



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**KÜLÖNBÖZŐ KAPSZULÁZÁSI TECHNIKÁK TANULMÁNYOZÁSA
PROBIOTIKUMOT TARTALMAZÓ TERMÉKEK FUNKCIONÁLIS
TULAJDONSÁGAINAK MEGŐRZÉSÉRE**

Ta Phuong Linh

Doktori értekezés tézisei

Budapest

2021

A doktori iskola

Megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola
Tudományága: Élelmiszertudományok
Vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Livia**
egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Témavezetők: **Dr. Bujna Erika**
egyetemi docens, PhD
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék
Dr. Kun Szilárd
egyetemi docens, PhD
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

A doktori iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

1 MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban jelentős igény mutatkozik olyan élelmiszerek iránt, amelyek hozzájárulhatnak az egészségünk és az általános jólétünk fenntartásához. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a probiotikumokat tartalmazó élelmiszerek fogyasztása számos jótékony hatást nyújthat az emberi egészségre nézve, és ennek köszönhetően ezen élelmiszerek a nemzetközi kereskedelmi forgalomban is egyre nagyobb teret kapnak. A jelenlegi választékot tekintve, elsősorban a különböző tejipari termékek szolgálnak a probiotikumok számára elsődleges és hagyományos hordozóként. A laktózérzékenységben, a tejfehérje-allergiában, és a hiperkoleszterinémiában szenvedők, valamint a vegán és zsírszegény étrendet követők azonban a tej helyett, inkább a növényi alapú termékeket részesítik előnyben. Megfelelő növényi alapú probiotikus termékek fejlesztése azonban számos kihívást jelent az élelmiszeripar számára, hiszen a probiotikumok különféle, kedvezőtlen környezeti hatásokkal szembesülhetnek az adott élelmiszer gyártása (pl. hőkezelés), az élelmiszer tárolása (pl. egyes növényi élelmiszerek savas közege) és a gyomor- és bélrendszerben az emésztés (pl. erős gyomorsav, epesav) során is, mely által drasztikusan veszíthetnek életképességükből és így a jótékony hatásuk sem tud érvényesülni. Ez pedig megkérdőjelezheti az adott termékeknek az ígért probiotikus hatását is.

Ehhez a problémához egy ígéretes megoldást jelenthet a mikrokapszulázási technológia, mellyel a probiotikumok egy pontenciálisan védő polimer mátrixba zárhatók vagy polimer réteggel bevonhatók, ezáltal pedig a probiotikumok életképessége megvédhető a különböző számukra káros közegektől és így a gyomor- és béltraktus célhelyeire történő eljuttatásuk is hatékonyabb lehet. Az eddigi tanulmányok alapján számos különféle probiotikumot hordozó rendszert (vagy kapszulát) már kifejlesztettek és tanulmányoztak. A fő hátránya ezeknek a hordozó rendszereknek azonban, hogy élelmiszer és kereskedelmi célú alkalmazásuk még limitált, figyelembe véve többek között a körülményes ipari léptékben való előállíthatóságukat, az élelmiszertermékbe való bekeveréshez nem optimális nagy méretüket, vagy a nem megfelelő probiotikum-védő képességüket az erős savas hatásoktól szemben. Továbbá kevés tanulmány született eddig a probiotikumot hordozó kapszuláknak növényi élelmiszertermékben való vizsgálatáról.

Végül, de nem utolsósorban, a kapszulák gasztrointesztinális traktusra specifikus mukoadhéziós tulajdonságáról sem áll rendelkezésre kellő információ, amely szintén fontos szempont lehet a kapszulázott probiotikumok terápiás hatásának kiváltásához szükséges célhelyre történő hatékonyabb hordozásukhoz és elegendő idejű felszabadulásukhoz.

Mindezekből kifolyólag a doktori munkám célja, a legígéretesebb kapszulázási anyagok és technikák megtalálása olyan probiotikumot hordozó rendszerek (vagy kapszulák) kifejlesztéséhez, amelyek hatékonyak a probiotikumok védelmében és gasztrointesztinális traktusba történő célzott hordozásukban, ugyanakkor élelmiszeripari és kereskedelmi (fogyasztói) célra is jól adaptálhatóak. Mindezek által pedig hozzájáruljak új probiotikus, nem tejalapú termékek kifejlesztéséhez. Ennek érdekében a doktori kutatómunkám során az alábbi részfeladatokat tűztem ki célul:

- Különböző probiotikumot hordozó kapszula rendszerek előállítása különböző kapszulázási anyagok alkalmazásával, beleértve a prebiotikumokat, mint például a rezisztens keményítő, a laktulóz és a laktoszukróz; hidrokolloidok, mint például az alginát, gellángumi, a xantángumi, a κ -karragén, a szentjánoskenyérmag-liszt, a karboximetil-cellulóz és a kitozán. Ezek mellett a sejtet hordozó alginát kapszulák kitozánnal, illetve DEAE Sephadex-szel történő bevonását is kívántam megvalósítani.
- Különböző technikák alkalmazása és tanulmányozása probiotikumok kapszulázásához, beleértve a két ismertebb technikát: az extrúziós és az emulzifikációs (externális gélképzésen alapuló) technikát; valamint a két, probiotikum kapszulázása terén még új módszereket is: az elektroporlasztás és a polielektrolit rétegenkénti önrendeződéses adszorpciót.
- A különféle módon kialakított probiotikumot hordozó kapszulák sejtvédő és -hordozó hatékonyságának vizsgálata és összehasonlítása az alábbi fizikai és fiziológiai szempontok alapján:
 - Kapszula mérete és méreteloszlása
 - Probiotikum kapszulázási hatékonysága
 - A kapszulázott probiotikus sejtek toleranciája *in vitro* gyomor és/vagy bélrendszeri körülmények között.
 - A kapszulázott probiotikus sejtek toleranciája *in vitro* statikus emésztési körülmények között az Infogest-féle protokoll alapján.
 - A kapszulázott probiotikus sejtek hőtűrése.
 - A kapszulázott probiotikus sejtek hosszú távú tárolási stabilitása és metabolikus aktivitása különböző kereskedelmi forgalomban lévő növényi alapú italokban és különböző hőmérsékleteken.
 - Kapszulázott probiotikumok a fent említett stressz hatásokkal szembeni toleranciájának összehasonlítása a nem kapszulázott probiotikumokéval.
 - A kapszulák gasztrointesztinális nyálkahártyára specifikus mukoadhéziós képessége.
- A kapszulázás hatásának összehasonlítása probiotikus *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek fiziológiai tulajdonságai tekintetében.

2 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 ALKALMAZOTT MIKROORGANIZMUSOK

Kapszulázási munkám során *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus plantarum* NCDO 1752 és *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzset alkalmaztam, mint modell bekapcsolandó és vizsgálandó probiotikus törzsként. A *Lactobacillus casei* 01 és a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzsek DVS (Direct Vat Set) kultúra formájában a Chr. Hansen cégtől, míg a *Lactobacillus plantarum* NCDO 1752 törzs a readingi egyetem törzsgyűjteményéből származott.

2.2 ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS OLDATOK

2.2.1 Alkalmazott tápközegek

L. casei 01 és *L. plantarum* NCDO 1752 törzs tenyésztéséhez és fenntartásához **MRS** (de Man Rogosa Sharpe), míg *B. lactis* Bb-12 törzs esetében **TPY** (Trypticase Phytone Yeast extract) tápközeget alkalmaztam (De Man et al., 1960; Scardovi, 1981). A szilárd tápközegek készítéséhez **15 g/L bakteorológiai agart** (Sigma Aldrich) alkalmaztam. Minden – folyadék és szilárd – tápközeget felhasználásuk előtt 121°C-on 15 percig autoklávban sterilizáltam.

2.2.2 Alkalmazott anyagok a probiotikumok kapszulázására

Probiotikumok kapszulázásához különböző szénhidrátokat alkalmaztam, nevezetesen **nátrium-alginátot** (alginsavat), **gellángumit**, **xantángumit**, **κ-karragenátot**, **szentjánoskenyér-mag-lisztet**, **kitozánt**, **karboxilmetil-cellulózt** (Sigma Aldrich), **rezisztens keményítőt** (National Starch Food Innovation, UK), **laktulózt** (PanReac AppliChem, Germany), **laktoszukróz LS40L és LS55L-t** (Ensuiko Sugar Refining Co., Japan) és **DEAE Sephadex A50-et** (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden).

2.2.3 Alkalmazott növényi élelmiszer alapú tápközegek

A probiotikumok tárolási stabilitás vizsgálatához kereskedelemben is kapható **cékla-** (Steinberger) és **zabitalokat** (enerBio) használtam, mint növényi alapú tápközegeket. Az élelmiszerek kiválasztásánál figyelembe vettem a magas növényi alapanyag és az alacsony antimikrobiális anyag tartalmát is. Tekintve, hogy a fent említett növényi alapú italok pasztörözésen esnek át a kereskedelmi forgalomba kerülésük előtt, így további csíramentesítési folyamatot nem alkalmaztam felhasználásuk előtt.

2.2.4 Egyéb alkalmazott oldatok

Az élő sejtszám meghatározása során a hígítási sor készítéséhez **0,85 % (m/V) fiziológiás sóoldatot**; a kapszulázott / kapszulázatlan baktériumok szuszpendálásához és tárolásához **0,1 % (m/V) peptonvizet** vagy **PBS puffert** alkalmaztam; a kapszulák feloldásához és ezáltal a sejtek felszabadításához **0,1 M foszfát puffert** használtam, amelynek pH értéke szükségszerűen a feloldandó kapszula anyagától függően pH 6,8 és 7,5 volt. Ezen oldatokat a felhasználásuk előtt 15 perces 121°C-on történő autoklávozásnak vettem alá.

2.3 ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A probiotikumok kapszulázását és az ehhez kapcsolódó mikrobiológiai vizsgálatokat aseptikus körülmények között végeztem el.

2.3.1 Tenyésztési módszerek, körülmények

A *L. casei* 01 és *L. plantarum* NCDO 1752 felszaporításához a MRS táplevesben való inkubációt alkalmaztam **37°C-on 16-24 óráig**. *B. lactis* Bb-12 felszaporítása esetében **TPY** táplevesben történő anaerob inkubálást alkalmaztam **37°C-on 24-72 óráig**.

2.3.2 Élő sejtszám meghatározás

Élő sejtszám meghatározáshoz (TKE/g vagy mL-ben) **hagyományos módszereket, tizedelő hígítás követő** lemezöntést (Sanders, 2012), vagy felszíni cseppentést (Miles et al., 1938) alkalmaztam. A kapszulázott sejtek élő számának meghatározása érdekében előzetesen 0,1 M foszfát pufferben történő **kapszulafeloldást** (kb. 15 - 60 percig) és ezáltal **sejtfelszabadítást** alkalmaztam.

2.3.3 Alkalmazott kapszulázási technikák

Minden kapszulázási folyamat előtt, a felszaporított baktérium sejt kultúrákat lecentrifugáltam (10 000 fordulat/perc), 4°C-on 10 percig, ezt követően a tápleves maradványok eltávolításához a kapott sejt pelletet kétszeresen kimostam, majd visszaszuszpendáltam 0,1 % (m/V) peptonvízben (vagy PBS pufferben).

A probiotikumok kapszulázásához **ionos gélképzésen alapuló extrúziós** (Krasaekoopt et al., 2004) és **emulzifikációs** (Sheu & Marshall, 1993), a **nanokompozit film adszorpciós** (Diaspro et al., 2002) és **az elektro-porlasztásos technikákat** alkalmaztam. A *nanokompozit rétegenkénti önrendeződes adszorpciós* módszerrel történő kapszulázás során **váltakozva ellentétes töltésű kitozán és karboximetil-cellulóz réteget vittem fel egymás után** a sejtek felületére. Az *elektro-*

porlasztáson alapuló probiotikum-kapszulázáshoz a kereskedelmi forgalomban is beszerezhető **Spraybase® berendezést** használtam (Avectas Ltd., Írország).

A kapszulák *polimerrel történő bevonásához* **elektrosztatikus vonzás kölcsönhatás elvét** használtam fel, mely során az alkalmazott töltött polimer ionosan önrendeződik az ellentétes töltésű anyagból álló kapszula felületére. Az anionos alginát kapszulák kationos kitozánnal, illetve DEAE Sephadex A50-nel történő bevonásához szintén a Krasaekoopt és mtársai (2004) által leírt módszert alkalmaztam kis módosításokkal.

2.3.4 Kapszulák fizikai vizsgálatához alkalmazott módszerek

A kapott kapszulák külső és morfológiai vizsgálatát **inverz**, illetve **fluoreszcens mikroszkópon** végeztem el. A kapszulák méretének és méret megoszlásának meghatározását **digitális tolómérővel** vagy **lézer diffraktometriás módszerrel** (Metasizer 3000 instrument, Malvern, Egyesült Királyság) végeztem el. Az állományméréseket **Brookfield LFRA 4500 állománymérő műszer** segítségével valósítottam meg, amely során két különféle mérési módszert alkalmaztam a kapszulák rugalmasságának és mechanikai erejének feltérképezéséhez, nevezetesen a repedés nélküli, illetve a repedéssel járó mérést. A kapszulák bioszövet nyálkahártyára irányuló **mukoadhéziós képességét *in vitro* fluoreszcens detektáláson alapuló retenciós (átfolytatásos) teszttel** vizsgáltam, amelyhez módosítottam a korábbi tanulmányokban (Cook et al., 2018; Kaldybekov et al., 2018; Porfiriyeva et al., 2019) már alkalmazott hagyományos eljárást. Ezen mukoadhéziós képesség vizsgálatom során az *ex vivo* sertés gyomorszövet szolgálta a vizsgálandó nyálkahártya membránt. A kapszulák ezen gyomor nyálkahártyán való mukoadhéziós képességét a folyamatos lemosással szembeni retenciós mértékének időbeli alakulása szerint határoztam meg, amelynek érdekében a fluoreszcens jelölésük intenzitásának rendszeres időközönkénti mikroszkópos nyomonkövetését és képrögzítését végeztem el. Az általam elvégzett retenciós teszt esetében a retenciós arányt a hagyományosan alkalmazott fluoreszcens mikroszkóp helyett **videókamerás hordozható mikroszkóp** segítségével (1080P 1000X Zoom HD 8LED Digital USB Microscope Magnifier Endoscope Video Camera) monitoroztam. Ebben az esetben is a Wizwon UV zseblámpát alkalmaztam a fluoreszcensen jelölt kapszulák detektálására. A kapszulák lemosásának megfigyelése és rögzítése AmCap (ver. 9.0) kép és videó rögzítő szoftver segítségével történt. A mukoadhéziós képesség vizsgálatot egy saját felépítésű kísérleti rendszerrel valósítottam meg 37°C-on és besötétített inkubátoron belül. Ezen kísérletet háromszor ismételtam meg.

2.3.5 Kapszulázott sejtek fiziológiai tulajdonságának meghatározásához alkalmazott módszerek

A kapszulázási hatékonyságokat az alábbi képlettel határoztam meg (Haghshenas et al., 2015):

$$\text{Kapszulázási hatékonyság (\%)} = \frac{\log_{10}(N)}{\log_{10}(N_0)} \cdot 100$$

, ahol N a sikeresen bekapszulázott élő sejtek számát, míg N_0 az összes kezdeti (kapszulázandó) élő sejtek számát jelöli.

A szimulált gyomor- és vékonybél közeggel szembeni tolerancia vizsgálatokat **Krasaekoopt et al. (2004) módszere** szerint végeztem el, kis módosításokkal.

A szimulált emésztési kísérlet az **Infogest** nemzetközi konszenzus által kidolgozott **statikus *in vitro* emésztési protokollja** (Minekus et al., 2014) alapján történt, amely harmonizálja más tanulmányokban alkalmazott *in vitro* emésztési protokollokat és egyben valósághűbben szimulálja a humán emésztési nedvekre jellemző összetettebb enzim és elektrolit tartalmat.

A hőtűrési vizsgálatokat **60°C és 85°C-os vízfürdőben történő hőkezeléssel**, a tárolási stabilitás vizsgálatokat a **zab- és céklaitalok 4°C és 20°C-on 5 hónapon keresztül történő tárolásával** valósítottam meg.

2.3.6 Kapszulák fluoreszcens jelölése

A kapszulák fluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálatához **0,1 % (m/V) nátrium fluoreszceinnel kevertem** a vizsgálandó kapszula anyagokat, valamint a mukoadhéziós tanulmányozásuk esetében **0,1 % (m/V) fluoreszcein izotiocianát (FITC)-dextránnal** kevert alginát, illetve rezisztens keményítő-alginát alapú oldatot alkalmaztam. Kitozánt, mint polimert **FITC** festékkel jelöltem egy korábbi tanulmányban leírt módszer szerint (Cook et al., 2011). A mukoadhéziós tanulmány során vizsgált fluoreszcensen jelölt kitozán alapú kapszulákat **0,1 % (m/V) FITC-tal festett** kitozán oldatból állítottam elő.

3 EREDMÉNYEK

A probiotikumok kapszulázásával kapcsolatos kutatásaim során négyféle technikát és számos anyagot alkalmaztam és vizsgáltam meg. Az előállított kapszulák probiotikum-hordozó rendszerként való alkalmazhatóságát számos fizikai és fiziológiai jellemzőjük szerint értékeltem, melyek fontos tényezők a probiotikumot hordozó kapszulák ételbe történő alkalmazásához, a probiotikumok minél nagyobb élő sejtszámban történő fogyasztásához (legalább 6-7 log TKE/g vagy mL élő sejtszámban a probiotikus hatás kiváltásához (Yao et al., 2020)), és a probiotikumok hatékonyabb gasztrointesztinális traktusba irányuló hordozásához a különféle kedvezőtlen környezeti hatásokkal való szembesülésük során. Ennek megfelelően, a kapott probiotikumot hordozó kapszulákat jellemeztem morfológia, méret, méretmegoszlás, állomány és mukoadhezív tulajdonságai szerint is. Ezekon kívül, a kapszulák élő probiotikum-kapszulázási hatékonyságát is meghatároztam, valamint különféle tolerancia vizsgálatokat is elvégeztem szimulált gyomor- és vékonybél folyadékban, illetve magas hőmérsékleten történő kezeléssel is. Végezetül, probiotikumok tárolási stabilitását is tanulmányoztam ételtermékekben.

3.1 EXTRÚZIÓS TECHNIKÁVAL KÉPZETT PROBIOTIKUMOT HORDOZÓ KAPSZULÁK VIZSGÁLATA

A probiotikum-kapszulázási kutatásaim során extrúziós technikával gélbezártam a *L. casei* 01 törzset 9 különböző anyaggal kialakított gélkapszulákba, nevezetesen kalcium-alginátba [2 % (m/V)], prebiotikummal – rezisztens keményítővel, laktulózzal, laktoszukróz LS40L és LS55L-lel – kevert alginát kapszulákba [2 -2 % (m/V)], illetve nem alginát alapú gélkapszulákba, mint a gellán-xantán gumi [0,75 % -1 % (m/V)] és a κ -karragenát – szentjánoskenyér-mag-liszt [2 % - 1 % (m/V)] alapú gélkapszulákba is. Ezek mellett még további alginát alapú kapszulákat is előállítottam kitozánnal, illetve a DEAE Sephadex-szel való bevonással is.

Az eredményeim azt mutatták, hogy az előállított kapszulák fizikai (méret, alak, állomány), illetve probiotikum-kapszulázási és -védő képessége nagyban függött az alkalmazott kapszulázó anyagok típusától. Emellett kimutattam azt is, hogy a probiotikumokat hordozó rendszerként történő alkalmazáshoz a prebiotikumokkal kevert alginát kapszulák, különösen a rezisztens keményítővel kevert alginát kapszulák rendelkeztek optimális tulajdonságokkal, ugyanis ezen alapú kapszulák gélstruktúráját mértem a legkeményebbnek, illetve ezekkel értem el a legmagasabb kapszulázási hozamot (77 % - 79 % között), valamint a leghatékonyabb probiotikum-védelmet az *in vitro* gyomor (pH 2, pepszin hatással vagy anélkül is) és epesavas közegével szemben. Ezenfelül, a rezisztens

keményítő-alginát alapú kapszulák esetében rendkívül nagy mértékű probiotikum-védelmet tapasztaltam a összetettebb Infogest standardizált emésztési modell rendszeren (Minekus et al, 2014). Ebben az esetben csupán 1 log TKE/g nagyságrenddel csökkent a *L. casei* 01 élő sejtkoncentrációja az egymást követő szimulált szájüregi (2 perc,amiláz hatással), gyomor (120 perc,pH=3, pepszin hatással) és vékonybél (120 perc,epesó és pankreatin hatással) közegben történő kezelés végére. A kevert rezisztens keményítő-alginát alapú kapszuláknál azt is megfigyeltem, hogy ezen típusú kapszulázás jelentősen növelte a *L. casei* 01 hosszú távú életképességét savanyított (fermentált) növényi alapú ital termékekben, mint a zab- és céklaitalban, olyan mértékben, hogy hűtőtárolás nélkül is meg tudta őrizni a terápiás hatás érvényesüléséhez javasolt minimális élő sejtszámot 3-4 hónapon keresztül is (Yao et al., 2020). Fontos lehet megemlíteni azonban, hogy probiotikum-kapszulázás ezen pozitív hatását csak akkor tapasztaltam, ha a tárolást legalább 3 hónapnál tovább végeztem, mivel az első 2 hónapos tárolás során a kapszulázatlan sejtek életképessége is viszonylag magasán megmaradt. A különböző tárolási hőmérséklet hatása a baktériumok eltarthatóságára a növényi alapú termék típusától függően változott, ugyanis zabitalban tárolva csak 20°C alatt javult a baktériumok életképessége kapszulázással a nem kapszulázott sejtekéhez képest, miközben a céklalé, esetében nemcsak 20°C-on, hanem 4°C-on tárolva is megfigyelhető volt jelentős életképesség javulás a kapszulázásnak köszönhetően. Szimulált emésztés és élelmiszer-mátrixban történő tárolás után, hőkezelés hatását is megvizsgáltam a *L. casei* 01 életképességére, melynek eredményeként azt kaptam, hogy a 60°C-os hőkezelés ellen a rezisztens keményítő-alginát alapú kapszulázás már nem biztosított kiemelkedő védelmet a probiotikumok számára. , nem beszélve a 85°C-os hőkezelés ellen.

A *L. casei* 01 után, az extrúziós technikán alapuló kapszulázást sikeresen elvégeztem egy másik probiotikum, a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 törzssel is. Ebben az esetben azt tapasztaltam, hogy az utóbbi baktérium számára többnyire magasabb szintű életképesség-védelmet nyújtott ugyanezen kapszulázás azonos *in vitro* gyomor-bélrendszeri és különösen a magas hőmérsékleti (60°C) stresszhatások ellen.

3.2 EMULZIFIKÁCIÓS TECHNIKÁVAL KÉPZETT PROBIOTIKUMOT HORDOZÓ KAPSZULÁK VIZSGÁLATA

Figyelembe véve azt, hogy az extrúziós módszerrel nem kívánt nagy méretű (~ 2 – 5 mm) kapszulákat kaptam az élelmiszerbe történő bekeveréshez, a probiotikum kapszulázását tovább tanulmányoztam emulzifikációs / externális gélképzésen alapuló technikával is. Ennek eredményeként, az extrúziós kapszulázással ellentétben, sokkal kisebb méretű kapszulákat (0,8 – 10

mm tartományban) képeztem, melyek ideálisabbak az élelmiszerekbe való bekeveréshez. Azonban fény derült arra is, hogy az ezzel a technikával történő – szintén a rezisztens keményítő - alginát alapú – kapszulázással a probiotikumok tolerancia mértéke gyengébb az erős savas és magas hőmérsékletű közegekkel szemben, mint ha az extrúziós technikával kapszuláztam volna be ezeket. A savas pH közegű növényi élelmiszerekben való hosszútávú tárolási stabilitás tekintetében ugyanakkor nem volt jelentősége az eltérő technikával történő probiotikum-kapszulázásnak.

Ezt követően *B. lactis* Bb-12 törzs kapszulázására is alkalmaztam és megvizsgáltam az emulzifikáción / externális gélképzésen alapuló technikát, melynek során szintén azt tapasztaltam, hogy a bifidobaktériumok számára nagyobb mértékű védelmet nyújtott a kapszulázás a különböző környezeti stresszhatásokkal szemben, mint a laktobacillus esetében.

3.3 ELEKTRO-PORLASZTÁSSAL KÉPZETT PROBIOTIKUMOT HORDOZÓ KAPSZULÁK VIZSGÁLATA

A szilárd részecskék szemcseméretben való tömeggyártásának lehetőségét kihasználva, továbbiakban az elektro-porlasztási technikát alkalmaztam és tanulmányoztam a *L. plantarum* NCDO 1752 kapszulázása tekintetében. Ennek eredményeként a sejteket tartalmazó rezisztens keményítő-alginát oldat elektro-porlasztásával sikeresen állítottam elő egyenletes, 30-600 µm szemcse méretű és szabályosabb gömb alakú gélkapszulákat, mint az extrúziós és emulzifikációs technikával. Emellett ezzel a technikával hasonlóképpen nagy hozammal kapszuláztam be a probiotikus sejteket, mely hatékony védelmet biztosított az erős szimulált gyomorsavas közeggel szemben. Továbbá azt is megállapítottam, hogy a nemionos természetű keményítővel való keverés, bár nagy mértékű védelmet biztosított a probiotikum számára, gyengítette, - bár nem sokkal - az alginát alapú kapszulák mukoadhéziós képességét a gyomor nyálkahártyáján, amely fontos szempont lehet a hordozott probiotikum gasztrointesztinális traktuson belüli kellő idejű tartózkodásához és ezáltal a probiotikumok megfelelő idejű kapszulából való felszabadulásához. Ezt a mukoadhéziós képességet azonban a kitozánnal való bevonással sikerült jelentősen megnövelnem, tekintve, hogy a kationos természetű kitozán potenciálisan erős ionos kölcsönhatásba léphetett a nyálkahártyán lévő anionos mucin komponensekkel.

3.4 POLIELEKTROLIT ALAPÚ NANOKOMPOZIT FILM RÉTEGENKÉNTI ÖNRENDEZŐDÉSES ADSZORPCIÓVAL BEKAPSZULÁZOTT SEJTEK VIZSGÁLATA

A kapszulázási tanulmányom során elvégeztem a *L. casei* 01 kapszulázását polielektrolit alapú nanokompozit film rétegenkénti önrendeződéses adszorpciójával is (layer-by-layer self-assembly). Ehhez a kapszulázási eljáráshoz két ellentétes töltésű, pontosabban karboximetil-cellulóz (-) és kitozán (+) polielektrolitot használtam, melynek lévén az adszorpciós lépések elektrosztatikus módon valósultak meg. Ez a kapszulázási módszer abban különbözött az előző három technikától, hogy a probiotikumokat sejtenként vontam be az adott kapszulázó anyagokkal és nem több sejtet kebeleztem be egyszerre egy adott polimer (gél) mátrixba. Munkám során összesen 6 polielektrolit réteget (karboximetil-cellulóz/kitozán) sikerült felvinnem a baktériumok felületére, melynek kapcsán megfigyeltem, hogy minden egyes rétegfelvitel után a baktériumok fiziológiai aktivitása fokozatosan csökkent. Magát a védőhatást illetően megállapítottam, hogy 2 rétegű karboximetil-cellulóz/kitozán nanofilmel bevonva számottevően javult a *L. casei* 01 életképessége erős gyomor- (pH=2, pepszinnel) és epesavas körülmények között, ugyanakkor alulmaradt az extrúziós technikával és az elektro-porlasztással készített rezisztens keményítő-alginát kapszulákkal szemben.

4 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kutatási munkám során különböző kapszulázó anyagokat és kapszulázási technikákat vizsgáltam meg, olyan (mikro)kapszulák kifejlesztése céljából, amelyek képesek hatékonyan megvédeni a probiotikumokat a különféle környezeti stressz hatásoktól és alkalmasak elegendő élő sejtszámban eljuttatni a gasztrointesztinális traktus célhelyig. Ebből kifolyólag az előállított kapszulákat megvizsgáltam különböző fizikai és fiziológiai szempontok szerint.

Összességében véve az eredményeim alapján megállapítottam, hogy az elektro-porlasztási technikával, illetve a különféle vizsgált anyagok közül a prebiotikumokkal, különösen a rezisztens keményítővel történő kapszulázás biztosíthatja a legideálisabb sejthordozó rendszerek (kapszulák) kifejlesztését. E kapszulába zárva a probiotikumok életképessége megvédhető és fenntartható a terápiás hatás kiváltásához javasolt minimális 6 log TKE/g vagy mL szint felett is (Yao et al., 2020), valamint alkalmas lehet akár növényi alapú termékekben kereskedelmi célú felhasználásra is. Mindezek által ez az eredmény elősegítheti akár az új probiotikus, különösen növényi alapú termékek fejlesztését is. Fontos megemlíteni még, hogy az elektro-porlasztási technikával történő kapszulázás lehetőséget ad a probiotikumok ipari mértékű mikrokapszulázására is, és tekintve, hogy nem igényel nagy hőt, így a szintén erre a célra gyakrabban alkalmazott, hasonló elvű porlasztva szárítási technikához képest is költséghatékonyabb kapszulázást biztosít. Viszont a probiotikumok hatékonyabb célhelyre történő hordozásuk és felszabadulásuk érdekében érdemes további tanulmányozást és fejlesztést megvalósítani a keményítő-alginát alapú kapszulák mukoadhezív képessége tekintetében. Ehhez pedig egy lehetséges megoldásként javasolható a keményítő-alginát kapszulák erős mukoadhezív képességgel rendelkező kitozánnal való bevonása.

Emellett érdemes lehet további vizsgálatokat is elvégezni a probiotikumok hőűrésének növelése érdekében pl. a hordozó élelmiszer pasztörözése alatt, amennyiben ezt az alkalmazott élelmiszergyártási technológiai és/vagy probiotikus törzs megköveteli.

Végezetül javasolt a következő szempontok és területek tekintetében is további kutatásokat kivitelezni: (1) a probiotikumok keményítő-alginát mikrokapszulákból történő gyomor-bél traktus célhelyeire való felszabadulásának tanulmányozása, hiszen a felszabadult probiotikumok száma jelentősen kisebb lehet, mint az elfogyasztott mennyiségük; (2) a mikrokapszulák sejtvédő hatásának további vizsgálata *in vivo* vagy legalább egy dinamikus *in vitro* gyomor-bél modell rendszerrel (pl., SHIME, TNO), figyelembe véve azt, hogy a human emésztés fiziológiája rendkívül összetett, és nagy mértékben eltérhet az egyéntől és számos tényezőtől függően is, mint pl. az étkezés óta eltelt idő és az adott egyén életkora (Cook et al., 2012); (3) a laktoszukróz LS55L és a laktulóz, vagy akár más

típusú prebiotikumok hatásának további vizsgálata a mikrokapszulák fizikai jellemzőire és sejtvédő képességére.

5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Bizonyítottam, hogy 2% (tömeg/térfogat) rezisztens keményítő hozzáadása alginát alapú gélmátrixhoz jelentősen megnövelte az előállított mikrokapszulák fizikai stabilitását (keménységét és ruganyosságát) az alginát gél alapúakkal szemben. Ezáltal, lényegesen javult a probiotikumot védő kapszulák védőhatása statikus, szekvenciális gyomor és vékonybél (doudénum) fázist szimuláló folyadékban történő emésztéssel szemben, valamint kielégítő védelmet biztosított az élelmiszerek tápcsatorna felső szakaszát szimuláló statikus *in vitro* emésztési modellben (Infogest) is. Bizonyítottam, hogy a rezisztens keményítő-alginát gél alapú kapszulák a probiotikumok életképességét az ajánlott minimális szint felett tudják tartani (6 log TKE/ml), mely alkalmas a terápiás hatás kiváltásához.
- 2) Megállapítottam, hogy a mikrokapszulázási technika, különösen rezisztens keményítőtartalmú kapszulák esetén, hatékonyan képes fenntartani a probiotikumok hosszútávú tárolási életképességét az ajánlott, minimum 6 log TKE/ml szinten, még 3 hónapos, 20°C-on történő tárolás után is zab- vagy céklaitalok esetén. Ez a fejlesztési eredmény hozzájárulhat a szobahőmérsékleten, hosszú ideig eltartható, növényi alapú probiotikus termékek profilbővítéséhez.
- 3) A kapszulázási technikák összehasonlító vizsgálatával bizonyítottam, hogy élelmiszeripari és kereskedelmi (fogyasztói) célú alkalmazás szempontjából az elektro-porlasztásos technika a legígéretesebb módja a probiotikumok mikrokapszulázásának, mivel nem csak magas hozamú probiotikum-kapszulázást (~ 87 %) és nagy mértékű probiotikum-védelmet (a szimulált gyomor folyadék közegével szemben csupán 3,68 log TKE/ mL életképesség-vesztességet) nyújtó kapszulákat eredményez, hanem lehetővé teszi a kapszulák apróbb, mikron méretű (30 – 600 µm) részecske formákban történő előállítását is. Az ilyen mérettartományú mikrokapszulák bekeverése kedvezőbb lehet élelmiszeripari termékekbe, szemben az extrúziós technikával képzettekkel, továbbá megalapozhatja a mikrokapszulák költséghatékonyabb tömeges ipari termelését is, a nagy hőigényű porlasztva szárításos eljárásokkal szemben.
- 4) Különböző nemzetségbe tartozó probiotikus baktériumok mikrokapszulázási eljárásait (extrúziós, emulziós) összehasonlítva megállapítottam, hogy ugyanazon kapszulázási technika *Bifidobacterium lactis* Bb-12 probiotikus baktérium törzs esetében magasabb szintű életképesség-védelmet biztosít az *in vitro* gyomor-bél rendszeri közeg erős gyomor- és epesav hatásai és különösen a magas hőmérsékleti (60°C) stresszhatások ellen, mint a *Lactobacillus casei*

01 probiotikus baktérium törzs esetében. A fentiek alapján bizonyítottam, hogy a kapszulázás hatékonysága nemzetség-specifikus szinten változhat.

- 5) Mukoadhéziós elemzéshez fluoreszcens képalkotó retenciós tesztet adaptáltam, melynek hatékony alternatívájaként használható mérési rendszert építettem és teszteltem. A módosított rendszerben a retenciós arányt videókamerás hordozható mikroszkóp segítségével (1080P 1000X Zoom HD 8LED Digital USB Microscope Magnifier Endoscope Video Camera) monitoroztam, mely számos technikai és gazdasági előny jelenthet a hagyományos fluoreszkáló mikroszkópos megközelítéshez képest (pl. a vizsgált formulációk valós idejű képalkotási és megfigyelési képesség lehetőségét mikrométerű felbontásban, a szimulált lemosási folyamatról videófelvételi képességet, valamint felhasználóbarátabb és megfizethetőbb kísérlet elvégzését).
- 6) Különböző alginát alapú gélkapszulák *ex vivo* sertés gyomor nyálkahártyán történő retenciós arányának elemzésével megállapítottam, hogy a rezisztens keményítővel való keverés alig (kb. 5,8 %-os retenciós aránnyal) gyengítette az alginát kapszulák mukoadhezív tulajdonságát. Ebben az esetben körülbelül 60 %-os retenciós arányt értem el, ami az *ex vivo* sertés gyomor nyálkahártya 50 perces szimulált gyomorfoliadékos mosása után is megfigyelhető volt.

6 DOKTORI DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

FOLYÓÍRATCIKKEK

Angol nyelven

TA, L.P., BUJNA, E., KUN, S., CHARALAMPOPOULOS, D., KHUTORYANSKIY, V. V. (2021): Electrospayed mucoadhesive alginate-chitosan microcapsules for gastrointestinal delivery of probiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 597, 120342. (IF = 5.875)

TA, L. P., BUJNA, E., ANTAL, O., LADÁNYI, M., JUHÁSZ, R., SZÉCSI, A., KUN, S., SUDHEER, S., GUPTA, V.K., NGUYEN, Q.D. (2021): Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1136–1144. (IF = 6.953)

KONFERENCIA KIADVÁNYOK

Angol nyelven

TA, L. P., CHARALAMPOPOULOS, D., KHUTORYANSKIY, V.V. (2019): Electro spray-based fabrication of polymer particles and their applicability for gastrointestinal delivery of probiotics. In: Abstract Book of the Conference on Innovations in Encapsulation, p. 24 (London, Egyesült Királyság)

TA, L. P., BUJNA, E., KUN, SZ. (2018): Comparison study between external and internal gelation through emulsification technique regarding their suitability to develop micro delivery system for probiotics. In: Third International Conference on Food Science and Technology, ISBN:9789632697949 (Budapest, Magyarország)

TA, L. P., BUJNA, E., KUN, SZ. (2018): Niosome as novel potential delivery system for probiotics. In: II. Book of Abstracts of the Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Budapest, Hungary, ISBN:9789639970786, p.79 (Budapest, Magyarország)

- NGUYEN, Q. D., BUJNA, E., **TA, L. P.**, KUN, SZ., TRAN, A. M. T., DAM, M. S., & REZESSYNE-SZABÓ, J. (2017): Encapsulation of probiotics: recent developments and perspectives. In: Abstracts of the International Symposium of Food Security and Sustainable Development. ISBN: 9786049200656, p. 29 (Ho Si Minh City, Vietnám)
- TA, L.P.**, BUJNA, E., KUN, SZ., JUHÁSZ, R. (2017): The effect of textural attributes on the applicability of gel-based microcapsules as micro delivery system for probiotic bacteria. In: Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2017 supplement, 64 (1), ISSN: 12178950, p.178. (Keszthely, Magyarország).
- TA, L. P.**, UDVARNOKI, A., BUJNA, E., KUN, SZ., NGUYEN, D.Q. (2017): Design and optimization of novel liposome based cell delivery system for probiotic bacteria. In: Book of Abstracts of the EuroFoodChem XIX. Conference, ISBN: 9789639970793, p.200. (Budapest, Magyarország)
- TA, P. L.**, SÖRÖS, K., BUJNA, E., KUN, SZ. (2016): Optimization of medium composition for enhancing growth of *Bifidobacterium bifidum* b7.1 and *Lactobacillus casei* 01. In: Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2017 supplement, 64 (1), ISSN: 12178950, p. 84 (Keszthely, Magyarország)

Magyar nyelven

- TA, P. L.**, BUJNA, E., KUN, SZ. (2017): Különböző összetételű gélyöngyök alkalmazhatósága a *Lactobacillus casei* 01 életképességének megőrzésében. In: III. Big Food Konferencia absztraktfüzet, p. 15 (Budapest, Magyarország)

IRODALOMJEGYZÉK

- COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., & KHUTORYANSKIY, V. V. (2011): Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. *Biomacromolecules*, 12(7), 2834–2840. <https://doi.org/10.1021/bm200576h>
- COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., & KHUTORYANSKIY, V. V. (2012): Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>
- COOK, S. L., WOODS, S., METHVEN, L., PARKER, J. K., & KHUTORYANSKIY, V. V. (2018): Mucoadhesive polysaccharides modulate sodium retention, release and taste perception. *Food Chemistry*, 240, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.134>
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., & SHARPE, M. E. (1960): a Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- DIASPRO, A., SILVANO, D., KROL, S., CAVALLERI, O., & GLIOZZI, A. (2002): Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells. *Langmuir*, 18(13), 5047–5050. <https://doi.org/10.1021/la025646e>
- HAGHSHENAS, B., ABDULLAH, N., NAMI, Y., RADIAH, D., ROSLI, R., & YARI KHOSROUSHAHI, A. (2015): Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 1048–1057. <https://doi.org/10.1111/jam.12762>
- KALDYBEKOV, D. B., TONGLAIROUM, P., OPANASOPIT, P., & KHUTORYANSKIY, V. V. (2018): Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.039>
- KRASAEOOPT, 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. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.01.004>
- MILES, A. A., MISRA, S. S., & IRWIN, J. O. (1938): The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., CARRIÈRE, F., BOUTROU, R., CORREDIG, M., DUPONT, D., DUFOUR, C., EGGER, L., GOLDING, M., KARAKAYA, S., KIRKHUS, B., LE FEUNTEUN, S., LESMES, U., MACIERZANKA, A., MACKIE, A., ... BRODKORB, A. (2014): A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- PORFIRYEVA, N. N., NASIBULLIN, S. F., ABDULLINA, S. G., TUKHBATULLINA, I. K., MOUSTAFINE, R. I., & KHUTORYANSKIY, V. V. (2019): Acrylated Eudragit® E PO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 562(March), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.027>
- SANDERS, E. R. (2012): Aseptic laboratory techniques: plating methods. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 63, e3064. <https://doi.org/10.3791/3064>
- SCARDOVI, V. (1981): The Genus *Bifidobacterium*. In A. Parte, W. B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, W. Ludwig, & K. Suzuki (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria* (2nd ed., pp. 1951–1961.). Springer-Verlag.
- SHEU, T. Y., & MARSHALL, R. T. (1993): Microentrapment of Lactobacilli in Calcium Alginate Gels. *Journal of Food Science*, 58(3), 557–561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04323.x>
- YAO, M., XIE, J., DU, H., MCCLEMENTS, D. J., XIAO, H., & LI, L. (2020): Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 857–874. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532>

