A szerzők a mikrokapszulákat alacsony, a gyomor pH-értékéhez hasonló (pH 3,4, pH 2,4, pH 2,0) kémhatásnak tették ki, és kielégítő eredményeket kaptak. Megállapították, hogy a védetlen baktériumsejtekhez képest a mikrokapszulák 5,7 és 5,1 log TKE/ml mennyiségben túlélték a kedvezőtlen külső körülményeket. A tejsavófehérje-alapú mikrokapszulák jó ellenállóképességet mutattak a gyomorsavval szemben, ami az élő baktériumsejtek ellenőrzött felszabadulását indította el a célhelyen, azaz a vastagbélben.

3.2.3.2. Maltodextrin

A maltodextrinek könnyen emészthető oligoszacharidok, amelyeket élelmiszer-adalékanyagként használnak. D-glükóz egységekből állnak, amelyet keményítőből állítanak elő a keményítő részleges enzimatisz hidrolízisével. A maltodextrin dextróz-egyenértéke kevesebb mint 20, ami azt jelzi, hogy hosszú szénhidrátláncokat tartalmaz 2-3% glükóz és 5-7% maltóz mellett. Fehér, porlasztva szárított por formájában kapható, amely enyhén édes, szinte íztelen. A maltodextrinek kiváló vízdoldékonysággal és alacsony higroszkóposzággal rendelkeznek. A szerkezet a maltodextrint egyszerű szénhidrátként emészt meg, így könnyen átalakítható azonnali energiává. E tulajdonságának köszönhetően sportitalokban és gyors energiacsomagokban ajánlják nagy állóképességet igénylő sportokat űző fogyasztók számára ([Parikh és munkatársai, 2014](#)). A maltodextrin felhasználása összetételétől, azaz a DE-értéktől is függ, például az alacsony DE-értékű MD ragadósabb, ezért zselés termékekben, például szirupokban és lekvárookban használják, míg a magas DE-értékű MD jobban fagy, és a jégkrémekben térfogatnövelő anyagként használják. A maltodextrint jó bevonó anyagnak tekintik, mivel magas szilárdanyag-tartalom mellett alacsony viszkozitást is mutat ([Parikh és munkatársai, 2014](#)).

Mindezek a tulajdonságok a hatóanyagok tökéletes hordozójává teszik őket, és így ideális anyagot jelentenek a baktériumsejtek mikrokapszulázásához is. A maltodextrineket a tejsavófehérjével együtt gyakran használják kapszulázáshoz. A maltodextrinnek kombinálva a savófehérjék olyan struktúrákat alkotnak, amelyek hatékonyan védik a kapszula magját és kalcium-klorid oldatban megkeményednek ([Kowalska és munkatársai, 2022](#)).

A maltodextrinek a paprika oleoresin karotinoidjainak védelmében is hatékonyak bizonyultak. A maltodextrinek a tejsavófehérjékkel együtt hatékony falanyagként szolgáltak az etilkaprilát mikrokapszulázásához. Ráadásul a Tween 80 emulgeálószerrel való kombinációja nagyobb mennyiségű bixint volt képes kapszulába zárni, mint csak maga a maltodextrin. A maltodextrin bevonó anyagként használható a tápanyagok, például vitaminok kapszulázására. Széles körben használják hígítószerként és segédanyagként is, hogy bizonyos gyógyszereket közvetlen tömörítéssel kompatibilissé tegyenek ([Parikh és munkatársai, 2014](#)).

3.2.3.3. Inulin

Az inulin olyan polidiszperz szénhidrát, amely β -(2-1) kötéssel kapcsolódó fruktóz molekulákból áll és a láncvégen egy glükózt tartalmaz. Több egy- és kétszikű növénycsaládban található inulin, köztük a *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae* és *Compositae* családokban. Azonban csak egy inulintartalmú növényfajt (cikória, *cichorium intybus*) használnak iparilag inulin előállítására. A cikória inulinjában a fruktózegységek száma 2-től >70-ig terjed ([Roberfroid, 2000](#)).

A natív inulint az élelmiszeriparban feldolgozzák, hogy részleges enzimátikus hidrolízis (inulináz, E.C. 3.2.1.7) eredményeként rövidlancú fruktánokat, különösen oligofruktózt (polimerizációs fok: 2-10; átlag: 5), vagy ipari fizikai elválasztási technikával hosszúlancú fruktánokat állítsanak elő. Az inulin egy alacsony emészthetőségű és oldható rost, amelyet egyre gyakrabban használnak a humán élelmiszer-készítményekben. Ma már jól ismert, mint a gazdaszervezet emésztőrendszerének mikrobiális összetételét befolyásoló fontos prebiotikus anyag. Bebizonyosodott, hogy védi a *Lactiplantibacillus spp.*-t és javítja a túlélésüket és aktivitásukat a tárolás során ([Roberfroid, 2000](#)).

Fritzen-Freire és munkatársai ([2012](#)) bifidobaktériumokat mikrokapszuláztak porlasztva szárítással prebiotikumok jelenlétében. Megállapították, hogy a sovány tej részleges helyettesítése inulinnal és a sovány tej részleges helyettesítése oligofruktózzal dúsított inulinnal növelte a bifidobaktériumok kezdeti számát a mikrokapszulákban. Másrészt a mikrokapszulák jobb védelmet mutattak a bifidobaktériumok számára tárolás során. A prebiotikumok használata nem befolyásolta a mikrokapszulák morfológiáját. Az oligofruktózzal előállított kapszulák azonban kisebb szemcseméretet mutattak. A prebiotikumok hozzáadása csökkentette a mikrokapszulák nedvességtartalmát és vízaktivitását. Az inulinnal előállított mikrokapszulák mutatták a legalacsonyabb vízben

való oldódást, míg az oligofruktózzal előállított mikrokapszulák voltak a leghigroszkóposabbak. Végül az eredmények azt mutatták, hogy az oligofruktózzal dúsított inulin a legmegfelelőbb prebiotikum a *Bifidobacterium lactis* BB-12 mikrokapszulázásához porlasztva szárítás során, a sovány tej részleges helyettesítésére.

3.2.3.4. Alginát

A bevonó anyagok közül az alginát a leggyakrabban használt polimer az életképes sejtek gélbezárással történő immobilizálására. Az alginátok előfordulnak a tengeri barna algákban (*Phaeophyceae*) szerkezeti összetevőként, valamint egyes baktériumokban kapszuláris poliszacharidként. Az alginátok bináris, lineáris kopolimerek, amelyek kötött β -D-mannuronsav és α -L-guluronsav maradékokból állnak, amelyek összetétele és sorrendje nagymértékben eltér. A probiotikumok kalcium-alginát gélbe történő kapszulázása megvédte a *Lactocaseibacillus paracasei* L26 törzset alacsony pH-jú gyümölcslemben a hűtött tárolás során (5 °C) ([Rodrigues és munkatársai, 2011](#)). Emellett kimutatták, hogy a *Lc. rhamnosus* GG (LGG) fehérje gélhálózatba ágyazása szintén megvédte az LGG-t a hő- és savas stresszel szemben *in vitro*, valamint *ex vivo* gyomor-bélrendszeren való áthaladás során. Bár az alginát nem mérgező és kíméletes mátrixot alkot a kalcium-kloriddal a probiotikus baktériumok kapszulázására, savas környezetre érzékeny. A polikationok, például a kitozán vagy a poliaminsavak csökkentik az alginátgél porozitását. A kitozán, egy deacetilezett kitin, egy természetes, nem toxikus és olcsó, savas közegben pozitív töltéssel rendelkező lineáris poliszacharid, amelyet az alginát gyöngyök bevonására használtak.

3.2.3.5. Rezisztens keményítő

A rezisztens keményítő az élelmi rostok egyik formája, és a természetben számos keményítőtartalmú élelmiszerben megtalálható. A rezisztens keményítő nem emésztődik meg olyan gyorsan, mint a közönséges keményítő, ellenáll a keményítóbontó α -amiláz és pullulanáz enzimeknek, nem hidrolizálódik glükózzá a vékonybélben, de a vastagbél mikrobiótája fermentálja. Ez a tulajdonsága nagy biológiai jelentőséggel bír. A rezisztens keményítő csökkent emészthetőségét számos belső és külső tényező befolyásolja, mint például az élelmiszer viselkedése és jellege, az élelmiszer-feldolgozás és a fiziológia ([Raigond és munkatársai, 2015](#)).

A rezisztens keményítő elősegíti a probiotikus baktériumok növekedését és aktivitását. A rezisztens keményítő elfogyasztása segít meghosszabbítani az egyes probiotikus

organizmusok életképességét a vastagbélben. Prebiotikumként az rezisztens keményítő megvédi a probiotikumot a vastagbélbe vezető úton. A rezisztens keményítő tulajdonságai miatt jól használható kapszulázó segédanyagként ([Raigond és munkatársai, 2015](#)).

Sályi Gábor Szakdolgozat

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Anyagok

4.1.1. Alkalmazott mikroorganizmus

Maganyagként a *Lactiplantibacillus plantarum* 299v-t használtam, amely a Biomérnök és Erjedéstechnológiai Technológia Tanszék (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem) törzsgyűjteményében rendelkezésre állt.

4.1.2. Felhasznált oldatok, pufferek, tápközeg

Foszfáttal pufferelt sóoldat (PBS) (0,1M, pH=7,4)

A foszfáttal pufferelt sóoldathoz, 8g NaCl-ot, 0,2g KCl-ot, 1,15g Na₂HPO₄·2H₂O-ot és 0,2g KH₂PO₄-ot oldottam fel 1l desztillált vízben. Az oldatok sterilizálása 121°C-on 15 percig autoklávban történt.

MRS (de Man, Rogosa és Sharpe) tápközeg

Az MRS tápközéget használtam a *Lp. plantarum* 299v törzs fenntartásához, illetve az élősejtszám meghatározáshoz. A tápközeg összetétele az 1. táblázatban látható. A tápközeg sterilizálása 121°C-on 15 percig autoklávban történt.

1. táblázat: Az MRS tápközeg összetevői

Összetevő	Mennyiség
Pepton	10,00 g
Húskivonat	8,00 g
Élesztőkivonat	4,00 g
D-glükóz	20,00 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	2,00 g
Nátrium-acetát	5,00 g
Triammónium-citrát	2,00 g
Magnézium-szulfát-heptahidrát	0,20 g
Mangán-szulfát-tetrahydrát	0,05 g
Tween 80	1,00 ml
Desztillált víz	1000,00 ml

MRS tápagar

Összetétele megegyezik az 1. táblázatban közölt MRS táplevessel, kiegészítve 15 g/l agar-agarral.

Fiziológiás sóoldat

A sóoldat készítéséhez 8,5g NaCl-ot oldottam fel 1 liter desztillált vízben. Az oldatból 4,5ml-t mértem be mindegyik kémcsőbe, amiket ezután 121°C-on 15 percig sterilizáltam autoklávban.

Kereskedelmi forgalomban kapható szüretlen, jó minőségű HAZÁNK Kincsei almale.

4.1.3. Bevonó anyagok

- Poliszacharidok

- Maltodextrin
- Rezisztens keményítő

A nagy tisztaságú maltodextrin és a rezisztens keményítő az Ingredion Company-tól (Németország) került beszerzésre.

- Fehérjék

- Tejsavófehérje
- Denaturált tejsavófehérje

A tejsavófehérje beszerzése a Nutriverson® Ltd.-től (Magyarország) történt. A denaturált tejsavófehérje készítése 20% (w/w) tejsavófehérje oldat 90°C on történő 20 perces melegítésével zajlott.

- Maillard-reakció termék

- maltodextrin
- tejsavófehérje sóoldatban történő feloldásával készült.

A Maillard-reakció termék oldat koncentrációja 20% (w/w) volt. A pH módosítása 8,0-ra 4 N NaOH-oldattal történt. A Maillard-reakció termékek kialakulásának érdekében az oldat 90°C-on 4 órát töltött vízfürdőben, majd a hűtést követően tárolás történt 4°C-on további felhasználásig.

4.1.4. Felhasznált eszközök

- pH mérő

- Mérőhenger
- Erlenmeyer-lombik
- Vízfürdő
- Petri-csésze
- Steril lamináris fülke
- Analitikai mérleg
- Pasteur- és automata pipetta
- Főzőpohár
- Termosztát
- Centrifuga csövek

4.2. Módszerek

4.2.1. Törzsfenntartás

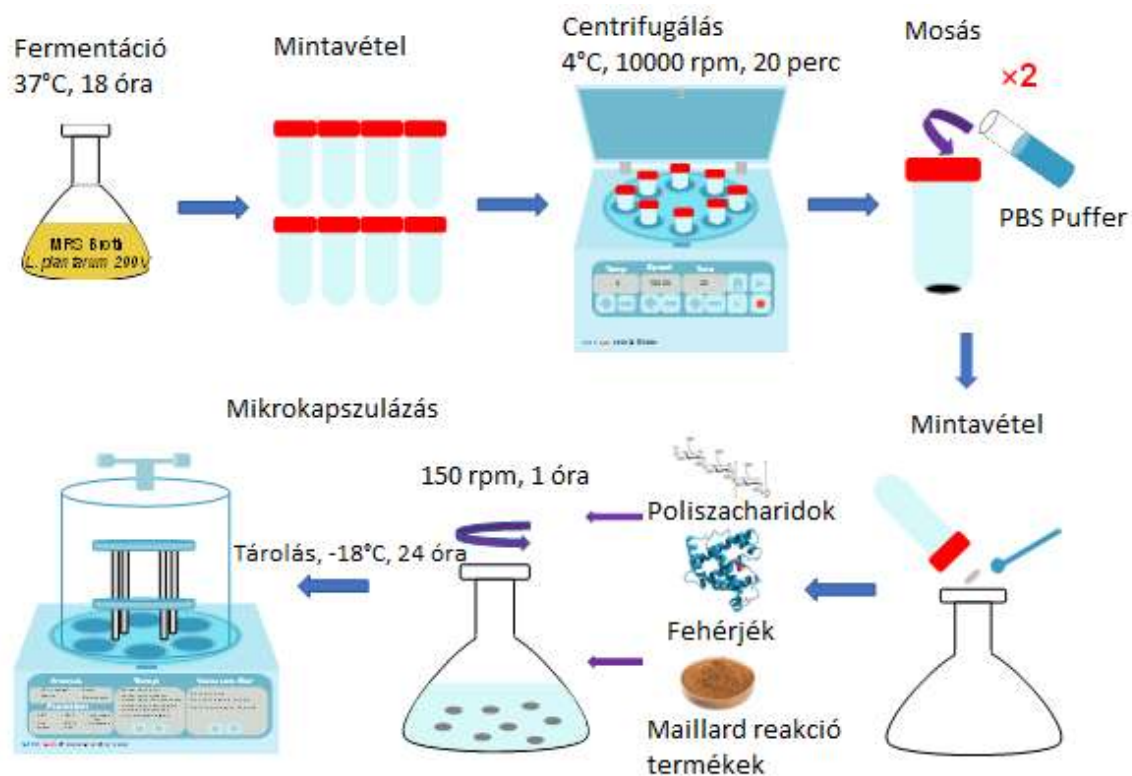
A *Lp. plantarum* 299v fenntartása de Man, Rogosa és Sharpe (MRS) tápoldatban történt. Többszöri átoltást végeztem a sejtömeg előállítás előtt, mely stacionárius fázisig 37 °C-on 18 órán keresztül történt.

4.2.2. Sejtömeg előállítás kapszulázásra

A probiotikus *Lp. plantarum* 299v sejtek felszaporítása MRS tápközegben történt, majd a sejtek összegyűjtése 18 órás 37°C-on történő növekedés után 20 perces, 4 °C-on 10 000×rpm-en végzett centrifugálással történt. Az összegyűjtött baktériumok mosása kétszer zajlott PBS oldattal, majd ezt a sejtuszpenziót alkalmaztam a probiotikum fagyasztva szárítására különböző falanyagokkal keverve.

4.2.3. Kapszulázás

A kapszulázás (1. ábra) során az egyes minták szuszpenziójának sterilizált és tiszta szárítóüvegbe adagolása történt. A sejtömeghez a poliszacharidok és a fehérjék hozzáadása, majd rázatása 150 rpm-en 1 óráig szobahőmérsékleten zajlott. Az így elkészült mikrokapszulázott készítmények tárolása -18°C-on, 24 óráig történt, előkészítve a fagyasztva szárításra.



1. Ábra: A mikrokapszulázás menete (Suly és munkatársai, 2022 nyomán)

A fagyasztva szárításhoz a minták összeállítása 10 g (w/w) nedves baktérium pellet és 10 g különböző falanyagok összekeverésével készült el a célzott 1:1 arány elérése érdekében (2. táblázat).

2. táblázat: Különböző kapszula típusok összeállítása

Mag-héj arány	Bevonó anyagok	Bevonó anyagok mennyisége (g)	<i>Lp. plantarum</i> sejt-koncentráció (g)	Tápközeg koncentráció (% w/w)	Teljes tömeg (g)
1:1	Maltodextrin: Rezisztens Keményítő	10,00:10,00	20,00	20,00	200,00
	Tejsavófehérje: Denaturált tejsavófehérje	10,00:10,00	20,00	20,00	200,00
	Maltodextrin: Tejsavófehérje	10,00:10,00	20,00	20,00	200,00

4.2.4. Liofilizálás

A minták liofilizálása laboratóriumi méretű liofilizáló berendezéssel (Christ Alpha 2-4 Freeze Dryer, Németország) történt. A liofilizálás során az állandósult állapot elérésekor aktuális nyomás 0,250 mbar, az aktuális hőmérséklet pedig 17°C volt. A szárítási folyamat 3 napig tartott. A mikrokapszulák szárított mintáinak porítása aszeptikus körülmények között zajlott, majd sterilizált üvegekben 4°C-on lettek tárolva a későbbi felhasználásig.

4.2.5. Sejtszám meghatározása

Az élő sejtek számának meghatározására lemezöntést alkalmaztam, a sejtszámot telepkepző egység/ml (TKE/ml) értékben adtam meg. A sejtszám vizsgálatához 0,01 g mintát adagoltam 4,5 ml steril fiziológiás sóoldathoz. Homogenizálás után 5 tagú hígítási sort készítettem mind a 3 minta esetében, minden mintának 2 ismétlése volt. Ezen hígítási sorok tagjaiból 0,1 ml-t oltottam le steril Petri-csészékbe. A lemezöntést MRS tápaggal végeztem. Miután az MRS tápagar megszilárdult, a lemezeket 37°C-on inkubáltam 48 órán keresztül. Az inkubálási idő elteltével megszámláltam a baktériumtelepeket. 30 és 300 közötti kolóniák megszámlálása elfogadható.

4.2.6. Pásztázó elektronmikroszkópia

A mikrokapszulák morfológiai jellemzőinek vizsgálata Állatitermék és Élelmiszertartósítási Technológia Tanszéken található pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) történt. A mintákat vákuumkamra lemezére ragasztottuk, majd a kamra a vizsgálat előtt fokozatosan 200 Pa-ra csökkentette a nyomást. A vizsgálat Thermo Scientific™ Prisma™ E (Waltham, Massachusetts, USA) SEM készülékkel zajlott 15 kV-os gyorsítófeszültség mellett. A minták vizsgálata 1000 és 14000-szeres nagyítással történt.

4.2.7. Mikrokapszulázott probiotikumokkal dúsított almalé tárolása 4 °C-on

A dúsított mintákat úgy készítettem, hogy 90 ml almaléhoz 0,2 g probiotikus mikrokapszulát adtam. A dúsított almalé minták elkészítése után a mintákat 4 °C-on tároltam. Kéthetente vettem mintákat, meghatároztam a sejtszámot, illetve követtem a pH alakulását a 8 hetes tárolás során.

4.2.8. Kapszulák jellemzőinek meghatározása

A bevonó anyag kombináció és a mag-héj arány hatását a sejtek életképességére, a hozamra és a sűrűsége értékeltem. A *Lactiplantibacillus plantarum* 299v mikrokapszulázásához 3 bevonó anyag kombinációt használtam, mag-héj arány=1:1, Maltodextrin: Rezisztens Keményítő; mag-héj arány=1:1, Tejsavófehérje: Denaturált tejsavófehérje; és mag-héj arány=1:1, Maltodextrin: Tejsavófehérje.

4.2.8.1. Hozam meghatározása

A hozamot a szilárd anyagok teljes mennyiségének liofilezés előtti és utáni mérlegelésével vizsgáltam. A liofilizálás előtt a probiotikus sejtek és a bevonó anyagok nedves tömegét vettem figyelembe, a liofilizálás után a mikrokapszulák teljes szilárd tömegét. A teljes szilárd tömeg arányának százalékos arányát a liofilizálás után és a liofilizálás előtt hozamként ábrázoltam, az alábbi egyenlet szerint.

$$Y \% = \frac{m_t}{m_0} \times 100$$

ahol Y a hozamra (%) utal, m_0 és m_t a liofilizálás előtti, illetve utáni össztömeget (g) jelentette.

4.2.8.2. Sűrűség meghatározása

A sűrűséget 1 g minta térfogatának mérésével határoztam meg egy 5 ml-es hengerben 2 perc vortexelés után. A sűrűség mérése az alábbi egyenlet segítségével történt.

$$\rho = \frac{m}{v}$$

ahol a sűrűség (kg/m^3), m a minta tömege (kg), v pedig a hengerben elfoglalt térfogat (m^3).

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Kutatómunkám során a *Lactiplantibacillus plantarum* 299v törzs mikrokapszulázását és életképességének vizsgálatát végeztem el. A mikrokapszulák készítése 3 különböző összetételű keményítő és fehérje alapú védőanyagok hozzáadása mellett történt. Az egyik anyag, amit a kísérlet során használtam poliszacharid bevonóanyag volt, ami maltodextrin és rezisztens keményítő (továbbiakban MD:RS) keveréke volt. A második bevonóanyag fehérje bevonó anyag volt, ami tejsavófehérje, valamint denaturált tejsavófehérje (továbbiakban WP:DWP) keveréke volt. Végül a harmadik bevonó anyagom Maillard-reakció termékei, maltodextrin és tejsavófehérje (továbbiakban MD:WP) volt. A mikrokapszulák jellemzőinek, valamint életképességének meghatározásához, a három mikrokapszula formulációt párhuzamosan vizsgáltam hasonló körülmények között, majd az eredményeket egymással összehasonlítottam.

Vizsgáltam továbbá a *Lactiplantibacillus plantarum* különböző bevonó anyagokkal bevont mikrokapszulák életképességét almalében.

5.1. A kapszulák készítése és jellemzése

A mikrokapszulák előállításához a *Lp. plantarum* 299v felszaporítása sikeresen megtörtént. A baktérium a felszaporítás után centrifugálással összegyűjtésre került, majd megtörtént a probiotikus baktérium mikrokapszulázása különböző falanyag kombinációk alkalmazásával. A liofilizálás után a különböző típusú mikrokapszulák jellemzését, majd a sejtek életképességének jellemzését végeztem el. A mikrokapszulák morfológiájának megállapítása pásztázó elektronmikroszkópiával történt. A kapszulák jellemzőit sűrűsége, valamint hozamra értékeltem.

5.1.1. Hozam és sűrűség meghatározása

A kapszulázási hozam és a sűrűség alapvető paraméterek a probiotikus mikrokapszulák gyártása, csomagolása és tárolása során. A *Lp. plantarum* 299v törzs kapszulázásának hozamát és sűrűségét három különböző bevonó anyagnál a 3. táblázatban mutatom be.

A hozam a MD:RS, WP:DWP, valamint MD:WP bevonó anyaggal bevont mikrokapszulák esetében 57,18%, 59,76% és 55,79% volt. A hozam adatok alapján meghatározható, hogy a

WP:DWP készítménynek volt a legnagyobb hozama, a legrosszabb hozam a MD:WP készítmény esetében volt.

Az ömlesztett sűrűség a MD:RS, WP:DWP, valamint MD:WP formulációk esetében 0,25 g/cm³, 0,27 g/cm³ és 0,16 g/cm³ volt. A sűrűség adatok alapján megállapítható, hogy a MD:RS, valamint WP:DWP kapszulák sűrűsége hasonló. Ezzel ellentétben a MD:DWP kapszula sűrűsége kisebb. A hozam, illetve sűrűség adatok alapján látható, hogy a bevonó anyagok nagyban befolyásolják ezeket a paramétereket.

3. táblázat: A különböző bevonó anyagokkal bevont kapszulák jellemzői

Bevonó anyagok		Hozam (%)	Sűrűség (g/cm ³)
Maltodextrin:Rezisztens keményítő	Átlag	57,18%	0,25
	Szórás	0,90%	0,01
Tejsavófehérje:Denaturált Tejsavófehérje	Átlag	59,76%	0,27
	Szórás	0,51%	0,02
Maltodextrin:Tejsavófehérje	Átlag	55,79%	0,16
	Szórás	0,87%	0,00

Rather és munkatársai (2017) kísérlete során algináttal mikrokapszulázott *Lp. plantarum* NCDC201 törzset használtak. A hozam a mikrokapszulázás során 72,48% volt. Zhao. és munkatársai (2018) kísérletében az A-típusú zselatinnal bevont *Lp. plantarum* ST-III mikrokapszulázott készítmény hozama 40,80% volt. Tao és munkatársai (2019) kísérlete során sovány tejjel bevont *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 törzs hozama 75,70% volt. Ezeket az eltéréseket a hozamban a poliszacharidok közötti különbségek okozzák. Az adatokból megállapítható, hogy a poliszacharid típusa nagyban befolyásolja a hozamot.

Sun és munkatársai (2023) kísérletében a, 1:1 mag-héj arányú maltodextrint és rezisztens keményítőt önmagában tartalmazó, készítmények sűrűsége az általam készített MD:RS, mag-héj arány 1:1 készítményhez képest alacsonyabb, valamint magasabb volt. Ez az eltérés a különböző bevonó anyaggal bevont mikrokapszulák között a maltodextrin nedvességhez való affinitása miatt van.

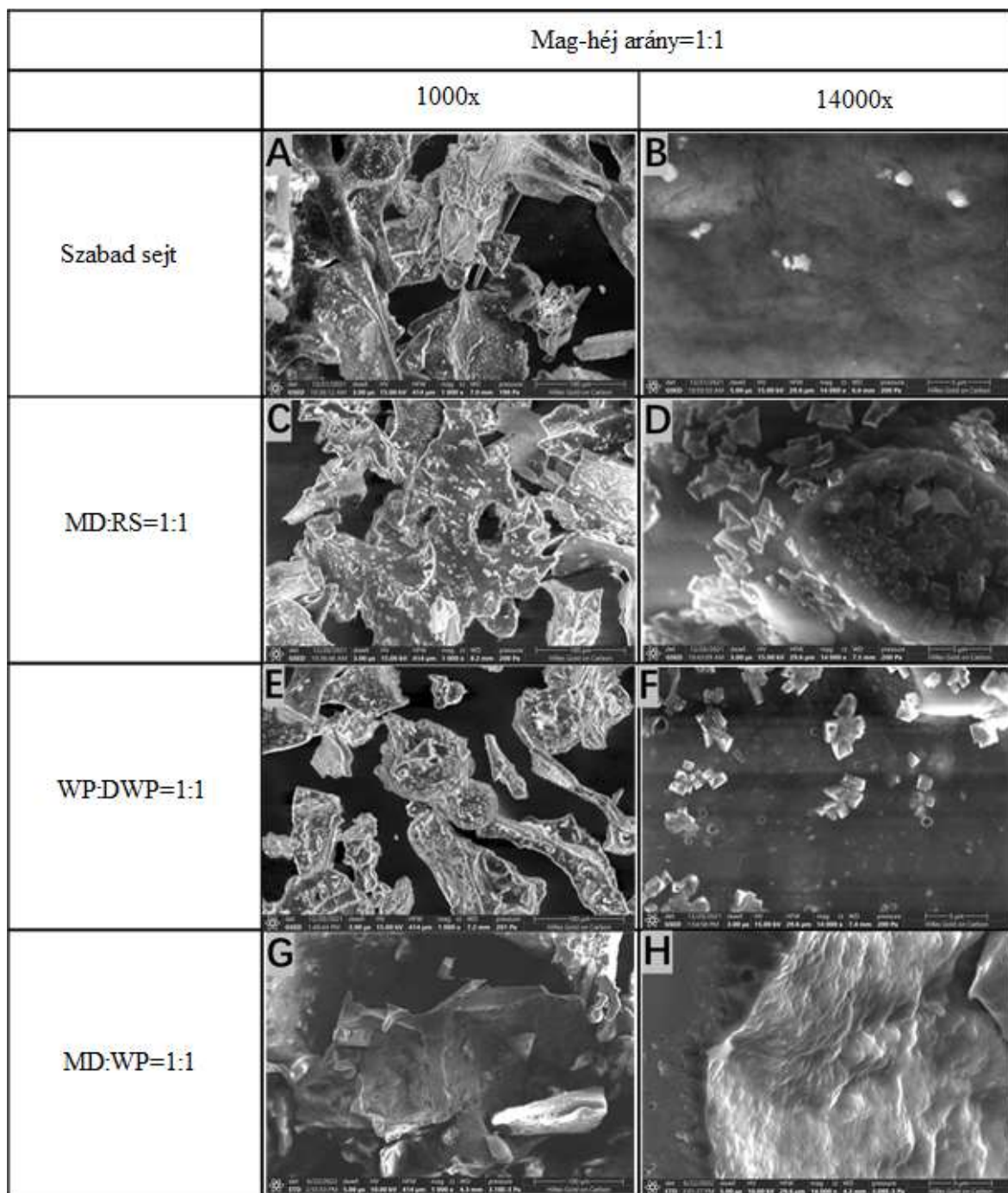
Sun és munkatársai (2022) kísérletet végeztek különböző fehérjével bevont mikrokapszulákkal, különböző mag-héj arányokkal. Az öt különböző készítmény az általam is vizsgált tejsavófehérje, valamint denaturált tejsavófehérje különböző arányú összeállításai voltak: WP; WP:DWP, 3:1; WP:DWP, 1:1; WP:DWP, 1:3; valamint DWP volt. A mag-héj arányok mindegyik készítmény esetében 1:1, valamint 1:1,5 volt. A kísérletük során a WP:DWP (1:1), 1:1,5 mag-héj arányú készítmény esetében a hozam kb. 2-4%-kal volt magasabb, mint az én kísérletemben ugyanezen készítmény 1:1 mag-héj arány készítmény hozama. Ezek alapján a különböző mag:héj arányok nem befolyásolják jelentősen a hozamot. A hozam az 1:1 mag-héj arányú WP, valamint DWP készítmények esetében alacsonyabb volt, mint az én kísérletemben együttes alkalmazásuk során kapott értékek. Ezt a hozam különbséget a fehérje komponensek önálló alkalmazás esetén a fagyasztva szárítás során bekövetkező vízveszteség okozhatta.

Rajam és Anandharamakrishnan (2015) kísérletük során frukto-oligoszachariddal (FOS), frukto-oligoszacharid + tejsavófehérje izolátummal (FOS + WPI), illetve frukto-oligoszacharid + denaturált tejsavófehérje izolátummal (FOS + DWPI) mikrokapszulázott *Lactiplantibacillus plantarum* MTCC 5422 törzset vizsgáltak. Az 1:1 mag-héj arányú készítményeknél a sűrűség a FOS, FOS + WPI, illetve FOS + DWPI esetében $0,564 \text{ g/cm}^3$, $0,434 \text{ g/cm}^3$, illetve $0,473 \text{ g/cm}^3$ volt. Az eredményekből megállapítható, hogy a denaturált tejsavófehérje növelte a sűrűséget a tejsavófehérjéhez képest, ahogyan ez az én kísérletem során is tapasztalható volt. Ez a jelenség a tejsavófehérje izolátumnak köszönhető, amely a kapszulákban üregeket okozott.

5.1.2. A kapszulák morfológiája

Az elektronmikroszkópos technikák hasznosak a baktériumokat tartalmazó és üres mikrokapszulák mérettartományáról, a mátrix mikroszerkezetéről és a mátrixban lévő baktériumok által okozott esetleges változásokról szóló információk megszerzéséhez. A hideg felületen végzett pásztázó elektronmikroszkópia (cryo-SEM) alkalmazásával lehetőség van a kapszulák szerkezetének, konfigurációjának és méreteloszlásának tanulmányozására, valamint a baktériummal és baktérium nélküli kapszulák megkülönböztetésére. A cryo-SEM, beleértve a fagyasztás-törést is, lehetővé teszi a mátrix részleteinek, valamint a hordozóanyag és a baktériumok közötti kölcsönhatás megfigyelését. (Serna-Cock, és Valleio-Castillo, 2013).

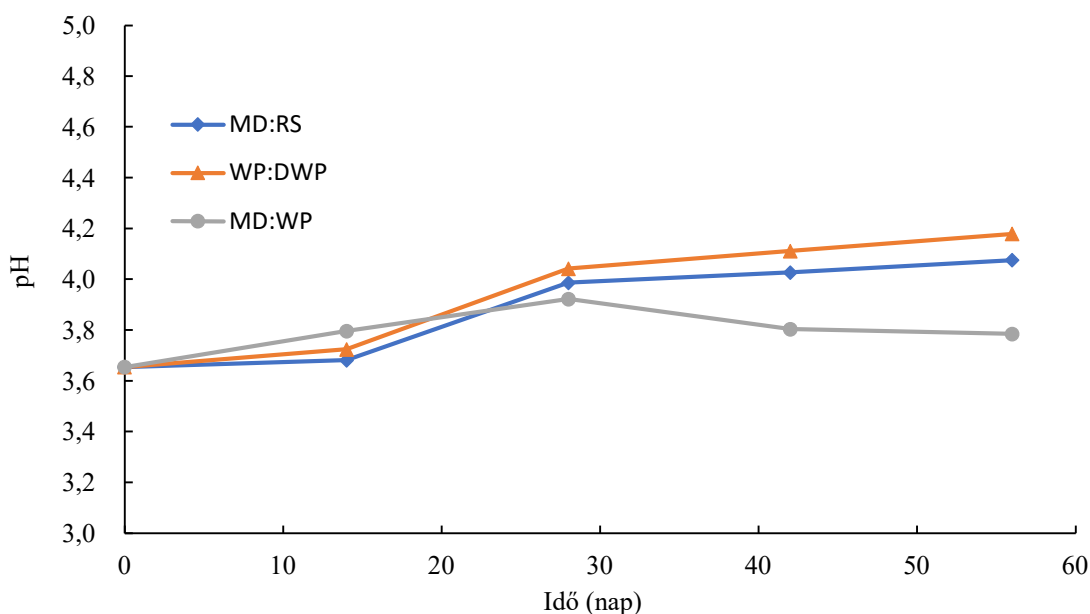
A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek részletes információkat szolgáltatnak a minta felületi topográfiájáról. A *Lp. plantarum* 299v törzs szabad sejtjeinek mikroszkópos képeit a 2. A és B ábra, mutatja. A különböző héjanyagú mikrokapszulázott *Lp. plantarum* 299v szerkezetének képeit a 2. C-H ábra, mutatja. A nagyítás, mind a szabad, mind a különböző héjanyagú sejtek esetében, 1000x-es, illetve 14000x-es volt. A szabad sejtek (2. A, B ábra) mérete kisebb, mint a mikrokapszulázott sejteké. Ez a különbség jól mutatja a bevonó anyagok védelmét a sejt túl nagy mértékű vízvesztése ellen. A sejtek mérete a citoplazma zsugorodásának eredménye, amelyet a dehidratáció okozott, míg a mikrokapszulázott sejteknél nem volt tapasztalható hasonló zsugorodás. Az ábrákon jól látható a sejtek csoportosulása, illetve 14000x-es nagyításon a sejtek pálcá alakja. Ezt a csoportosulást a liofilizálás során a víz elpárolgása eredményezheti, ami kondenzált szerkezetet eredményez. Emellett a 14000x-es nagyítás megmutatja, hogy a pálcá alakú *Lp. plantarum* 299v sejteket sikerült homogéneen mikrokapszulázni és bevonni a bevonó anyagokkal. Továbbá a mikrokapszulázott minták esetén (2. C-H ábra,) megfigyelhető, hogy a sejtek eloszlanak a bevonó anyagban, valamint a bevonó anyag felületén is jelen lehetnek. Ez azt jelenti, hogy a probiotikumok véletlenszerűen oszlanak el a felületen és a mikrokapszulák belsejében. A mintákban ezenkívül több kisebb repedés, illetve lyuk látható (2. C-F ábra.). Ezt a jelenséget okozhatta a tejsavófehérje, valamint denaturált tejsavófehérje sajátos szerkezete és egyedi tulajdonságai. De okozhatja a rezisztens keményítő is, ami miatt több keményítőszemcse is láthatóvá vált a felszínen. A Maillard-reakció termékkel bevont mikrokapszulák esetében (2. G, H ábra,) aggregálódott pehelyszerű szerkezet látható, mely a magas hőmérsékletnek, valamint a vízvesztésnek eredménye lehet. Ez a szerkezet a fehérje szerkezetében a glikoziláció okozta változásnak köszönhető, amely durva és rögös szerkezet kialakulását eredményezte. A részecskék morfológiája nagyban befolyásolja néhány fizikai tulajdonság kialakulását, például a porok sűrűségét és rehidratálhatóságát.



2. tábla: Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek a *Lp. plantarum* 299v különböző készítményeiről MD – maltodextrin, RS – rezisztens keményítő, WP – tejsavófehérje, DWP – denaturált tejsavófehérje

5.2. *Lp. plantarum*299v életképességének vizsgálata almalében 4°C-on történő tárolás során

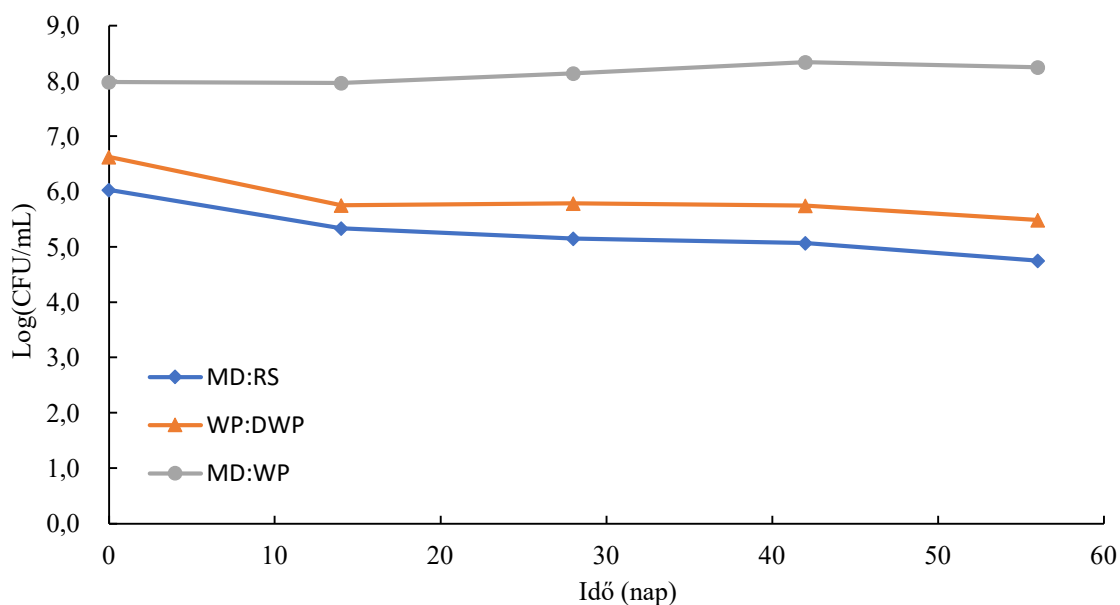
A fagyasztva szárított mikrokapszulák előállítás után dúsítással állítottam elő funkcionális probiotikum tartalmú almalevet. A dúsított almalében vizsgáltam a mikrokapszulák 4°C-on történő tárolás alatti életképességét, valamint a gyümölcsle pH változását. A szűretlen almalé kiindulási pH-ja 3,65 volt, mely érték (3. ábra) az első négy hétben mindegyik készítmény esetében növekedett.



3. ábra: *Lp. plantarum* 299v pH-ja dúsított almalében 4°C-on történő tárolás alatt különböző bevonó anyagok esetében. MD – maltodextrin, RS – rezisztens keményítő, WP – tejsavófehérje, DWP – denaturált tejsavófehérje

A negyedik héttől a nyolcadik hétig a két azonos polimerből, fehérjéből (WP:DWP), valamint szénhidrátból (MD:RS) álló kapszulázott probiotikumot tartalmazó almalé esetében további növekedés volt tapasztalható, s a kémhatás meghaladta a pH 4 értéket. A kevert összetételű (MD:WP) kapszulázó anyagot tartalmazó készítmény esetében azonban a negyedik hét után a pH csökkent. Ez a csökkenés annak köszönhető, hogy a mikroba elkezdte fermentálni az almalevet. Ez a fermentációs folyamat okozta a MD:WP kapszulázott probiotikummal dúsított almalében a legnagyobb mértékű sejtszám növekedését, ami a negyedik és a hatodik hét között történt. A *Lactiplantibacillus plantarum*

299v sejtszáma a 8 hetes tárolás alatt (4. ábra), mind a WP:DWP, mind a MD:RS mikrokapszulázott készítmény esetében csökkent az első két hét alatt.



4. ábra: *Lp. plantarum* 299v sejtszáma dúsított almalében 4°C-on történő tárolás alatt különböző bevonó anyagok esetében. MD – maltodextrin, RS – rezisztens keményítő, WP – tejsavófehérje, DWP – denaturált tejsavófehérje

A WP:DWP bevont készítmény esetében a második hét után stagnálás látható a hatodik hét végéig, majd az utolsó két hétben ismét a sejtszám kismértékű csökkenése volt megfigyelhető. A MD:RS bevont készítmény esetében a sejtszám folyamatosan csökkent, amely a második és a hatodik hét között mérséklődött, majd a hatodik és nyolcadik hét között megint az első két héthez hasonló csökkenést mutatott. Ellentétben a MD:WP bevont készítménynél, ahol a sejtszámban a 8 hét alatt nem volt tapasztalható csökkenés. A kezdeti és a tárolás végi sejtszám változás logaritmusai a MD:RS, WP:DWP, valamint MD:WP készítmények esetében, -1,28; -1,14; valamint, 0,27 volt (4. táblázat).

Ezek alapján levonható az a következtetés, hogy a MD:WP bevonó anyaggal mikrokapszulázott *Lactiplantibacillus plantarum* formuláció jobb védelmet nyújtott a *Lactiplantibacillus plantarum*-nak az almalében, mint a WP:DWP, vagy a MD:RS formulációk. A WP:DWP valamint MD:RS mikrokapszulázott készítmények közötti eltérés csekély.

4 táblázat: *Lp. plantarum* Log (N) különbsége a 0. hét és a 8. hét között dúsított almalében 4°C-on történő tárolás alatt különböző bevonó anyagok esetében.

Kapszula típus	Log (N) változás
maltodextrin: rezisztens keményítő	-1,28
tejsavófehérje: denaturált tejsavófehérje	-1,14
maltodextrin: tejsavófehérje	0,27

A 4. ábra alapján látható, hogy a MD:RS, illetve WP:DWP készítmény esetében a sejtszám ugyan lecsökkent 10^6 TKE/ml alá tárolás során, azonban ez a csökkenés csak 1 nagyságrendű volt, ami alapján levonható az a következtetés, hogyha a kiindulási sejtszámot nagyobb értékre, pl. 10^9 TKE/ml-re állítom be, akkor a bevonó anyagok képesek védelmet nyújtani a mikrokapszuláknak savas közegben legalább 2 hónapig. A MD:WP készítmény esetében a sejtszám 2 hónap után is a kiindulási 10^8 TKE/ml felett volt, nem mutatott csökkenést, vagyis a bevonó anyag képes megvédeni a probiotikumot, s megfelel a követelményeknek.. A probiotikus készítményeknél az élő sejtszám alsó határa 10^7 TKE/ml. Hogyha a sejtszám a tárolás során ezen érték felett marad, akkor a termék tejmentes probiotikus italként funkcionálhat és megfelel a növekvő keresletnek.

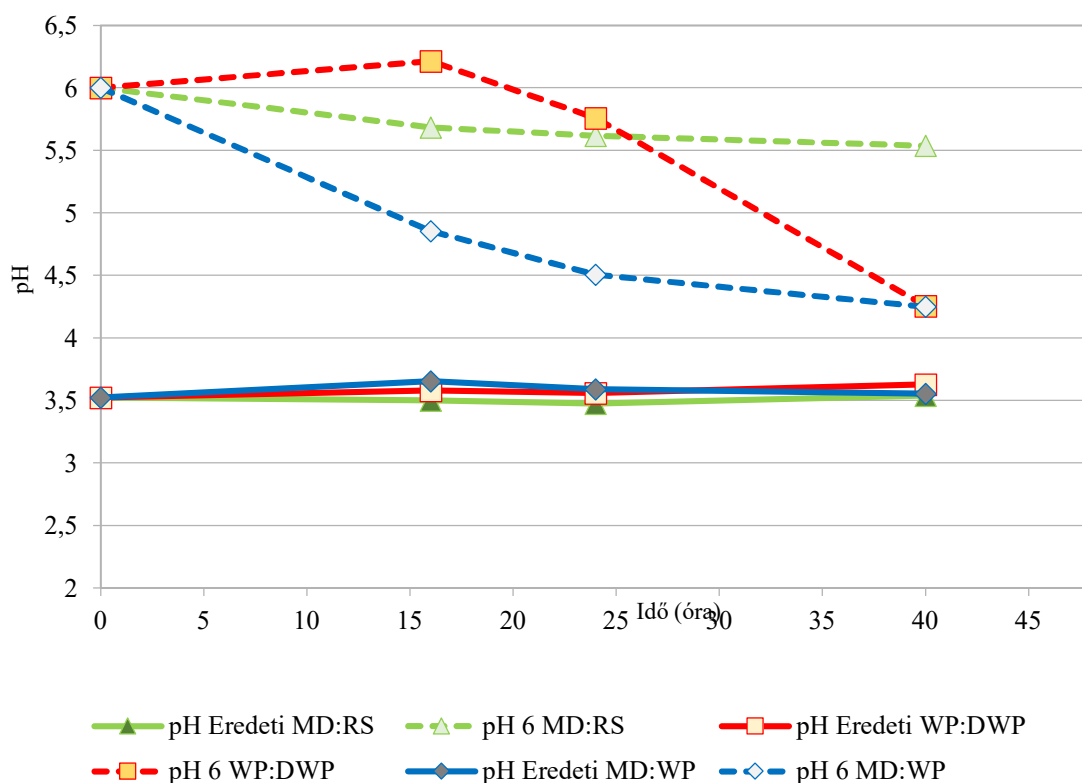
A *Lactiplantibacillus plantarum* NCIMB 8826 törzsével korábban már végeztek kísérletet almalében. Roberts és munkatársai, (2018) és szimulált gyomor- és bélrendszeri körülmények között vizsgálták a törzs életképességét. A kísérletet az én kísérletemhez hasonlóan 4°C-on történő tárolással valósították meg, mely a kísérlettel ellentétben azonban, csak 15 napig zajlott. Az almalé kiindulási kémhatása pH 5 körül volt és szabad, vagy pektinen rögzített sejteket tartalmazott. Az eredmények ebben a kísérletben nagyban hasonlítanak az általam kapott MD:WP bevonó anyaggal bevont mikrokapszulák által mutatott eredményekhez. A kísérlet során az immobilizált sejtek száma a kísérlet végére 8,05 log TKE/ml-re nőtt. A sejtszám növekedése a Maillard reakció termékekkel kapszulázott készítményem esetében is megfigyelhető volt. A pH a kísérlet alatt folyamatosan csökkent, ami betudható a sejtek szaporodásának, tehát a fermentáció megtörtént. A fehérjemátrixba történő emulziós kapszulázást eddig nem említette publikáció a probiotikumok gyümölcslevegekben való alkalmazásával kapcsolatban. További kísérletekre

van szükség a fehérje és poliszacharidok szerepének megértéséhez a probiotikumok savas pH-n való stabilitásában.

5.3. Mikro kapszulázott *Lactiplantibacillus plantarum* 299v fermentációja almalében

A szűretlen almalében 37°C-on történő fermentáció során a probiotikum szaporodásának vizsgálatához különböző anyagokkal bevont liofilezett mikro kapszulákat használtam. Vizsgáltam a kiindulási közeg pH-jának hatását a fermentációra. Az almalé eredeti pH-ja 3,52 volt, melyet a minták egyik felében a probiotikum szaporodásának kedvezőbb, pH 6 értékre állítottam a fermentációt megelőzően.

Az 5. ábra jól mutatja, hogy a pH 6-os gyümölcslében a MD:WP készítmény esetén a pH azonnal elkezd csökkenni. Ez a pH csökkenés megerősíti, hogy a fermentáció e minta esetében már az első 16 órában elkezdődött.



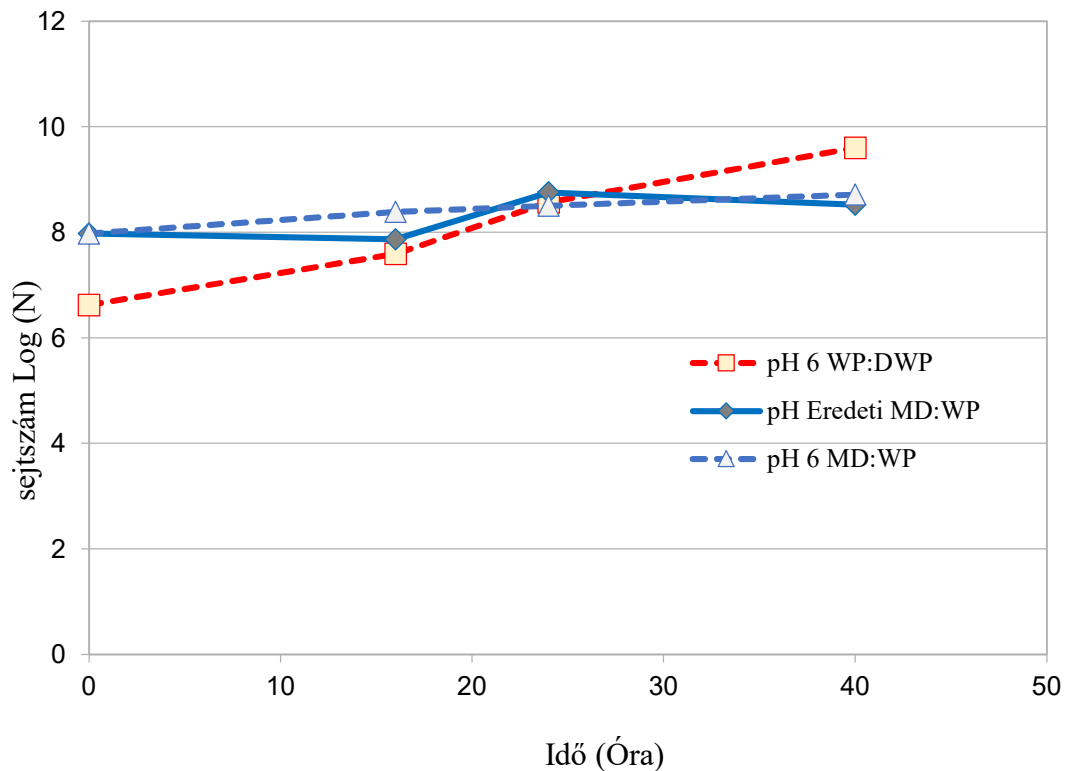
5. ábra: pH alakulása *Lp. plantarum* 299v törzsszel különböző pH-n, különböző bevonó anyagok esetében fermentált almalében. MD – maltodextrin, RS – rezisztens keményítő, WP – tejsavófehérje, DWP – denaturált tejsavófehérje

A MD:RS készítmény esetén a pH 6 értékű almalé pH-ja a 40 óra alatt nem mutatott nagy változást, a pH mindössze 0,5-öt csökkent, ami jelzi, hogy a fermentáció ennél a mintánál nem indult be. A WP:DWP pH 6-os minta pH-ja az utolsó 24 órában csökkent. Ez azt mutatja, hogy a fermentáció csak 16 óra után indult be.

A *Lp. plantarum* 299v sejt száma 37°C-on történő fermentáció alatt eltérő eredményeket mutatott a különböző készítmények esetében (6. ábra). Mind az eredeti, erősen savas, mind a pH 6-os MD:WP mintával beoltott almalé azonnal elkezdett fermentálódni. Az eredeti pH-jú minta sejt száma a 24 órát követő 16 óra alatt kis mértékben csökkent, ellentétben a pH 6 mintával, ahol a sejt szám az utolsó 16 órában is növekedést mutatott. A MD:RS készítmény esetében a 40 órás fermentációt követő sejt szám meghatározás eredményeként nem volt látható számolható mennyiségű telep. A WP:DWP készítménynél az eredeti pH-jú gyümölcslemben szintén nem volt élő sejt szám detektálható. A pH 6 WP:DWP minta sejt száma a 40 óra alatt folyamatosan növekedett, 9,6 log (TKE/ml) értékig. 24 óránál a három minta sejt száma közel azonos volt, azonban 40 óránál a MD:WP készítmény eredeti pH-jú, illetve pH 6 minta esetében a sejt szám 8,52, illetve 8,72 log(TKE/ml) volt. Ebből következik, hogy a kapszulázás megvédte a sejteket, a savas kiindulási pH esetén is hasonló szaporodást lehetett elérni, mint az optimális környezeti viszonyok között. Mivel a pH változás az összes eredeti pH-jú minta esetében hasonló volt, feltételezhető, hogy a fermentáció sikeresen lezajlott mind a poliszachariddal, mind a proteinnel bevont készítmények esetében is.

A WP:DWP készítménnyel beoltott pH 6 almalé esetében 40 óránál a sejt szám egy nagyságrenddel magasabb volt, mint a MD:WP készítmény esetében.

Mind a MD:WP, mind a pH 6 WP:DWP készítmény esetében sikeresen lezajlott a fermentációs folyamat. A legnagyobb sejt számot a pH 6-os készítmények közül WP:DWP bevont anyaggal bevont készítmény eredményezte. Az eredeti pH-jú készítmények esetében csak a MD:WP esetében volt sikeres a fermentáció. A sejt szám mindkét bevont anyag esetében 10^7 TKE/ml felett volt a 40 órás kísérlet végén.



6. ábra: *Lp. plantarum* 299v sejtszáma dúsított almalében 37°C-on történő fermentáció alatt különböző pH-n, különböző bevonó anyagok esetében MD – maltodextrin, RS – rezisztens keményítő, WP – tejsavófehérje, DWP – denaturált tejsavófehérje

Hasonló körülmények között több kutató is végzett kísérletet *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917, valamint *Lactiplantibacillus plantarum* PCS 26 törzsekkel. Li és munkatársai (2018) a *Lp. plantarum* ATCC14917 törzsszel fermentált almale antioxizáns aktivitását vizsgálták. A 72 órás fermentáció során az almale pH-ja végig csökkent. A kiindulási pH 6,2 volt, ami 24 óra elteltével 4,36-ra, 48 óra elteltével pH 3,93-ra, 72 óra elteltével pH 3,68-ra csökkent. A pH csökkenés hasonló mértéke volt megfigyelhető az én kísérletem során is a pH=6 MD:WP esetében. A csökkenés itt nem volt olyan gyors, illetve nagymértékű, ami magyarázható azzal, hogy a *Lp. plantarum* 299v mikrokapszulázva volt. A WP:DWP bevonó anyag esetében azonban a pH csökkenése megegyező volt, 16. óránál a pH 6,2 volt, ami a 40. órára pH 4,2-re csökkent. Ez ugyanúgy 2 pH értékű csökkenés 24 óra alatt, a fermentáció megkezdésétől, mint a Li és munkatársai (2018) által tapasztaltak.

Dimitrovski és munkatársai (2015) a *Lactiplantibacillus plantarum* PCS 26 törzsszel fermentáltak almalevet szabad sejtekkel 35 óráig. Az almale kezdeti kémhatását pH 3,5; pH 4,2 és pH 5,1 értékre állították. A 3,5 kezdeti pH esetében a pH a 35 óra alatt nem változott, hasonlóan az én kísérletemben a MD:RS, valamint a WP:DWP eredeti pH-jú minták

esetében. Dimitrovski és munkatársai (2015) kísérletében a sejtszám a pH 3,5 esetében nem növekedett, ellentétben az én kísérletemnél a MD:WP készítménnyel. Ezt a különbséget okozhatta a MD:WP bevonat, mely megvédte a *Lp. plantarum* 299v törzset, ami lehetővé tette, hogy a törzs szaporodni tudjon, míg Dimitrovski és munkatársai (2015) szabad sejteket alkalmaztak, mely nem volt védve a savas pH-tól.

Sályi Gábor Szakdolgozat

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A probiotikumok megfelelő mennyiségben adagolva egészségügyi előnyöket biztosítanak a gazdaszervezet számára. A legtöbb probiotikus élelmiszer tejtermék alapú, de a növényi alapú mátrixok, például a gyümölcslevek is nagyon jó hordozóként szolgálnak a probiotikus sejtek bejuttatására. Természetes tulajdonságaik miatt friss, tápláló és betegségmegelőző élelmiszereknek számítanak, ezért a gyümölcslevek világszerte népszerűek és kedveltek a fogyasztók körében. A gyártás, tárolás és emésztés során számos tényező, például az oxigénszint, a magas hőmérséklet és az alacsony pH befolyásolhatja a probiotikumok életképességét és működőképességét. A mikrokapszulázási technológia ígéretes megoldást kínál a probiotikumok védelmére. A védelem hatékonyságát számos tényező befolyásolja, többek között a bevonó anyag típusa és jellemzői. Emellett cél volt a probiotikus mikrokapszulák alkalmazási lehetőségeinek feltárása.

A kísérlet során vizsgáltam a *Lp. plantarum* 299v törzs három különböző bevonó anyaggal történő mikrokapszulázásának hozamát, a kapszulák sűrűségét, valamint morfológiáját. Emellett kísérletet végeztem mikrokapszulázott baktériummal dúsított almalével. Az almalében megállapítottam a tárolás során a pH változást, valamint a kapszulák életképességét.

A pásztázó elektronmikroszkópia a morfológia megállapítása érdekében történt. A pálca alakú *Lp. plantarum* 299v sejtek mikrokapszulázása sikeres volt.

A legnagyobb sejtszám a kísérletem során a 4°C-on történő tárolás esetében a Maillard-reakció termék bevonó anyag esetében 8,33 log (TKE/ml) volt. A poliszacharid, illetve fehérje bevonó anyagoknál a kiindulási sejtszám volt a legmagasabb, 6,03 log (TKE/ml), illetve 6,62 log (TKE/ml). A hozam poliszachariddal, fehérjével, illetve Maillard-reakció termékkel bevont mikrokapszulák esetében 57,18%, 59,76%, illetve 55,79% volt. A fermentációs kísérlet során a fermentáció a fehérje, illetve Maillard-reakció termék bevonó anyagok esetében sikeresen lezajlott, a legmagasabb sejtszám 9,60 log (TKE/ml), illetve 8,72 log (TKE/ml) volt, a pH 6 kiindulási pH-jú almalé esetében. Az eredeti pH-jú almalevek fermentációja során a Maillard-reakció termék bevonó anyaggal kapszulázott probiotikum eredményezte a legnagyobb sejtszámot, mely 8,76 log (TKE/ml) volt.

A szakdolgozatomban a *Lp. plantarum* 299v törzs három különböző bevonó anyagokkal történt mikrokapszulázását tanulmányoztam funkcionális élelmiszerekben történő

alkalmazása céljából. A mikrokapszulák bevonása a három különböző bevonó anyaggal, poliszacharid, fehérje, illetve Maillard-reakció termékkel, sikeres volt. A bevonó anyag befolyásolta a hozamot, sűrűséget, valamint az életképességet. A három bevonó anyag közül a Maillard-reakció termék bizonyult a legjobbnak, mivel ez a bevonó anyag biztosította a legjobb életképességet az almalében tárolás során, valamint a fermentáció esetén is megfelelő védelmet nyújtott savas közegben.

Összességében ezek a kísérletek értékes eredményeket szolgálnak a hatékony probiotikus mikrokapszulák kifejlesztésébe, melyek széleskörű alkalmazási lehetőséggel rendelkeznek az élelmiszerek dúsításában.

A jövőbeni kutatások értékesek lehetnek a mikrokapszulázás optimalizálására különböző bevonó anyagokkal, valamint a probiotikus készítmények életképességére különböző gyümölcslevelekben.

Sályi Gábor Szakdolgozat

7. IRODALMI HIVATKOZÁS

Abbaszadeh, S., Gandomi, H., Misaghi, A., Bokaei, S., & Noori, N. (2014). The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2210-2216. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6541>

Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2015). Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. *Dairy Science & Technology*, 95, 393-412. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0223-8>

Avila-Reyes, S. V., Garcia-Suarez, F. J., Jiménez, M. T., San Martín-Gonzalez, M. F., & Bello-Perez, L. A. (2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*, 102, 423-430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.033>

Barbosa, J., & Teixeira, P. (2017). Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. *Food Reviews International*, 33(4), 335-358. DOI: [doi:10.1080/87559129.2016.1175016](https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175016)

Bhagwat, A., Bhushette, P., & Annapure, U. S. (2020). Spray drying studies of probiotic Enterococcus strains encapsulated with whey protein and maltodextrin. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1), 1-8. <https://bjbas.springeropen.com/articles/10.1186/s43088-020-00061-z>

Cal, K., & Sollohub, K. (2010). Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(2), 575-586. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.21886>

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2003). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Le Lait*, 83(3), 203-210. <https://doi.org/10.1051/lait:2003010>

Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1024-1039. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x>

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

Dimitrovski, D., Velickova, E., Langerholc, T. & Winkelhausen, E. (2015). Apple juice as a medium for fermentation by the probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* PCS 26 strain. *Ann Microbiol* **65**, 2161–2170. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1056-7>

Ding, W. K., & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15(2), 219-232.

Doherty, S. B., Auty, M. A., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Brodtkorb, A. (2012). Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. *Journal of Microencapsulation*, 29(8), 713-728. DOI: <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.638994>

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1), 306-312. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020>

Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 365-371. DOI: [doi:10.1016/j.lwt.2016.01.064](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.064)

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

- Henry, C. J. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(7), 657-659. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.101>
- Horáčková, Š., Rokytová, K., Bialasová, K., Klojdová, I., & Sluková, M. (2018). Fruit juices with probiotics—new type of functional foods. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(4), 284-288. DOI: [doi:10.17221/39/2018-cjfs](https://doi.org/10.17221/39/2018-cjfs)
- Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lü, F., & Bie, X. (2006). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 55-61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0041-8>
- Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 1-17. DOI: [doi:10.1016/j.tifs.2017.02.007](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007)
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A., & Jalaludin, S. (1998). Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 70(3), 197-209. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00080-1)
- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., & Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 15-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.59.1.15-20.1993>
- Johansson, M. L., Nobaek, S., Berggren, A., Nyman, M., Björck, I., Ahrne, S., ... & Molin, G. (1998). Survival of *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 29-38. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00055-5)
- Kaur, S., Das, M. Functional foods: An overview. *Food Sci Biotechnol* 20, 861 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0121-7>
- Kaźmierczak-Siedlecka, K., Daca, A., Folwarski, M., Witkowski, J. M., Bryl, E., & Makarewicz, W. (2020). The role of *Lactiplantibacillus plantarum* 299v in supporting

treatment of selected diseases. *Central European Journal of Immunology*, 45(4), 488-493. DOI: <https://doi.org/10.5114/ceji.2020.101515>

Khoramnia, A., Abdullah, N., Liew, S. L., Sieo, C. C., Ramasamy, K., & Ho, Y. W. (2011). Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Animal Science Journal*, 82(1), 127-135. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00804.x>

Kowalska, E., Ziarno, M., Ekielski, A., & Żelaziński, T. (2022). Materials used for the microencapsulation of probiotic bacteria in the food industry. *Molecules*, 27(10), 3321. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27103321>

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737-743. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.01.004>

Li, Z., Teng, J., Lyu, Y., Hu, X., Zhao, Y., & Wang, M. (2018). Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules*, 24(1), 51. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24010051>

Luckow, T., & Delahunty, C. (2004). Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference*, 15(7-8), 751-759. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2003.12.007>

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15-25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>

Nag, A., & Das, S. (2013). Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 170-177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.001>

Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53(1), 304-311. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.019>

- Olivares, A., Soto, C., Caballero, E., & Altamirano, C. (2019). Survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* (prepared by vibration technology) in fruit juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 42, 42-48. DOI: [doi:10.1016/j.ejbt.2019.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.002)
- Ortakci, F. A. T. İ. H., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6918-6925. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5710>
- Parikh, A., Agarwal, S., & Raut, K. (2014). A review on applications of maltodextrin in pharmaceutical industry. *System*, 4(6).
- Perricone, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2014). Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. *Journal of Functional Foods*, 10, 421-426. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.020>
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>
- Raigond, P., Ezekiel, R., & Raigond, B. (2015). Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1968-1978. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsf.6966>
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>
- Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 50-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.036>
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 830S-837S. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S>

- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1682S-1687S. DOI: [doi:10.1093/ajcn/71.6.1682s](https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1682s)
- Roberts, D., Reyes, V., Bonilla, F., Dzandu, B., Liu, C., Chouljenko, A., & Sathivel, S. (2018). Viability of *Lactiplantibacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. *LWT*, 97, 144-150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.036>
- Rodrigues, D., Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, M. H., Rocha-Santos, P. & Freitas, A. C. (2012). Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2748-2757. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0581-z>
- Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231, 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1246-2>
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., & Mättö, J. (2006). Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 171-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.019>
- Serna-Cock, L., & Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4743-4753.
- Sun, W., Nguyen, Q. D., Sipiczki, G., Ziane, S. R., Hristovski, K., Friedrich, L., Visy, A., Hitka, G., Gere, A., Bujna, E. (2022). Microencapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* 299v Strain with Whey Proteins by Lyophilization and Its Application in Production of Probiotic Apple Juices. *Applied Sciences*, 13(1), 318. DOI: <https://doi.org/10.3390/app13010318>
- Sun, W., Nguyen, Q. D., Süli, B. K., Alarawi, F., Szécsi, A., Gupta, V. K., Friedrich, L. F., Gere, A., Bujna, E. (2023). Microencapsulation and Application of Probiotic Bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* 299v Strain. *Microorganisms*, 11(4), 947. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040947>

Swinbanks, D., O'Brien, J. Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature* **364**, 180 (1993). DOI: <https://doi.org/10.1038/364180a0>

Tao, T., Ding, Z., Hou, D., Prakash, S., Zhao, Y., Fan, Z., Zhang, D., Wang, Z., Liu, M., Han, J. (2019). Influence of polysaccharide as co-encapsulant on powder characteristics, survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 by spray drying. *Journal of Food Engineering*, **252**, 10-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.009>

Tsen, J. H., Lin, Y. P., & King, V. A. E. (2004). Fermentation of banana media by using κ -carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, **91**(2), 215-220. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00376-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00376-3)

Tuorila, H., & Cardello, A. V. (2002). Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Quality and Preference*, **13**(7-8), 561-569. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00076-3)

Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*, **5**(1), 98-105. DOI: [doi:10.1016/j.jff.2012.08.009](https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.009)

Zhao, M., Wang, Y., Huang, X., Gaenzle, M., Wu, Z., Nishinari, K., Yang, N., Fang, Y. (2018). Ambient storage of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* ST-III by complex coacervation of type-A gelatin and gum arabic. *Food & Function*, **9**(2), 1000-1008. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7FO01802A>

Internet 1:

<https://www.statista.com/statistics/1196260/japan-number-foshu-products/>

Internet 2:

Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO 340 working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 341 (2002). <http://www.fermented-foods.net/>

Internet 3:

Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=1590>

Sályi Gábor Szakdolgozat

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni mindenkinek, aki valamilyen módon segítségemre volt a szakdolgozat elkészítése alatt.

Elsősorban konzulensemnek, Dr. Bujna Erika egyetemi docensnek, aki szakdolgozatom készítése alatt fáradhatatlanul és őszintén segítette munkámat. Aki szakmai tudásával és tanácsaival nagyban segítette munkám sikerességét.

Emellett szeretném megköszönni Sun Weizhe PhD hallgatónak, akinek segítsége és útmutatása szintén nagyban hozzájárult dolgozatom megírásához.

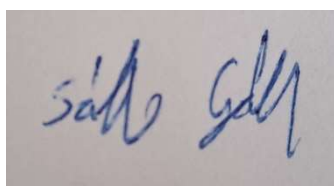
Végül szeretném megköszönni családom, párom és barátaim biztatását és támogatását az egyetemi éveim alatt.

Sályi Gábor Szakdolgozat

Szerzői nyilatkozat

Alulírott **Sályi Gábor** Biomérnöki szakos, nappali tagozatos hallgató kijelentem, hogy a *Lactiplantibacillus plantarum 299v kapszulázása és életképességének vizsgálata* almalében című szakdolgozat a saját munkám eredménye. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

Budapest, 2023. 05. 03



a hallgató aláírása

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Sályi Gábor

A Hallgató Neptun kódja: EU9NZV

A dolgozat címe: *Lactiplantibacillus plantarum* 299v kapszulázása és életképességének vizsgálata almalében

A megjelenés éve: 2023

A konzulens tanszék neve: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

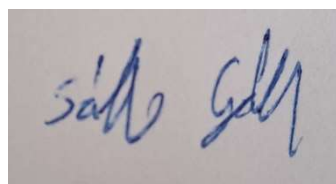
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023 év 05 hó 03 nap



Hallgató aláírása

**KONZULTÁCIÓS
NYILATKOZAT**

Sályi Gábor (Neptun azonosítója: EU9NZV) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2023. május 3.


Belső konzulens

Sályi Gábor Szakdolgozó