

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Erdélyi Lóránd József

**Mikrokapszulákban alkalmazott kitozán kölcsönhatásának
vizsgálata probiotikus baktériumokkal**

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Mikrokapszulákban alkalmazott kitozán kölcsönhatásának
vizsgálata probiotikus baktériumokkal**

Dr. Erdélyi Lóránd József

Témavezető: Dr. Váradi Judit



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS	6
1.1.	A PROBIOTIKUMOK CSOPORTOSÍTÁSA ÉS KIVÁLASZTÁS SZEMPONTJAI	7
1.2.	<i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i>	9
1.3.	<i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>	10
1.4.	<i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	10
1.5.	A MIKROKAPSZULÁK JELENTŐSÉGE A GYÓGYSZERFORMULÁLÁSBAN	13
1.5.1.	<i>Mikrokapszulák, mint hordozó rendszerek</i>	13
1.5.2.	<i>A mikrokapszulázás módszerei</i>	13
1.5.3.	<i>Buchi 395-Pro készülék bemutatása, mikrokapszulázási paraméterek</i>	18
1.5.4.	<i>A probiotikum formulálás kritikus paraméterei</i>	20
1.6.	AZ ALGINÁT ALKALMAZÁSA A MIKROKAPSZULÁK ELŐÁLLÍTÁSÁRA	24
1.6.1.	<i>Az alginát kémiai szerkezete</i>	24
1.6.2.	<i>Az alginát előállításának lehetőségei</i>	24
1.6.3.	<i>Az alginát gélképző tulajdonságának felhasználása</i>	25
1.7.	A KITOZÁN SZEREPE A MIKROKAPSZULÁK BEVONÁSÁBAN	26
1.7.1.	<i>A kitozán szerkezete</i>	26
1.7.2.	<i>A kitozán előállításának lehetőségei</i>	27
1.7.3.	<i>A kitozán felhasználása a gyógyszerkészítményekben</i>	28
1.7.4.	<i>A bevonószer kiválasztásának szempontjai</i>	31
1.7.5.	<i>Ellentmondásos eredmények a probiotikus mikrokapszulák előállítása során alkalmazott kitozán esetén</i>	33
2.	CÉLKITŰZÉS	34
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
3.1.	FELHASZNÁLT ANYAGOK	36
3.2.	ALGINÁT MIKROKAPSZULÁK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS BEVONÁSA	36
3.3.	AZ ELTARTÁSI IDŐ HATÁSA AZ ÉLETKÉPESSÉGRE	37
3.4.	A BEVONT ÉS BEVONAT NÉLKÜLI MIKROKAPSZULÁK JELLEMZÉSE	38
3.5.	SEJTÉLETKÉPESSÉGI VIZSGÁLAT	38
3.6.	TERMOTOLERANCIA TESZT SZÁRAZ ÉS NEDVES HŐKEZELÉS MELLETT	38
3.7.	KIOLDÓDÁSI VIZSGÁLAT SZIMULÁLT GASZTROINTESTINÁLIS FOLYADÉKBAN	39
3.8.	SEJTFELSZABADULÁSI PROFILOK ÉS ÉLŐ/HOLT SEJTEK MEGHATÁROZÁSA	41
3.9.	FITC-JELÖLT KITOZÁN SZINTÉZISE	41
3.10.	AZ OLDOTT KITOZÁN BEVONAT MEGHATÁROZÁSA	42
3.11.	A KITOZÁN ÉS EUDRAGIT OLDATOK KÉSZÍTÉSE AZ ÖLÉSI KINETIKA VIZSGÁLATÁHOZ	42
3.12.	MIC ÉRTÉKEK MEGHATÁROZÁSA	43
3.13.	AZ ÖLÉSI KINETIKA VIZSGÁLATA CFU-MEGHATÁROZÁSSAL (TIME-KILL ASSAY)	43
3.14.	ÉLŐ/HOLT SEJTEK ARÁNYÁNAK ÉS SEJTSZÁMÁNAK VIZSGÁLATA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL	44
3.15.	MEMBRÁNINTEGRITÁSI VIZSGÁLAT	44
3.16.	A KITOZÁN KÖLCSÖNHATÁS VIZSGÁLATA KONFOKÁLIS LÉZERES PÁSZTÁZÓ MIKROSZKÓPPAL	44
3.17.	ZÉTA POTENCIÁL MEGHATÁROZÁSA A BAKTÉRIUMSEJT FELSZÍNÉN	45
3.18.	STATISZTIKAI ANALÍZIS	45
4.	EREDMÉNYEK	46
4.1.	TERMOTOLERANCIA TESZT SZÁRAZ ÉS NEDVES HŐKEZELÉS MELLETT	46
4.2.	AZ ELTARTÁS HATÁSA AZ ÉLETKÉPESSÉGRE	47
4.3.	A BEVONT ÉS BEVONAT NÉLKÜLI MIKROKAPSZULÁK JELLEMZÉSE	47
4.4.	ELEMI SPEKTROSKÓPIA	49

4.5.	KIOLDÓDÁSI VIZSGÁLATOK	51
4.6.	A LEOLDÓDÓ KITOZÁN BEVONAT MENNYISÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA	52
4.7.	SEJTFELSZABADULÁSI PROFILOK ÉS ÉLŐ/HOLT SEJTEK MEGHATÁROZÁSA	52
4.8.	MIC ÉRTÉK MEGHATÁROZÁSA ÉS IDŐ-ÖLÉSI VIZSGÁLAT	54
4.9.	MEMBRÁNINTEGRITÁSI VIZSGÁLAT	56
4.10.	ZÉTA POTENCIÁL MEGHATÁROZÁSA A BAKTÉRIUMSEJT FELSZÍNÉN	57
4.11.	A KITOZÁN-SEJTMEMBRÁN KÖLCÖNHATÁS VIZSGÁLATA KONFOKÁLIS MIKROSKÓPPAL	58
5.	MEGBESZÉLÉS	60
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	67
7.	CONCLUSION	68
8.	IRODALOMJEGYZÉK	69
8.1.	AZ ÉRTEKEZÉSBEN HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	69
8.2.	A JELÖLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEINEK A KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁR ÁLTAL ELLENŐRZÖTT JEGYZÉKE	76
9.	ÁBRAJEGYZÉK	77
10.	TÁRGYSZAVAK	79
11.	KEYWORDS	79
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80
13.	FÜGGELÉK	82

Rövidítések

ATCC	American Type Culture Collection
CFU	colony-forming unit
EFSA	European Food Safety Authority
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution, Hank's-féle pufferelt sóoldat
HMO	human milk oligosaccharid
HMW	nagy molekulatömegű
LMW	alacsony molekulatömegű
LPS	lipopoliszacharid
LTA	lipoteichoic acid, lipoteikolsav
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MMW	közepes molekulatömegű
MRS agar	De Man, Rogosa és Sharpe agar
OD	optikai denzitás
PBS	Phosphate Buffered Solution, foszfáttal pufferolt sóoldat
SEM	Scanning Electron Microscope
WTA	wall teichoic acid, sejtfalban lokalizálódó teikolsav

1. Bevezetés

Definíció szerint, probiotikumnak tekinthetők azok az élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben adva jótékony hatással vannak a szervezetre [1]. Azaz a probiotikumok alatt olyan, a szervezet számára előnyös, nem patogén, élő mikroorganizmusokat értünk, amelyek vagy jelen vannak a normál flóra részeként, vagy segítenek annak helyreállításában egy azt érő negatív behatás után.

A probiotikumok felhasználása egyre nagyobb teret hódít az állattartásban és a takarmányozásban. A Föld népessége rohamosan nő, az állattenyésztésnek és a mezőgazdaságnak ezt követnie kell az élelmiszer-ellátás érdekében. A termelékenység növelésére évtizedeken keresztül alkalmaztak a subterápiás dózisban antibiotikumokat, például tetraciklin származékokat. Amennyiben ezt rövidtávon vizsgáljuk, azt a megállapítást tehetjük, hogy egy nagyon jó és előnyös lépés volt az antibiotikumok bevonása a takarmányozásba. Azonban, ha ennek az antibiotikum felhasználási módnak a hosszútávú és globális hatásait tekintjük, rögtön szembetűnik a módszer árnyoldala. A subterápiás dózisú antibiotikumnak nem lesz terápiás értékű baktericid vagy bakteriosztatikus hatása, azonban a kórokozók lényegében a minimális gátló koncentráció (MIC) érték alatti dózisban találkozhatnak az antibiotikummal, ami megalapozza a gyors rezisztencia kialakulását. Az 1980-as évek óta lelassult antibiotikum fejlesztés és a jelenleg ismert és használt antibiotikumok ellen egyre nagyobb számban megjelenő rezisztens vagy multirezisztens baktérium fajok, nem arra engednek következtetni, hogy a jelenlegi antibiotikum politikával hosszú távon győzelemre állnánk a mikroorganizmusokkal szemben. Ezért is lenne előnyös, ha olyan probiotikus fajokat használnánk az állattartásban, amelyek lényegében úgy növelik a tenyésztés hozamát, hogy közben nem szelektálnak ki patogén törzseket sem és az antibiotikum rezisztenciát sem eredményeznek.

Az ember-állat-ökoszisztéma mikrobiomjaik révén folyamatos kölcsönhatásban vannak egymással. Az Egy Egészség Európai Közös Program (OHEJP) az Európai Bizottság által társfinanszírozott, tudományos együttműködésen alapuló kutatási program, amelynek célja, hogy az élelmiszerekből származó zoonózisok, az antimikrobiális rezisztencia és az újonnan megjelenő mikrobiológiai veszélyek elleni közös fellépések révén segítse megelőzni és ellenőrizni az emberi egészséget befolyásoló, élelmiszer eredetű és környezeti szennyeződések. Az ember-állat-ökoszisztéma határfelületén jelentkező egészségügyi veszélyek és kockázatok felismerése, értékelése és kezelése csak globálisan, több szakterület összefogásával lehetséges [2].

1.1. A probiotikumok csoportosítása és kiválasztás szempontjai

A probiotikumok vizsgálata és kutatása nem újkeletű, már az 1800-as évek végén végeztek kutatásokat a szoptatott csecsemők bélflórájának összetételével kapcsolatban, illetve az 1900-as évek elején izolált *Escherichia coli*-t már egészségügyi problémák megoldására is használták [3]. Napjainkban már olyan sokféle probiotikus hatású mikroorganizmust használnak, hogy érdemes őket szisztematikusan csoportosítani.

Az első és legfontosabb szempont lehet az, hogy milyen eredetű mikroorganizmusról van szó, bakteriális vagy nem bakteriális. Elmondhatjuk, hogy a legtöbb probiotikum valamilyen baktérium, csak néhány tartozik a gombák közé. A leggyakrabban használt baktériumok közé tartoznak a *Lactobacillusok*, a *Bifidobacterium*, számos *Bacillus* faj, valamint az *Enterococcus* néhány képviselője. A gombák között említésre méltó az *Aspergillus oryzae*, a *Candida pintolopesii*, a *Saccharomyces boulardii* és a *Saccharomyces cerevisiae*. Első probiotikumként nem spóráképző baktériumokat használtak, mint a *Lactobacillusok*, majd megjelentek a spóráképzők is, például a *Bacillus subtilis* és a *Bacillus amyloliquefaciens*. További fejlődést jelentett, amikor már nem csak monokultúrában használták a probiotikumokat, hanem ezeknek a keverékét alkalmazták. Ilyen kereskedelmi forgalomban kapható probiotikum keverék például a PoultryStar ME ami *Enterococcus faeciumot*, *Lactobacillus reuterit*, *L. salivariust* és *Pediococcus acidilactici* keverékét tartalmazza és az állattakarmányozásban alkalmazzák[4].

A probiotikus mikroorganizmusok kiválasztásánál kardinális kérdés az, hogy hogyan viselkedik *in vivo* körülmények között. A megfelelő hatás eléréséhez nagyon sok, néha szélsőséges körülményt kell túlélniük és életképesnek maradniuk. Ilyenek például a szervezetben belüli pH viszonyok, a gyomor erősen savas közege vagy éppen a duodenumba ömlő epe, epesavakkal terhelt környezete. Amennyiben ezeken a nehézségeken a mikroorganizmusok túljutottak, fontos kérdés még, hogy képesek-e megtelepedni a bélrendszerben, képes-e gyorsan növekedni és képes-e kialakítani a normálflóra számára azt az újra ideális közeget, ahol képes visszaépülni. A jobban ellenálló fajok közé tartoznak a spóráképző baktériumok. A spóráképzés, úgy működik, mint egy bakteriális pánikszoba. Amint a baktérium a környezete nem ideális a túléléshez, a baktérium a létfontosságú részeit egy endospórába zárja, ezzel átvészelve a nem kedvező körülményeket. Amint azonban a baktérium újra olyan környezetbe kerül, ami a számára ideális, az endospórából kibújva megindítja az életfolyamatait. Így ezek a fajok még inkább alkalmasak takarmányokhoz való keverésre, mert jobb a túlélési esélyük például egy pelletáláskor fellépő hőhatás után, vagy egy tartósabb UV besugárzást követően, vagy éppen a tárolási idő alatt.

A probiotikumok több hatásmechanizmussal is rendelkeznek a vizsgálatok szerint. Képesek megváltoztatni a gasztrointesztinális traktus mikrobiótá, azaz a mikroorganizmusok összességének összetételét. Ezzel a jótékony és patogén mikroorganizmusok egyensúlyát fent tudják tartani vagy helyre tudják azt állítani. Ez a probiotikus mikroorganizmusok által termelt antimikrobiális anyagokkal, az úgynevezett bakteriocineken valósul meg, valamint kompetitív módon képesek kizárni a patogén kórokozók bélhámhoz való adhézióját [4]. A probiotikus baktériumok képesek befolyásolni a patogén kórokozók génexpresszióját is. A quorum sensing vagy más néven a lokális denzitás érzékelés a populációsűrűséggel párhuzamot mutató rendszer. Amennyiben megfelelően nagy populáció fejlődik ki egy adott baktériumból, képesek különböző anyagokat termelni, amelyeknek hatása additív módon érvényesül. Lehet ez például egy olyan exoenzim, amely sejten kívüli emésztést segít elő, vagy a vas felvételét facilitáló szideroforok, vagy éppen a patogénekre jellemző és azok invazivitását fokozó virulenciafaktorok. A *Lactobacillus acidophilus* *in vitro* megzavarta az *E. coli* O157:H7 enterohemorragiát okozó baktérium virulencia faktorának termelődését ezzel a gasztrointesztinális traktus kolonizációját [5, 6]. Azonban azt figyelembe kell vennünk, hogy a jótékony hatású probiotikus fajok is elveszíthetik „szelídségüket” és komoly infekciókat képesek okozni, ezért a biztonságosságukat vizsgálják és folyamatosan nyomon követik.

Az 1. táblázat az állattakarmányozásban leggyakrabban alkalmazott baktérium törzseket mutatja be. A kísérleteink során három nemzetségből kerültek ki a mikrokapszulázásra szánt baktérium törzsek, melyeket a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kara választott ki és biztosított számunkra.

Baktérium nemzetség	faj
<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i> <i>niger</i>
<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i> <i>subtilis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>bifidum</i> <i>bifidus</i> <i>themophilus</i>
<i>Candida</i>	<i>pintolepesi</i>
<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i> <i>faecalis</i>

<i>Lactobacillus</i>	<i>thermophilus</i> <i>acidophilus</i> <i>brevis</i> <i>bulgaricus</i> <i>casei</i> <i>plantarum</i> <i>reuteri</i> <i>rhamnosus</i> <i>lactis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i> <i>parvulus</i>
<i>Prevotella</i>	<i>bryantii</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>boullardii</i> <i>cerevisiae</i> <i>servisia</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>faecalis</i> <i>faecium</i> <i>gallolyticus</i> <i>salivarius subsp.thermophilus</i>

1. Táblázat Az állatok takarmányozásában leggyakrabban alkalmazott probiotikus törzsek[4]

1.2. *Bifidobacterium bifidum*

A *Bifidobacterium* fajok Gram-pozitív sejtfallal rendelkeznek, jellemzően anaerob körülmények között életképesek, ebből kifolyólag a vastagbél baktériumflórájának jelentős részét tehetik ki[7]. Az anyatejjel táplált csecsemők bélrendszerében is megtalálható, ezek a fajok kolonizálják elsőként a bélrendszert. Nagy jelentősége van az anyatejjel a csecsemő szervezetébe jutó oligoszacharidok (HMO – human milk oligosaccharide) lebontásában. Az anyatejben lévő HMO a baktériumoknak olyan tápanyagként szolgálhat, amelyet a szervezet nem képes megemésztetni, tehát lényegében prebiotikumként is funkcionál [8].

Baromfiban az élelmiszer-adalékanyagként használt *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium thermophilum* és *Bifidobacterium longum* fajok képesek csökkenteni a kokcidiózt *Eimeria tenella*val fertőzött brojlercsirkékben. Ezen kívül protektív hatást fejt ki a *Salmonella* és *Listeria* fajok ellen in vitro és az *E. coli* ellen csirkében, valamint anti-Campylobacter aktivitást is megfigyelek.

Összességében, a *Bifidobacterium* nemzetséghez tartozó baktériumokat alaposan tesztelték a takarmány-adalékanyagként és a hagyományos antibiotikumok tenyésztési alternatívájaként való alkalmazásuk szempontjából. A kapott eredmények ígéretesek, és bizonyos kórokozók specifikus gátlására való képességük nagy előnyt jelent [9].

1.3. *Enterococcus faecium*

Az *Enterococcus faecium* egy Gram-pozitív sejtfallal rendelkező, hemolitikus vagy nem hemolitikus, kommenzális baktérium. Megtalálható a normál bélflóra tagjaként, azonban lehet patogén is. A patogén tulajdonságai miatt nem elfogadott probiotikum, az EFSA (European Food Safety Authority) QPS (qualified presumption of safety) listájára nem került fel, a nem tisztázott virulencia gének miatt [10]. Az *Enterococcus* törzsek alapvetően széles pH és hő tartományban életképesek. Részben ezért is versenyképesek a gasztrointesztinális traktusban élő többi baktériumfajjal szemben. Valamint termelnek bakteriocinokat, amelyekre antibakteriális fehérjeként tekinthetünk [11]. Sertés takarmányozásban felhasznált *E. faecium* NCIMB 10415 a vizsgálatok alapján csökkentette a *Chlamydia* fertőzéseket és patogén *E. coli* szerotípusok megjelenését [12]. Ezek alapján, akár úgy is tekinthetünk rá, mint egy jövőbeli probiotikum jelölt, amennyiben megoldottá válik a patogén és kommenzális baktériumok elkülönítése.

1.4. *Lactobacillus plantarum*

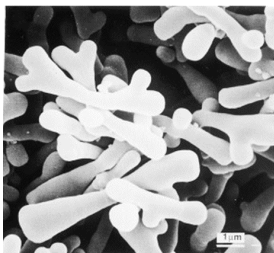
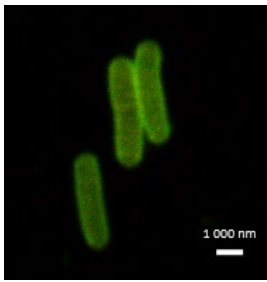
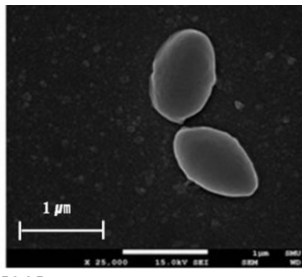
A *Lactobacillus plantarum* Gram-pozitív, pálcika alakú baktérium. Alkalmazkodó képessége a tejsavbaktériumok között is kimagasló, ez annak köszönhető, hogy a legnagyobb genommal rendelkező baktériumok egyike [13]. Széles pH és hő optimummal rendelkezik. Vizsgálatok alapján pH 3.4-8.8 között, illetve 21-40 °C intervallumban életképes és mutat növekedést [14, 15]. A *L. plantarum* fakultatív heterofermentív anyagcseréhez szükséges enzimmészettel rendelkezik, így a felvett cukrokat, tápanyagot a környezetétől függő útvonalon képes bontani és abból energiát nyerni [13].

A *L. plantarum* probiotikus tulajdonságait több betegség adjuváns kezelésében is vizsgálták. Pozitív hatást mutatott például diabetes mellitus kettes típusában szenvedő betegeknél, ahol tizenegy hetes kezelés után a HbA1c szint pozitív változást mutatott, ami arra utal, hogy a szervezet glükózháztartását javította [16]. Hasonlóan pozitív kimenetelt mutatott az acne vulgaris kiegészítő kezelésében. A probiotikus kezelésben is részesülő betegeknél a *L. plantarum* hatására, a klinikai tünetek súlyossága csökkent [17]. Egy másik, kontrollált, kettős vak, randomizált vizsgálatban, a *L. plantarum* hatását vizsgálták irritábilis bél szindrómában (IBS). A vizsgálat kezdetekor, a betegségben szenvedők 5 és 10 pont között értékelték a saját fájdalmukat. A kiindulási értékhez képest a fájdalom jelentős csökkenése volt megfigyelhető minden betegnél, akik *L. plantarum* kezelésben részesültek. Az aktív készítményt kapó betegek

70%-a (n=14), a kezelés megkezdése után 1 héttel a hasi fájdalmak jelentős csökkenését jelentette, a maradék 30% pedig, a hasi fájdalom jelentős csökkenéséről számolt be a következő 2-3 héten belül. A kontroll csoportban lévő, 19 IBS-es beteg szintén egy 5 és 10 között skálán értékelte a fájdalmait. A vizsgálat végén 16 beteg még mindig szenvedett fájdalomtól, enyhe javulás is csak 11 betegnél volt megfigyelhető ebben a csoportban [18].

Vizsgálták továbbá *Clostridioides difficile* fertőzés megelőzésében is a *L. plantarum* 299v-t. A *C. difficile* teszt a kontroll csoport 19%-ánál (4/21) volt pozitív, ami megegyezik az irodalomban közölt arányokkal az antibiotikumokkal kezelt kórházi betegek esetében. *L. plantarum* 299v-vel kezelt csoport egyik betegének sem volt pozitív *C. difficile* tesztje, ami arra utal, hogy a *L. plantarum* 299v probiotikum ellensúlyozhatja vagy akár meg is akadályozhatja a *C. difficile* kolonizációt a kritikus állapotú, antibiotikumot kapó betegekben. Ezek az eredmények megegyeznek egy másik vizsgálat eredményeivel, amelyben az antibiotikummal kezelt kórházi, nem intenzív osztályon lévő betegek ugyan nem *L. plantarum* 299v-ot profilaktikus kezelésben részesültek, hanem *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* és *Streptococcus thermophilus* tartalmazó készítményt kaptak. Ebben a vizsgálatban sem találtak *C. difficile*-t az aktív kezelési csoportjukban, míg a kontrollcsoport alanyainak 17%-a volt pozitív az adott fajra. Így valószínűsíthető, hogy a *C. difficile* kolonizációja az antibiotikummal kezelt betegekben csökkenthető probiotikumok antibiotikumok mellé történő adásával. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy kritikus betegségek esetén a *L. plantarum* 299v profilaktikus a *C. difficile* megtelepedése ellen [19, 20].

A 2. táblázatban a fejlesztéseinkhez kiválasztott probiotikus baktériumok nemzetségeit hasonlítom össze a legfontosabb jellemzőik alapján.

Nemzettség	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
	 [21]	 saját felvétel	 [22]
Gram festés	Pozitív	pozitív	pozitív
mérettartomány	0,5-1,3µm-től 1,5-8,0µm-ig	0,5-1,2µm-től 1,0-10,0µm-ig	0,6-2,5 µm
morfológia	elágazó Y alakú pálca	nem elágazó pálca	ovális, gömb
metabolikus tulajdonságok	heterofermentatív, anaerob	1.csoport: obligát homofermentatív pl, <i>Lactobacillus acidophilus</i> 2.csoport: fakultatív heterofermentatív pl, <i>Lactobacillus plantarum</i> 3.csoport: obligát heterofermentatív pl, <i>Lactobacillus brevis</i>	fakultatív anaerob
spóráképzés	nem jellemző	nem jellemző	nem jellemző
előfordulás	Emberek, más melegvérű állatok és rovarok szájában és bélrendszerében található, szennyvízben és klinikai mintákban is, Jellegzetes, elsőként megjelenő törzsek a csecsemők bélrendszerében,	Az emberek és más melegvérű állatok szájüregében, bélrendszerében és hüvelyében a normál flóra része. Tejében, halban, pácolt és fermentált termékekben is megtalálható.	Talajban lévő táplálékban, a vízi állatokban és a madarakban, Kedvezőtlen környezetben is túlélnek, és szinte mindenhol megmaradnak. Humán szervezetben a gyomor-béltraktusban gyakoriak.
patogenitás	nem jellemző	A fogszuvasodáson kívül a <i>Lactobacillus</i> -okat általában apatogénnek tekintik.	Kórházi húgyuti fertőzések gyakori kórokozói,
alkalmazása az állattakarmányozásban	baromfi: növekedés gyorsító és végső tömeg növelő, enterális kórokozók elleni védekezés vagy megelőzés, növelik a tojás mennyiségi termelését és a minőséget		
	sertés: elválasztás utáni hasmenés megelőzésére		
	kérődzők: növelik a súlygyarapodásukat		

2. Táblázat A mikrokapszulázásra kiválasztott probiotikus törzsek nemzetségeinek bemutatása a főbb jellemzőik alapján

1.5. A mikrokapszulák jelentősége a gyógyszerformulálásban

1.5.1. Mikrokapszulák, mint hordozó rendszerek

A mikro- és nanokapszulák napjaink gyakran alkalmazott és vizsgált hordozó rendszerei. Lehetővé teszik a hatékony gyógyszerbevitelt a citotoxikus hatóanyagok esetében, így az adott készítmény terápiás hatékonyságának növelését, valamint mellékhatásprofiljának pozitív irányú változását. A „mikrorészecske” és „nanorészecske”, azaz a mikropartikulum és nanopartikulum kifejezések a vonatkozó részecskeméretnek megfelelően használatosak. Az 1 μm -nél kisebb részecskeméretet nanométeres nagyságrendű részecskéknek, míg az ettől nagyobb részecskéket mikrorészecskéknek nevezzük. Az 1000 μm -nél nagyobb részecskéket a makrorészecskék közé sorolják. A mikro/nanokapszulák azok a rendszerek, amelyekben a hatóanyag homogén módon diszpergálódik a polimer mátrixban, monolitikus rendszert alkotva, ahol nem lehet külön magot azonosítani.

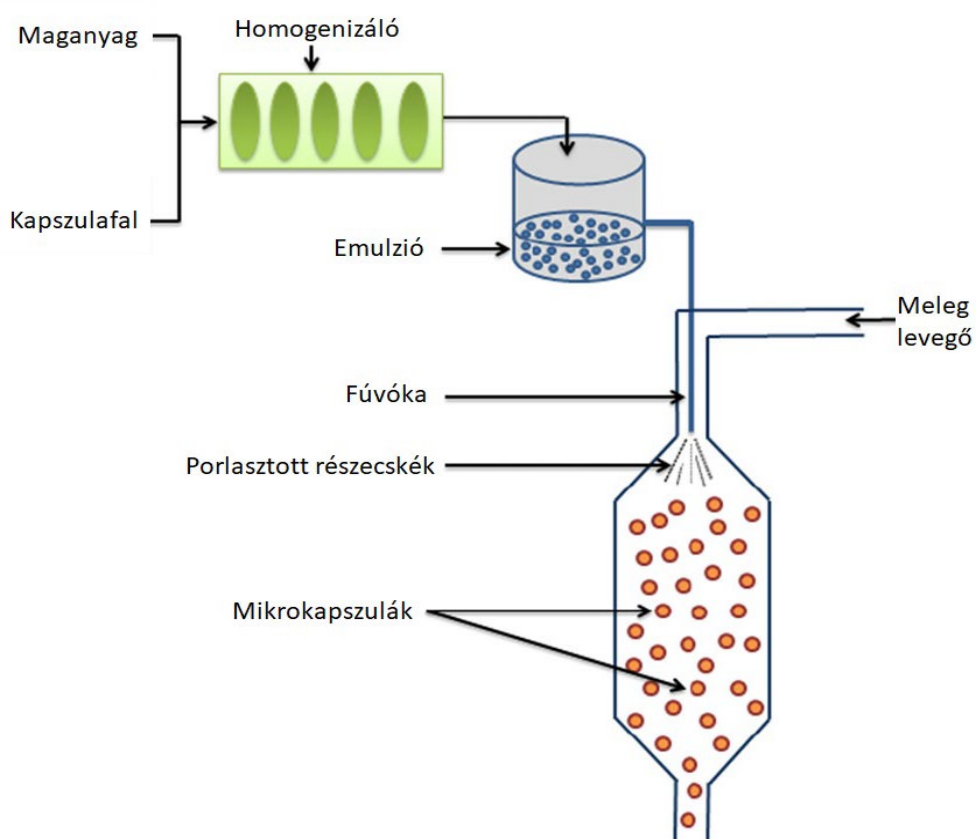
Néhány példa a már forgalomban lévő mikro/nanokapszulázással előállított készítményre: fájdalomcsillapítók (aszpirin; indometacin); szteroidok (progeszteron, prednizolon); vitaminok (A- K- C-vitamin); nyugtatók (barbiturátok); antibiotikumok (szulfamerazin; szulfadiazin, szulfametoxazol, ampicillin, eritromicin); kemoterápiás szerek (metilglioxál, mitomicin, 5-fluorouracil, doxorubicin); prosztaglandinok és radiofarmakonok. Gyógyszerleadó rendszerként a mikrorészecskék orális beadásra alkalmasak. Kis részecskeméretük miatt nagyon jól eloszlanak a gyomor-bél traktusban és nagy fajlagos felületük miatt jelentősen növelik a felszívódást. Ezenkívül, a nanorészecskék parenterális, intravénás úton is adminisztrálhatók és ezek is könnyebben diffundálhatnak a szövetekbe, mint a nagyobb részecskék [23].

1.5.2. A mikrokapszulázás módszerei

Porlasztva szárítás

A porlasztva szárítás egy olyan technika, amelyben a betáplált oldatot – a maganyag és a falanyag keverékét – porlasztják egy kamrában, ahol forró levegő hatására a köd kiszárad és porrá alakul (1. ábra). Különböző tényezőktől függően, mint például a betáplálási oldat jellemzőitől és az üzemi körülményektől függően, különböző szemcseméretű por állítható elő. A porlasztva szárításnál a maganyag, azaz a kapszulázni kívánt anyag csapdázódik a szárított

porba. Előnye ennek a módszernek, hogy gazdaságos, rugalmas, sokféle anyaghoz használható és könnyen méretezhető. A betáplálási hőmérséklet emelkedése esetén csökkenteni kell a viszkozitást és a cseppek méretét. Egyes hőérzékeny komponensek változása vagy bomlása azonban a magas hőmérséklet miatt előfordulhat. Annak biztosítása érdekében, hogy minden permetezett csepp elérje a kívánt szárítási szintet, a porlasztó előtolási sebességét a szárítókamrába történő permetezés előtt megfelelően be kell állítani. Ugyanez igaz a szárítás során használt levegő hőmérsékletére és áramlási sebességére is [24, 25].



1. ábra Porlasztva szárítás sematikus ábrája [24]

Porlasztva hűtés

A porlasztva hűtési kapszulázási módszer nagyon hasonló a működését tekintve a porlasztva szárításhoz. A fő különbség a hideg levegő használata. A maganyag és a falanyag keverékét porlasztják, hogy köd keletkezzen egy kamrában, amelyben hideg levegő áramlik. A kamrán belüli alacsony hőmérséklet a mikrocseppek megszilárdulását eredményezi, ami mikrokapszulázott por képződéséhez vezet [25]. Ennek a módszernek számos hátrányát

igazolták. Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a porlasztva hűtéssel kialakított mikrokapszulák nem túl stabilak, ez a maganyag kilökődéséhez vezet a tárolás során [26, 27].

Koacervációs eljárás

A koacerváció egy egyszerű technika, amely során a falanyag homogén rétegének kialakítására kerül sor a maganyag körül. Ezt úgy érik el, hogy a fal anyagának fizikai-kémiai tulajdonságait megváltoztatják a hőmérséklet, a pH vagy az ionerősség változásával. Itt a maganyagot és a falanyagot összekeverik, nem elegyedő oldatot képeznek. Ezután a fázisszétválasztást az ionerősség, a pH vagy a hőmérséklet változtatásával indukálják, hogy koacervátumokat képezzenek, amelyek apró folyadékcseppek és polimerben gazdag sűrű fázisból állnak. Ezek a koacervátumok ezután körülveszik a maganyagot, és mikrokapszulákat alkotnak. Két vizes közeg közötti elektrosztatikus kölcsönhatás felelős a folyadékból gélbe való átmenetért, azaz az ionos gélesedésért, és így a falanyag szilárdulásáért. Ezt a technikát alapvetően hidrofíl molekulák kapszulázására használják.

Az ilyen koacervációt, amely csak egy polimer anyagot érint, egyszerű koacervációnak nevezzük, a leggyakrabban alkalmazott polimer például a nátrium-alginát. Az egyszerű koacerváció során a nátrium-alginátot feloldják vízben, és belekeverik a kapszulázandó hatóanyagot, és a képződött elegyet cseppenként egy gélképző közegbe, például kalcium-kloridba vezetik. A nátrium-alginát és a kalcium-klorid közötti ionos kölcsönhatás oldhatatlan polimer, kalcium-alginát képződéséhez vezet.

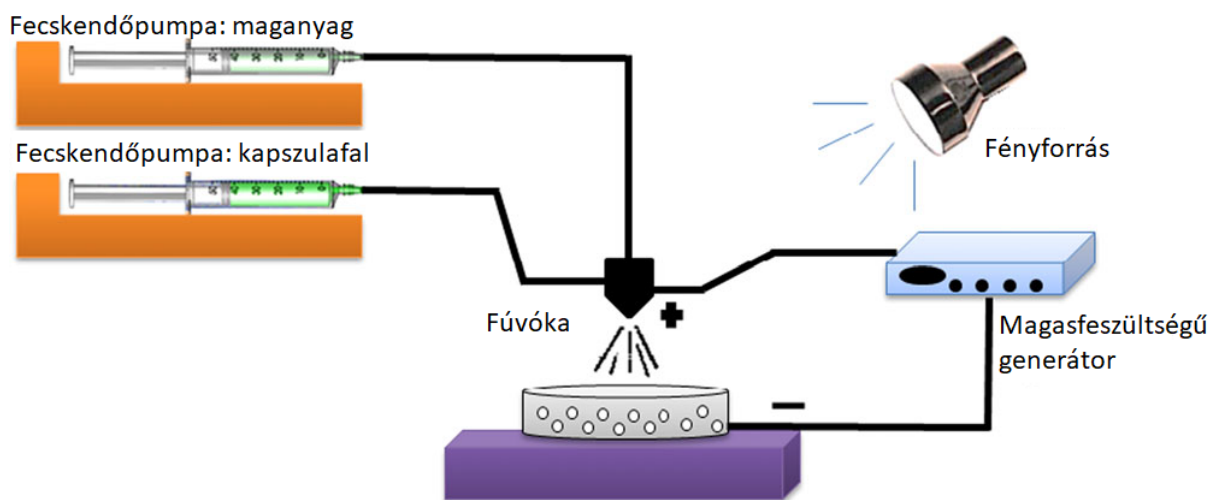
A koacerváció egynél több polimert is magában foglalhat, akkor ezt komplex koacervációnak nevezik. A komplex koacervációban gyakori használt polimerek, a zselatin és az alginát. A zselatint savas pH-n vízben oldják pozitív töltések elérése érdekében, az alginátot pedig vízben oldják bázikus pH-n, hogy negatív töltésű polimert kapjanak. A kapszulázandó hatóanyagot az alginát oldatba keverjük és megfelelően homogenizáljuk. Ezt az alginát fázist ezután intenzíven összekeverik a zselatin fázissal, és a hőmérsékletet addig emelik, amíg az alginát és a zselatin közötti kémiai reakció meg nem indul. A hatóanyag úgy kapszulázódik, hogy körülötte polikationos-polianionos oldhatatlan polimer képződik [25].

Koaxiális elektropray rendszer

A külső és belső oldatokat koaxiálisan és egyidejűleg két különálló adagolócsatornán keresztül permetezzük egy fúvókába (2. ábra). Az elektropray-eljárás során a szórófej tetején

mag-héj szerkezetű Taylor-kúp képződik, így megindul a cseppképződés, majd a külső polimer oldat kapszulázza a belső folyadékot. A kis töltött cseppek akkor keletkeznek, amikor az fúvókából távozó cseppeket Coulomb taszítás löki szét. Az elektro spray-módszer jellemzően könnyen kivitelezhető eljárás, gyors és hatékony.

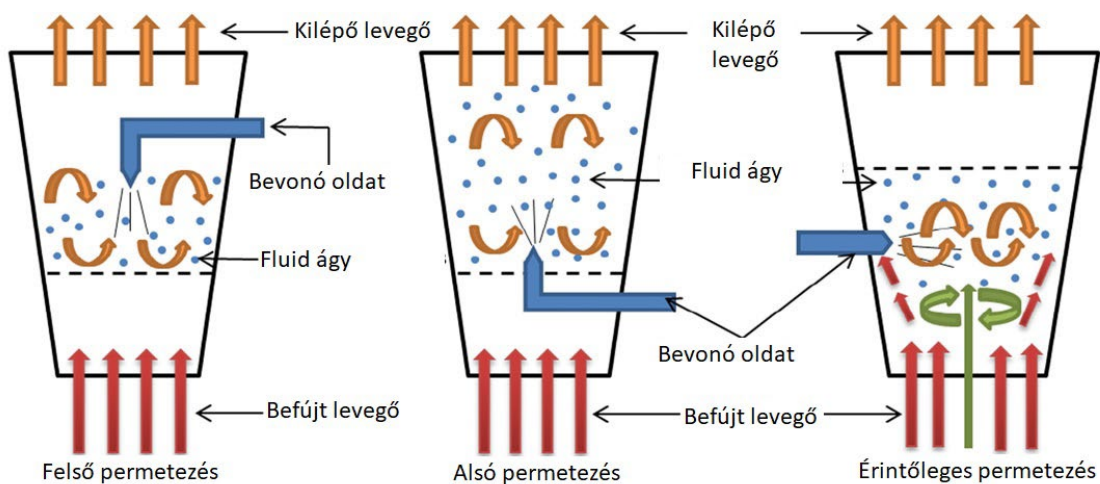
A kapszulázási eljárás hatékonyságát és a mikrokapszulák stabilitását a felhasznált anyagok befolyásolják a legjelentősebben. A kétfázisú koaxiális elektro spray rendszer sematikus ábrája mutatja, hogy a két fecskendőszivattyúból, egy tűt tartalmazó rozsdamentes acél fúvókából és egy nagyfeszültségű generátorból áll a berendezés. A fali folyadékot az egyik fecskendőpumpába, a mag anyagát pedig egy másik fecskendőpumpával szükséges szívni. Minden fecskendő egy programozható fecskendőszivattyúhoz csatlakozik, a koaxiális fúvókára pedig nagyfeszültségű áramot kell kapcsolni [24].



2. ábra Koaxiális elektro spray rendszer sematikus ábrája [24]

Fluidizációs eljárás

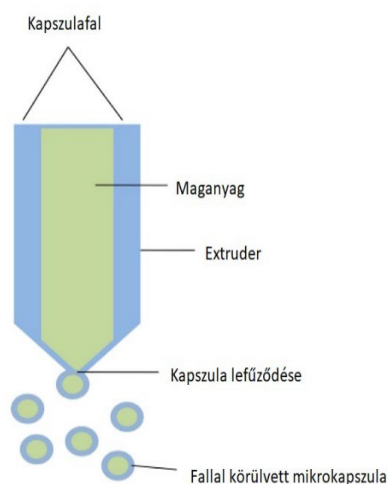
A fluidágys bevonás olyan kapszulázási eljárás, amelyben bevonó anyagot permeteznek a fluidizált maganyagra (3. ábra). A maganyagot megfelelő sebességű levegő áramoltatásával fluidizálják, majd felső permetezéssel, alsó permetezéssel vagy érintőleges permetezéssel bevonó anyagot juttatnak a maganyagra. Ennél a kapszulázási módszernél a falanyag bevonatának hatékonysága számos paramétertől függ, mint például a falanyag bemeneti sebessége, a fúvóka porlasztási nyomása, a bemenő levegő hőmérséklete és sebessége [25].



3. ábra Fluidizációs eljárások sematikus ábrája [24]

Extrudálás

Az extrudálási technológia nagy sűrűségű mikrokapszulák előállítására használható. A módszer alkalmazásának alapfeltétele, hogy a magnak és a fal anyagának egymással nem elegyedőnek kell lennie. A magot és a falanyagokat koncentrikus fűvókákon úgy vezetik át, hogy a falanyag körülveszi a magot, így a cseppek képződése közben falanyaggal körülvett magot tartalmazó mikrokapszulák alakulnak ki (4. ábra). Ezután a megszilárdítást vagy hűtéssel, vagy megfelelő zselésítő fürdő használatával végezzük. Az így kialakított kapszulák viszonylag nagyobb méretűek, mint bármely más eljárással előállított kapszulák [25].



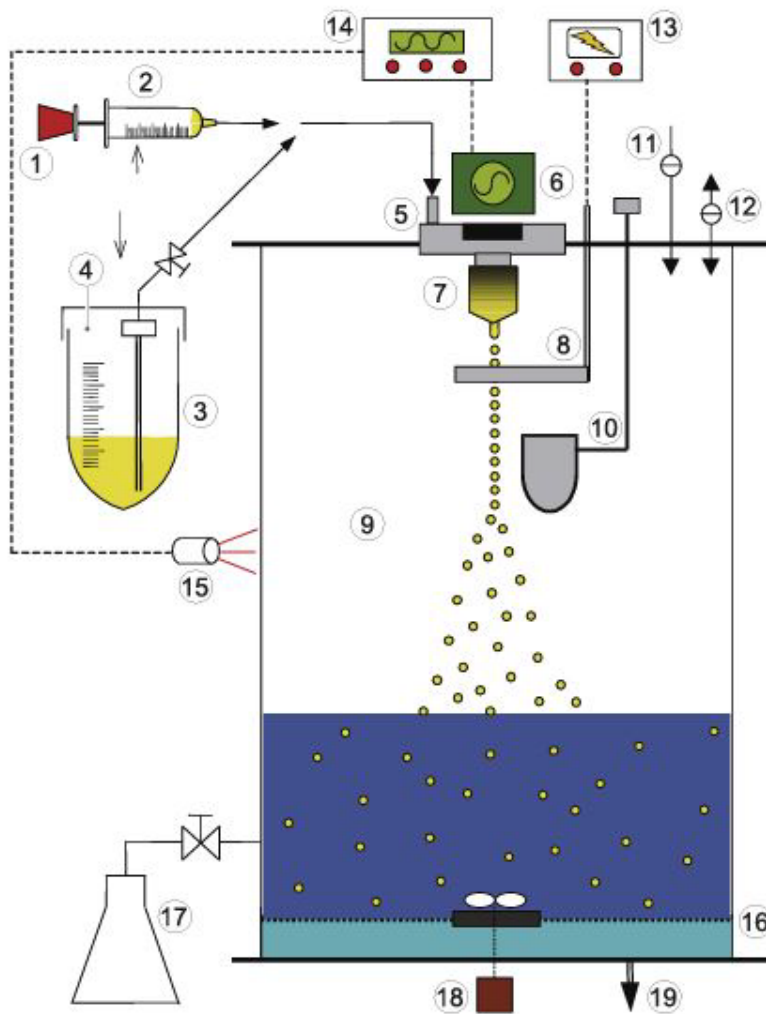
4. ábra Extrudálás sematikus ábrája [25]

Emulgeálás

Az emulgeálási technikával történő mikrokapszulázás a mag szerves oldószerben való diszpergálásával történik, amely tartalmazza a falanyagot. A diszperziót ezután olajban vagy vízben emulgeáljuk, amelyhez emulgenst adunk. A mag a szerves oldószer elpárologtatásával képződik, körülötte pedig tömör polimer réteg képződik. Ez az egyik leggyakrabban használt kapszulázási technika, mivel az eljárások nagyon egyszerűek. Ezt a technikát széles körben használják enzimek és mikroorganizmusok kapszulázására [25].

1.5.3. Buchi 395-Pro készülék bemutatása, mikrokapszulázási paraméterek

A Buchi 395-Pro fő részeinek tekinthető a vezérlőegység, a fecskendőpumpa, az elektromos és pneumatikus rendszerek, illetve a reakcióedény. Minden egysége, amely közvetlenül érintkezésbe léphet a mikrokapszulákkal, autoklávban sterilizálható, így steril gyártási körülmények is megvalósíthatóak vele. Az eljárás nagy előnye a képződő mikrokapszulák méretének kis szórása ($\pm 5\%$). Ez a vibrációs elektropray technológiának köszönhető, ami azon alapul, hogy a lamináris folyadéksugár egyenlő térfogatú frakciókra szakad a rezgés hatására [28]. A műszer felépítését bemutató sematikus ábrán (5. ábra), minden összeszerelési és felhasználási lehetőség fel van tüntetve, azonban nem szükséges minden alkatrész a műszer megfelelő működéséhez [29].



5. ábra Buchi 395-Pro sematikus ábrája [29]

1 fecskendő pumpa	8 elektród	15 stroboszkóp lámpa
2 fecskendő	9 reakcióedény	16 szűrőlemez
3 nyomáspalack	10 bypass csésze	17 gyűjtő edény
4 nyomásszabályozó	11 folyadékszűrő	18 mágneses keverő
5 pulzációs kamra	12 levegőszűrő	19 hulladék leeresztő
6 vibrációs rendszer	13 elektrosztatikus töltés generátor	
7 fúvóka	14 frekvenciagenerátor	

A mikrokapszulázandó termék - a mi esetünkben a probiotikus baktériumok - és a maganyag - a kitozán - szuszpenzióját fecskendőbe szívtuk, majd ezt helyeztük a fecskendőpumpába. A pulzálókamrába a juttatott termék a fúvókán halad át. A fúvókából kilépő cseppek mérete az alkalmazott körülményektől függően változik. Befolyásolja a

gyöngyök méretét a vibrációs frekvencia, a fűvókaméret, az áramlási sebesség, az alkalmazott feszültség és az, hogy milyen maganyagot használnak a formulálás során [30]. A legmeghatározóbb paraméter a fűvókaméret, általánosan azt mondhatjuk, hogy a képződő gyöngy mérete körülbelül a fűvókaméretének a kétszerese, a többi felsorolt paraméter változtatásával $\pm 15\%$ -os eltérést lehet elérni.

A képződött cseppek, a fűvóka és az elektród között lévő elektromos mezőnek köszönhetően felületi töltést kapnak és taszítják egymást. Ennek köszönhetően a képződött cseppek szétszóródnak és különálló partikulomokként jutnak a szilárdító oldatba [29]. A valós gyöngyképződés pillanatát a stroboszkóp lámpa fényében jól meg tudjuk ítélni. Amíg nem indul meg a gyöngyképződés érdemes a fűvókán kilépő anyagot a bypass csészében felfogni, elkerülve a nem kívánt méretű, összetapadt részecskék képződését, ugyanez igaz a gyártás végén képződő, nem megfelelő minőségű cseppekre is.

A szilárdító oldatba kerülő cseppek, folyamatos kevertetés közben megszilárdulnak, kialakulnak a mikrokapszulák, amelyek leszűrhetők és további feldolgozásra készek.

1.5.4. A probiotikum formulálás kritikus paraméterei

A probiotikus baktériumokat tartalmazó mikrokapszulák formulálása során olyan eljárásokat is szükséges alkalmazni, amelyek csökkenthetik a felhasznált baktériumtörzsek életképességét. Ilyen például a szárítás. Az általánosan alkalmazott szárítási technikák eltérő körülmények között kivitelezhetők, az eljárás során alkalmazott hőmérsékletnek és a szárítás időtartamának meghatározó szerepe van a probiotikus törzsek életképességének csökkenésében. A szárítással a nedvességtartalom eltávolítása a cél, mellyel éppen a hosszú távú eltarthatóságot kívánjuk elérni, ezért fontos a megfelelő szárítási módszer megválasztása. Mikrokapszulák szárításában általában a porlasztva szárítást, a fagyasztva szárítást, a vákuumszáritást és a fluidágyas szárítást alkalmazzák [31]. Ezen módszereket a fent említett kritikus paraméterek szemszögéből mutatom be.

Porlasztva szárítás

Ebben az eljárásban a mikrokapszula képzése és szárítása ugyanazon eszközben történik. Ez előnyt jelent, mivel így az eljárás viszonylag olcsó lesz, a működése folyamatos és rövid száradási idő jellemzi. Tehát nagy mennyiségű szuszpenzió, rövid idő alatt, olcsón feldolgozható. A mikrokapszula képzés utána a szárítási folyamat addig tart amíg el nem érik a

kívánt oldószervesztést. Ezen módszer alkalmazásakor nagy figyelmet kell fordítani az eljárás során alkalmazott hőmérsékletre és a segédanyagok, például maltodextrin vagy mandulatejpor megfelelő koncentrációjára. Amennyiben túl magas hőmérsékletet alkalmaznak, a baktériumok életképessége akár nullára is csökkenhet, vagy a nem kellően magas maltodextrin koncentráció miatt a termék higroszkópos lehet és agglomerációra hajlamossá válik [32].

Fagyasztva szárítás

A fagyasztva szárítás vagy liofilizálás egy gyakran alkalmazott módszer a víz eltávolítására a szárítani kívánt rendszerből. A szárítás első lépéseként a terméket a liofilizáló berendezésen kívül lefagyasztják, majd a liofilizálóban csökkentett nyomáson a fagyáspont alatti nedvességtartalmat szublimáltatják, és az eltávozott gőzt elvezetik, a kondenzátoron lefagyasztják. A fagyasztva szárítás során fellépő negatív hatások enyhébbek, mint a porlasztva szárításnál vagy a konvektív hőközléssel való szárítás során, így a probiotikus baktérium tenyészetek is általában jobb túlélési arányt mutatnak [33].

A fagyasztva szárítás kritikus lépése a probiotikus mikrokapszulák lefagyasztása. A fagyasztás során a baktériumok sejtfala sérül, amely életképesség csökkenéshez vezet és jelentősen csökkenti a végtermékben az életképes csíraszámot[34]. Ennek kivédésre krioprotektánsokat alkalmaznak, melyek általában diszacharidokból, polialkoholokból, fehérjékből vagy összetett keverékekből, például fölözött tejből állnak. A krioprotektánsok megválasztásánál fontos szempont, hogy mi képezi a mikrokapszula magot. Alginát esetében a kálciumionokat tartalmazó oldatban történő kicsapódás miatt kalcium mentes krioprotektánst célszerű választani, így ebben az esetben a sovány tejpor alkalmazása nem jön számításba, mert a magas kalcium tartalma zavarja az alginát térhálósítását [35].

Vákuum szárítás

A vákuumszáritó egy fűthető polcokat tartalmazó szárító kamra. A szárítani kívánt anyagot, nedvesen ezekre a polcokra helyezik, majd vákuumszivattyúval eltávolítják a vízgőzt, amit egy kondenzátorban kondenzálnak. Az eljárás abban hasonlít a fagyasztva szárításra, hogy mindkét esetben a nyomás csökkentésével érik el a víz forráspontjának csökkenését. Az egyik fő különbség abban van, hogy a fagyasztva szárítás során előre fagyasztott termékekből indulnak ki és a nyomást jellemzően 6 mbar alá csökkentik, míg a vákuum szárítás során a nyomás általában 30-60 mbar fölött van, ami körülbelül 20-30 °C-os víz forráspontjának felel

meg. Nagy hátránya ennek az eljárásnak a hosszú feldolgozási idő, 20-100 óra is lehet [36, 37].

Fluidágyas szárítás

A fluidágyas szárítás egy olyan folyamat, amelyben a magasabb hőmérsékletű gáz, általában levegő, olyan sebességgel áramlik át szilárd részecskék rétegén, hogy azok fluidágyként lebegjenek. Mivel a fluidizációs folyamat nagyon jó hőcserélő feltételekkel rendelkezik, a víz gyorsan elpárolog a szárított anyagból. A fluidágyas szárításhoz szükséges idő sokkal kevesebb – gyakran csak néhány perc – mint a fagyasztva szárításé, de már összehasonlítható a porlasztva szárításával. A viszonylag alacsony szárítási hőmérséklet nem okoz hőfeszültséget. A sejteket nem önmagában szárítják, hanem egy hordozóként vagy mátrixként alkalmazott segédanyaggal, amelyhez a sejtek tapadnak. A gyakorlatban erre a célra például búzaliszt, sovány tejpor, kazein, maltodextrin, keményítő, mikrokristályos cellulóz, inulin és nátrium klorid használható [38, 39]. Általában a mátrixanyagot először a szárítókamrába helyezik és fluidizálják; majd a baktériumszuszpenziót egy fűvókán keresztül a fluidizált mátrixra permetezzük. Egy másik lehetőség, hogy először granulátumot képeznek miután a nedves biomasszát összekeverték a mátrixanyaggal, majd fluidágyban szárítják. A mátrix anyagának kiválasztásakor fontos figyelembe venni a szárított bakteriális termék rendeltetését. Szem előtt kell tartani, hogy a kész probiotikus baktériumot tartalmazó mikrokapszula milyen késztermékbe kerül. Eltérő technológiai tulajdonságokkal bír például a mikrokristályos cellulóz és az inulin. Mivel inulin egy vízzoldható segédanyag, a beleágyazott mikroorganizmusok felszabadulási profilját csak a mikrokapszulára felvitt egyéb felszabadulást módosító bevonó anyagok fogják befolyásolni. Ezzel szemben a mikrokristályos cellulóz, egy vízzoldhatatlan segédanyag, ami az oldódás hiányában a mikroorganizmusokat eltérő módon szabadítja fel, így a kioldódási profilt aktívan képes befolyásolni. Önmagában is védelmet nyújthat a mikroorganizmusok számára a gyomorban való tartózkodás alatt, ezért például egy mikrokristályos cellulózra ágyazott probiotikus baktériumtörzseket tartalmazó joghurt vagy egyéb tejtermék viszonylag egyszerűen előállítható. Ezzel szemben az inulin alapú formulációhoz szükséges bevonó anyagot felhasználni. Előnye azonban az inulinnak, hogy prebiotikumként is funkcionál, tehát a felszabaduló baktériumok, azonnal egy oldott, tápanyagforrással teli közegbe kerülnek. [40].

A probiotikus baktérium törzseket tartalmazó mikrokapszulák szárításakor fellépő stresszfaktorok nagy mértékben csökkenthetők, ha megfelelő eljárást választunk ki, vagy olyan

segédanyagokat alkalmazunk, amelyek ezeken faktorok hatását képesek csendesíteni. A különböző eljárásokhoz, különböző segédanyagok választandók, melyet néhány példán keresztül a 3. táblázat mutat be [31].

Mikroorganizmus	Szárítási módszer	Védőanyag	[log CFU/g] szárítás előtt	[log CFU/g] szárítás után	Túlélés [%]	Ref.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Porlasztva szárítás	gumiarábikum 9% 1% β -ciklodextrin 1% lecitin	6.93	6.18	89.22	[41]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Porlasztva hűtés	Hidrogénezett pálmaolaj, 2% Tween 80	6.12	6.01	98.25	[41]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Porlasztva szárítás	zselatin 10%	9.95	9.06	91.55	[42]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Porlasztva szárítás	Tejsavó fehérje koncentrátum 20%	9.65	8.86	91.81	[42]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Porlasztva szárítás	Natív rizskeményítő 10%	9.26	8.98	53.24	[43]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Porlasztva szárítás	Inulin 15%	9.18	8.91	53.55	[43]
<i>Lactobacillus brevis</i> WK12	Fagyasztva szárítás	10%-os szójapor oldat	11.30	11.26	90.00	[44]
<i>Lactococcus lactis</i> WK11	Fagyasztva szárítás	10%-os szójapor oldat	11.30	11.27	94.00	[44]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Porlasztva szárítás	gumiarábikum 9% 1% β -ciklodextrin	10.12	7.57	74.81	[41]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Porlasztva hűtés	Hidrogénezett pálmaolaj 2% Tween 80	9.51	8.25	86.79	[41]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Porlasztva szárítás	Módosított keményítő 20%	9.65	8.64	89.53	[42]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Porlasztva szárítás	maltodextrin 20%	9.65	8.61	8.24	[42]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Porlasztva szárítás	Borsó fehérje izolátum 10%	9.95	8.55	86.52	[42]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Porlasztva szárítás	gumiarábikum 20%	9.65	8.17	84.69	[42]

3. táblázat A probiotikus mikroorganizmusok mikrokapszulázásának módszerei

1.6. Az alginát alkalmazása a mikrokapszulák előállítására

Az alginát a természetben előforduló poliszacharid, nagy mennyiségben használja az élelmiszer-, textil- és gyógyszeripar is, mint gélképző, zselésítő anyag. Az alginátot a leggyakrabban és legkönnyebben barnamoszatokból nyerik. Lehetőség van azonban alginátot termeltetni, módosítani bakteriális úton is.

1.6.1. Az alginát kémiai szerkezete

Az alginát β -D-mannuronsav és α -L-guluronsav monomere 1-4 glikozidos kötésével felépülő poliszacharid, mely vízben oldódik, nem toxikus és nincs irritáló hatása a szövetekre nézve. A polimer szerkezetét tekintve homogén és heterogén blokkokat tudunk megkülönböztetni a felépítő monomerek tekintetében. A homogén blokk csak mannuronsavat vagy guluronsavat tartalmaz, míg a heterogén blokk guluronsav és mannuronsav monomerek kevert szakaszaiból áll [45].

1.6.2. Az alginát előállításának lehetőségei

Az alginát előállítására két eljárást használnak. Az egyik a barnamoszataból való kivonás. Ebben az esetben a szárított moszatabot porítják, majd ásványisavas kezeléssel (általában sósav felhasználásával) kialakítják az alginsavat, ami egy viszkózus gumyszerű anyag. Ezt egy lúgos, nátrium-hidroxidos kezeléssel, vízzel oldható nátrium-algináttá alakítják. A következő lépésben a szűrt kivonatot nátrium- vagy kalcium-kloriddal keverik, aminek hatására az alginát kicsapódik [45].

A másik előállítási lehetőség a bakteriális bioszintézis. Erre a célra két baktériumot vizsgáltak. Az egyik, egy humán opportunistá patogén baktérium a *Pseudomonas aeruginosa*, a másik pedig a talajban élő *Azotobacter vinelandii*. A két baktérium által szekretált alginát között jelentős különbség van, ami annak tudható be, hogy a fiziológiai folyamataikban más célból választanak ki alginátot. Míg a *P. aeruginosa* nagy mennyiségű, a jól strukturált bakteriális biofilm képzéshez elengedhetetlen alginátot szekretál, addig az *A. vinelandii* jellemzően nagyobb szilárdságú, szorosabban kapcsolódó alginátot képez, amely a dehidratációtól védi. A bakteriális alginátok szintézise egy nagyon összetett biokémiai folyamat, melyet több ponton lehet befolyásolni, így tervezhetőbb kémiai szerkezetet és speciális igények kielégítésének megfelelő fizikiai-kémiai tulajdonságokat tudnak elérni [46].

1.6.3. Az alginát gélképző tulajdonságának felhasználása

Az alginát széles körű felhasználhatóságához nagyban hozzájárulnak a fizikai-kémiai tulajdonságai. Biokompatibilitása, biodegradabilitása, elhanyagolható toxicitása és jó reológiai tulajdonságai, kiváló gélképzővé teszi. Vizes oldata könnyen kezelhető, stabil gél képez vagy akár szilárd, félszilárd gyógyszerformák is előállíthatók belőle. A biomedicinában az alginátot nem csak gélképző segédanyagként használják fel. Befolyásolja a sebgyógyulást és a szövetregenerációt, így tapasztok, kötszerek gyakran használt összetevője [45].

Az alginát térhálós szerkezetét több módszerrel is ki lehet alakítani. Ide tartozik az ionos és kovalens kötésekkel kialakított kapcsolatok, a lézerrel vagy közeli infravörös fény indukált kötések [45].

Az ionos keresztkötés a leggyakrabban alkalmazott eljárás az algináttal való gélképzésre. Kétértékű kationok az alginát láncában lévő guluronsav monomerekkel kapcsolódnak össze, ezzel kialakítva a térhálós szerkezetet. Az eljárás egyszerűen és olcsón kivitelezhető, hátránya azonban a gélképzés nehéz szabályozása. A nem megfelelő körülmények között végzett kalciumionos gélképzés inhomogén szerkezetet eredményez. A keresztkötések kialakulását lassításával a gél szerkezete javítható. Az eljárásban alkalmazhatnak például foszfát tartalmú puffereket, amelyek kompetitív faktorként vannak a jelen és versengenek az alginát karboxil csoportjaival a kalciumion megkötéséért. Ezzel a módszerrel az alginát láncok között a keresztkötések lassabban, de egyenletesebben tudnak kialakulni [45].

Kovalens keresztkötésekkel képzett gélekben a kötések szintén az alginát karboxil csoportjai között alakulnak ki. Hátránya ennek a módszernek, hogy olyan reagenseket kell alkalmazni, amelyek toxikusak, így ezeket teljes mértékben el kell távolítani az eljárás során. Az ebben az eljárásban felhasznált polietilén-glikol-diaminnal (PEG-diamin) kialakított hidrogéleknek mechanikai tulajdonságait nagymértékben befolyásolta PEG-diamin mennyisége. A nagy PEG-diamin tömeghányaddal készített gélek csökkent rugalmasságot mutattak egy vizsgálat során. Amennyiben a PEG-diamin 27 m/m% fölött volt jelen a rendszerben, a keresztkötések között lévő molekulák mérete csökken, ezzel a gél rigiditása szignifikánsan nő [47].

A fény indukálta keresztkötések olyan enyhe körülmények között is kialakulnak, hogy érzékeny hatóanyagokkal vagy akár élő sejtekkel is lehet alkalmazni. A foto-polimerizációs eljáráshoz az alginát oldatát metakriláttal vagy hialuronánnal elegyítették és 514 nm-es argon

lézerrel, vagy 245 nm-es UV besugárzással indukálták a térhálós szerkezet kialakulását. Mindkét esetben szükség van fotoiniciáló segédanyagokra. A kiindulási állapotában viszkózus folyadék kovalensen térhálósodik, ez a gélképződés gyors lefolyású az üveg és teflon felületen, ezen kívül száraz és nedves szöveteken is. Ebben a folyamatban szilárd, átlátszó, lágy gél képződik [48].

Az alginát egy másik felhasználási lehetősége a különböző méretű részecskék képzésében van. Ezt a folyamat leggyakrabban az úgynevezett külső gélesedéssel megy végbe. Külső gélesedésről akkor beszélünk, ha az alginát rendszerbe külső forrásból lépnek be kationok és ezek komplexet képeznek az alginát polianionos szerkezetén keresztül. Az alginát részecskék előállításának legszélesebb körben elterjedt módja az alginát cseppenkénti bejuttatása valamilyen kationos oldatba [49]. A képződő részecskék fizikai tulajdonságait a cseppképzés folyamán alkalmazott eljárás paramétereivel lehet befolyásolni. Ezek a paraméterek a fűvóka mérete, az áramlási sebesség és a vibráció. A fűvókán keresztül kijuttatott folyadék lamináris áramlást mutat, azonban megfelelő amplitúdójú és frekvenciájú rezgéssel ez a lamináris áramlás megszakítható. Amennyiben az összefüggő folyadékáramot megszakítjuk, a szegmentumok gömb formát vesznek fel a felületi feszültségüknek köszönhetően, így kialakítva a mikrokapszula közel gömb formáját. A megfelelő áramlási sebesség fűvóka méretenként változó. Olyan áramlási sebességet kell kiválasztani, ahol megfelelően magas nyomás jön létre ahhoz, hogy a folyadék áramlása lamináris áramlásba menjen át, ne szakadjon meg az áramlás, de ne is legyen olyan gyors, hogy a vibráció ne tudja megszakítani. A fűvóka méret helyes megválasztásával akár 50 μm -nél kisebb és 500 μm -nél nagyobb mikrokapszulákat is elő lehet állítani, tehát elég széles mérettartományban lehet formulálni [50].

1.7. A kitozán szerepe a mikrokapszulák bevonásában

1.7.1. A kitozán szerkezete

A kitozán előállításához kiindulási anyagként használt kitin, az algináthoz hasonlóan egy természetben nagy mennyiségben előforduló poliszacharid. A kitint a legnagyobb mennyiségben a rákok és garnélák élelmiszeripari felhasználásból hulladékként hátramarad páncéljából nyerik. Ezt az élelmiszeripar számára hulladéknak számító mellékterméket tisztítják, majd kivonják belőle a kitint. A kivont kitint kémiai eljárásokkal tovább alakítják ezzel elérve a változatos mértékű dezacetilezettségi fokot és a polimer méretet. A dezacetilezés mértéke és a molekulatömeg is nagymértékben befolyásolja az előállított kitozán fizikai, kémiai

tulajdonságait. Ezen felül, az eltérő szerkezetből adódóan a biológiai aktivitásuk is változik.

1.7.2. A kitozán előállításának lehetőségei

A kitozán D-glükózamin és N-acetil-glükózamin monomerek random, β - (1-4) glikozidos kötéseivel kialakuló polimer [51]. A kitozán előállításának első lépése a kitin kivonása a különböző természetes kitin forrásokból. Erre a célra két eljárást használnak. Vagy kémiai vagy biológiai módszerekkel különítik el a kitint a további feldolgozás céljából. A kémiai módszerrel való kinyerés általában két lépésből áll. Ezek a lépések a demineralizáció és a fehérjementesítés. A lépések tetszés szerinti sorrendben végezhetőek, de gyakrabban használják demineralizációval kezdik, hogy ezzel is növeljék a fajlagos felületet, így javítva a fehérjementesítés hatékonyságát. A demineralizációs eljárás lényege, hogy a rákok, garnélák kitin páncéljában található vízben nem oldódó kalcium-karbonátot kivonják. Ezt szerves vagy szervetlen savakkal is megtehetik. Erre a célra a leggyakrabban használt sav a sósav, azonban környezetvédelmi okokból kifolyólag egyre gyakrabban használnak inkább citromsavat, ecetsavat, tejsavat vagy szénsavat [52-54]. A demineralizációs eljárások után a fehérjementesítést kell elvégezni. Ebben a lépésben a már szervetlen sóktól mentes kitint elválasztják a többi szerves vegyülettől, amely a páncélt alkotja. Jellemzően nátrium-hidroxidot vagy kálium-hidroxidot használnak a kellően lúgos oldat kialakításához, majd eljárástól függően szobahőmérséklet és 100 °C közötti hőmérsékleten végzik a fehérjementesítést [52, 53].

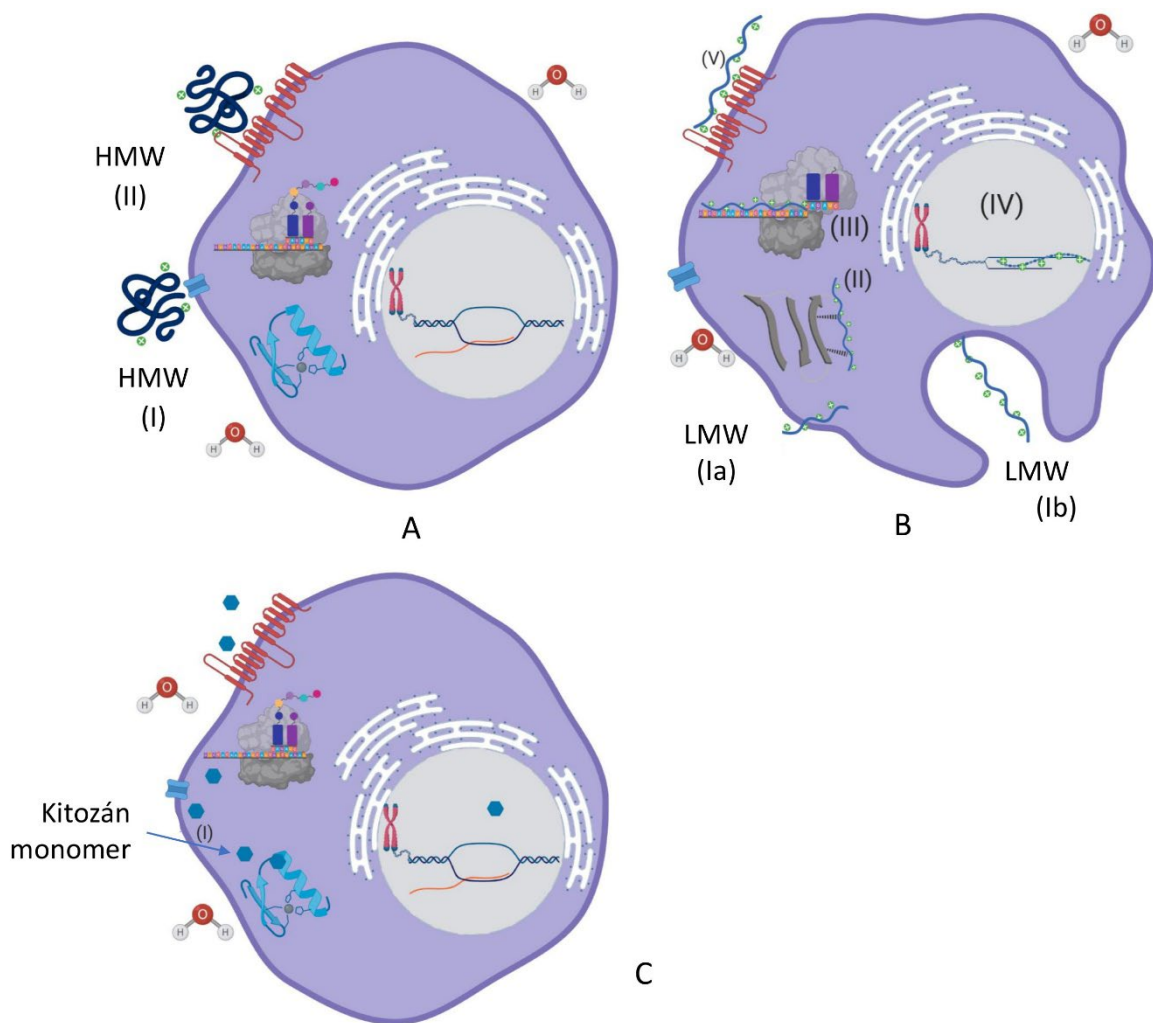
A biológiai extrakciót lehet enzimatis vagy fermentációs eljárással elvégezni. A két eljárás között a különbség abban van, hogy az enzimatis eljárásban használt enzimeket a fermentációs eljárásban baktériumok helyettesítik. Az enzimatis tisztítás során proteáz enzimeket használnak, amelyek optimális hőmérsékleten és pH-n működnek. Ez az eljárás ritkán képes arra, hogy a fehérjék 90%-ánál többet távolítsa el. A bakteriális fermentációs eljárás előnye, hogy megfelelő baktérium kultúrával a demineralizáció is megoldható. Ehhez tejsav termelő baktériumokat kell alkalmazni a proteáz termelők mellett. Ezek az eljárások sokkal költségesebbek a kémiai módszereknél, azonban előnyük, hogy környezetvédelmi szempontból sokkal kevesebb negatív hatással rendelkeznek, illetve mind az enzimatis, mind a fermentációs eljárásban a közeg, sok értékes aminosav keletkezik [53, 55].

A kinyert kitint ez után dezacetilezni kell a kitozán előállításához. Ebben a reakcióban N-acetilcsoportokat dezacetilezik és ezzel aminocsoportot kialakítva. Ezt az eljárást is lehet kémiai és biológiai módszerekkel végezni. A kémiai módszer a fehérje mentesítéshez hasonlóan nátrium-hidroxiddal, magas hőmérsékleten történí, azonban itt nagyobb koncentrációban

használják a nátrium-hidroxidot [52, 53]. A biológiai módszernél kitin-deacetiláz enzimet használnak, amelyeket gombákból nyernek. Ez a módszer nem elterjedt. Gátat szab az alkalmazásnak az, hogy az enzim kereskedelmi forgalomban nem kapható, a biomasszából nyert enzim aktivitása pedig nem kielégítő az eljárás elvégzéséhez [53, 56].

1.7.3. A kitozán felhasználása a gyógyszerkészítményekben

A kitozán felhasználása nagyon széles körű. Köszönhető ez a biokompatibilitásának és alacsony toxicitásának. Felhasználják többek között gyógyszeradagoló rendszerek formulálására, illetve vérzéscsillapító kötszerekben, valamint számos kutatás antimikrobiális hatást igazolt. Több hipotézis is van a kitozán hatásmechanizmusát tekintve (6. ábra). Feltételezhetően a kis molekulatömegű kitozán a bakteriális sejtfalon átjutva képes kötődni a DNS-hez, a nagy molekulatömegű kitozán gátló hatását pedig azzal magyarázzák, hogy a sejt körül egy áthatolhatatlan burkot alakít ki, ami meggátolja a sejtek anyagszállítását [57]. A nagy molekulatömegű kitozán mérete miatt nem tud bejutni a sejtbe; (6.A ábra II.) főleg extracellulárisan lép kölcsönhatásba a sejtrel, pl. blokkolja vagy felszakítja a sejtmembránt, mint polikation. Tekintettel a Gram-pozitív baktériumokban a teikolsavak, a Gram-negatív baktériumokban a lipopoliszacharid (LPS) és a gombákban a foszforilált mannozil oldal negatív töltésére, elektrosztatikus kölcsönhatások lépnek fel a pozitív töltésű kitozán és a mikroorganizmus sejtfelszíne között.



6. ábra A target sejt és a különböző polimerlánc-konfigurációjú kitozán közötti kölcsönhatás mechanizmusai a molekulatömeg különbségek szerint [52].

A nagy molekulatömegű kitozán (HMW) (A), az alacsony molekulatömegű kitozán (LMW) interakciójának mechanizmusai (B) és a monomer kitozán interakciójának mechanizmusai (C).

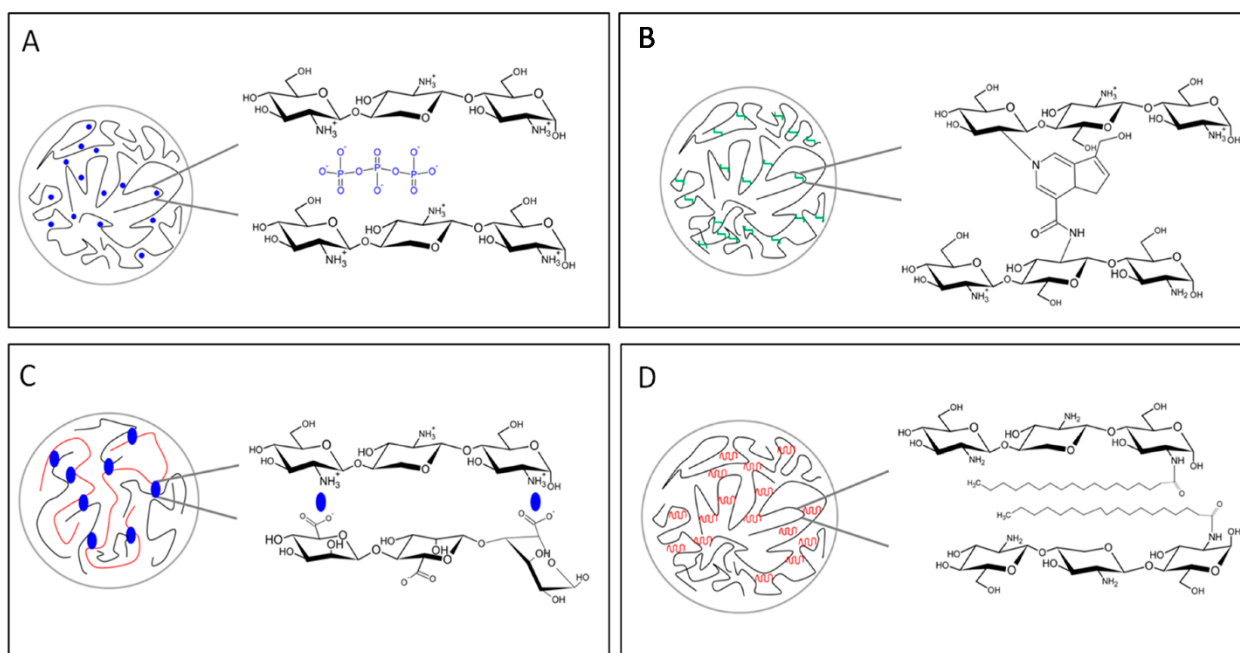
Az alacsony molekulatömegű kitozán és az oligo-kitozán befolyásolhatja a DNS/RNS vagy a fehérjeszintézist, miután a sejtfalon és a sejtmembránon keresztül a citoplazmába jutnak (6. B ábra, Ia,Ib mechanizmus). Ezenkívül az alacsony molekulatömegű kitozán és az oligo-kitozán gátolják a mitokondriális működést és az ATP-termelést (5.B ábra II.), valamint a kitozán keláttá alakítja a baktériumok túléléséhez szükséges ionokat és tápanyagokat [52, 58]. A kitozán monomernek mivel nincs molekulálánca, így nem tud kölcsönhatásba lépni a sejttel polikationként, viszont be tud lépni a sejtbe.

Az eddigi mechanizmus kutatások szerint, ha az molekulatömeg csökken, a molekulák elveszítik polimerlánc-konfigurációjukat, amint azt a 6.C ábra mutatja, és ennek következtében elveszítik bioaktivitásukat, például antimikrobiális hatásukat. Másrészt, ha az MW tovább

növekszik egy bizonyos tartományon túl, a polimer lánc konfigurációja feltekeredik, így csökken annak esélye, hogy kölcsönhatásba lépjenek a célsejttel [52].

A kitozán gyógyszer technológiai felhasználását eredetileg a szilárd gyógyszerformák segédanyagaként képzelték el, bevonóként, filmképzőként, mukoadhezív segédanyagként, szétesést elősegítőként, tablettakötőként és viszkozitásnövelőként. A kitozán gyógyszerhordozóként való alkalmasságáról szóló első vizsgálatok több mint húsz évre nyúlnak vissza, használatáról a kezdetek óta azt állították, hogy számos előnnyel jár, mint például a természetben való magas hozzáférhetőség, viszonylag alacsony toxicitás, és mindenekelőtt a pozitív töltésű amino csoportok jelenléte, amelyek lehetővé teszik mind a fizikai, mind a kémiai térhálósítást. A mikro- vagy nanorészecskék formulázását a felhasználás célja szabja meg. Például parenterális bejuttatással csak nanorészecskék adhatók be, mivel a mikrorészecskék az erek elzáródását okoznák, míg inhalációs alkalmazás esetén a mikrorészecskék hatékonysága jobb a nanorészecskék légutakból történő diffúziója miatt.

A mikrorészecskék előállításának legelterjedtebb eljárásai az extrudálás, az emulzió és a permetezési technológia. Az „extrudálás” technikát széles körben alkalmazzák, és a legegyszerűbb esetben tűvel ellátott fecskendővel is végrehajtható. Az emulziós technika abból áll, hogy egy folyadékot diszpergálnak egy másik, nem elegyedő folyadékban. A permetezési technológiák egy folyékony anyag (oldat, emulzió vagy szuszpenzió) felmelegített gázban (levegőben vagy nitrogénben) történő porlasztásán alapulnak, amit az oldószer (általában víz) gyors eltávolítása követ. A kitozán nanorészecskék előállításának fő mechanizmusai egy térhálósítási folyamaton, polielektrolit komplexek képződésén és hidrofób módon módosított kitozán önszerveződésén alapulnak (7. ábra). További lehetséges folyamatok közé tartozik a fordított micella, a deszolvatáció, a precipitáció/koacerváció és az emulziós eljárás [59].



7. ábra A kitozán gélképző mechanizmusai; ionos térhálósítás (A), kovalens térhálósítás (B), polielektrolit komplexképzés (C), önrendeződés (D) [59]

1.7.4. A bevonószer kiválasztásának szempontjai

Vizsgálataink kezdetén számos szakirodalmat tanulmányoztunk, melyekben a kitozánt, mint technológiai segédanyagot a probiotikus törzsek életképesség növelő szerepe miatt vizsgálták. A kitozánt leggyakrabban a gasztrointesztinális emésztő enzimek, a gyomorban uralkodó savas kémhatás és az epesavak elleni védelem miatt alkalmazzák a mikrokapszulák bevonására, és egyes esetekben kapszulamagként is [60]. A 4. táblázat néhány példán keresztül mutatja be a kitozán alkalmazását a probiotikumok mikrokapszulázása során.

Kísérleteink során nemcsak a savas kémhatás és az emésztőenzimek életképesség csökkentő hatását kívántuk kivédeni. A mikrokapszula további feldolgozása során, a takarmánnyal történő keverést követően az extrudálás alatt magas hőmérsékletű (80-100°C-os) gőzzel kerül közvetlenül-közvetetten érintkezésbe 1 perc körüli időtartamra. Ezt a hőhatást kívántuk csökkenteni erre alkalmas bevonattal, valamint a mikrokapszula fajlagos méretének növelésével. Néhány publikáció a probiotikus törzsek a hőrezisztenciáját vizsgálja különböző mikrokapszulázási protokollok alapján. Az élelmiszeriparban alkalmazott probiotikumokat az élelmiszer feldolgozása során számos hőhatás éri a fagyasztástól a magas hőmérsékleten történő kezelésig. Ezért e területen kiemelt jelentőségű a hőrezisztencia vizsgálata. Cheow és munkatársai nagy sűrűségű, biofilmszerű *Lactobacillus rhamnosus*-t tartalmazó alginát és

karragén alapú mikrokapszulákat képeztek, melyet kitozánnal vontak be [34]. A planktonikus, azaz egysejt rendszerű baktérium szuszpenziót homogenizáltak a mikrokapszula anyagával, majd a mikrokapszulázást követően megfelelő körülmények között kolonizációt és biofilmképzést indukáltak a mikrokapszulán belül. A planktonikus, azaz az egysejt rendszerű beágyazás a biofilmszerű, nagy sejtsűrűségűvel szemben kevésbé bizonyult hőtoleránsnak magas hőmérsékleten, míg az alacsony hőmérsékletű tárolás esetén és a savrezisztencia tekintetében a nagy sűrűségű biofilmszerű mikrokapszulák a szimulált gyomornedvben történő kioldása során nem figyeltek meg életképesség növekedést. Nem vizsgálták azonban a kitozán bevonás szerepét, minden vizsgált formuláció kitozánnal bevont volt.

Egy másik kutatócsoport azonban vizsgálta a kitozán termorezisztenciában betöltött szerepét [61]. *Lactobacillus plantarum* törzs mikrokapszulázását végezték alginát, xantán gumi és alginát/xantán gumi mikrokapszula magban, melyeket kitozánnal vontak be. Az alkalmazott polimer kombinációknak felvették a DSC termogramját, melyben a kitozán egyik jellegzetessége, hogy a polimereknél jellemző üvegesedési hőmérséklet nem jelentkezik az olvadáspontig. Az üvegesedési hőmérsékleten a polimerek mechanikailag instabillá válnak, mely a bevonat intakt jellegét csökkenti. Ez a kitozán esetében nem jellemző, illetve az anyag bomlása korábban bekövetkezik, mint ahogyan a mechanikai instabilitás bekövetkezne. A kitozán termorezisztencia növelő szerepe valószínűleg ezen tulajdonságának tudható be, ezért választottuk bevonószerként a probiotikumok mikrokapszulázása során.

Mikrokapszulázott baktérium	Kapszula mag	Bevonat	Hivatkozás
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i>	alginát	kitozán	[62]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	alginát	kitozán	[63]
<i>Bacillus licheniformis</i>	alginát, kitozán	—	[64]
<i>Bifidobacterium longum</i>	alginát	N,O-karboximetil-kitozán	[65]
<i>Lactobacillus casei</i>	alginate, κ-carragén, gellán gumi, xantán gumi	xantán gumi, kitozán	[66]
<i>Bifidobacterium breve</i>	PLGA/alginát	kitozán	[67]

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	xantán/kitozán	—	[68]
<i>Saccharomyces boulardii</i>	alginát	kitozán	[69]

4. Táblázat A kitozán alkalmazása a probiotikus törzsek mikrokapszulázása során

1.7.5. Ellentmondásos eredmények a probiotikus mikrokapszulák előállítása során alkalmazott kitozán esetén

Érdekes azonban, hogy a PubMed keresőbe beírva az „antimicrobial effect of chitosan” kifejezést, 6006 publikációt adott meg, mely publikációk száma a 2000 években kezdett jelentősen növekedni. Ugyanakkor a „chitosan microencapsulation, probiotic bacteria” kifejezésre 54 publikációt hoz és ezen publikációk 2004 után jelentek meg. Látható, tehát, hogy miközben a kitozán antimikrobiális hatásának vizsgálata ösztönzi a kutatókat miként lehet ezt a kedvező hatást fokozni és alkalmazni, addig a probiotikus készítmények technológiai fejlesztései során ezen ismeretek ez idáig figyelmen kívül maradtak. A 4. táblázatban bemutatott formulációk esetében a savrezisztencia és hőrezisztencia tekintetében minden esetben kedvezőbb életképességet eredményezett a kitozán a kontrollként alkalmazott mikrokapszula típusokhoz viszonyítva, függetlenül a kontroll mikrokapszulák összetételétől.

2. Célkitűzés

PhD kutatómunkám célja:

1. Probiotikus baktérium törzsek (*E. faecium*, *B. bifidum*, *L. plantarum*) életképességének vizsgálata és annak növelése, az állati takarmányok formulálásakor fellépő hőhatások és az *in vivo* gasztrointesztinális traktusban megjelenő körülmények között. Alginát alapú mikrokapszula formulálása, amely a probiotikus törzsek hordozó rendszereként funkcionál. A probiotikus mikrokapszulák sav -és hőrezisztenciáját kitozán bevonással terveztük javítani. Vizsgálni kívánjuk a sejtek életképességét és termotoleranciáját száraz és nedves hőkezelés mellett.
A kutatómunka kezdeti szakaszában kapott nem várt eredmények miatt a további vizsgálatainkat kizárólag a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulákkal végezzük.
2. A nem várt eredmények feltárása érdekében a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulákat nemcsak kitozán bevonattal, hanem a mikrokapszulák egy másik csoportját Eudragit L100-55 bevonattal látjuk el. A bevonás hatékonyságának és intakt jellegének vizsgálatához a bevonat nélküli és a bevonattal rendelkező mikrokapszulák jellemzését fény- illetve fluoreszcens mikroszkóppal, valamint a felületi jellemzők vizsgálatát pásztázó elektronmikroszkóppal (Scanning Electron Microscope, SEM) terveztük elvégezni. Az elemanalízis elvégzése, hogy meghatározzuk a mikrokapszulák felületén kialakult bevonat minőségét.
3. Az *in vivo* körülmények modellezésére kioldódási vizsgálatokat végzünk mesterséges gyomor- és bélnedvben a bevonataiban különböző mikrokapszula formulációkkal. A kioldódási kísérlet mintáit kétféle módszerrel tervezzük vizsgálni. A minta leoltását követően CFU meghatározással az életképességet, áramlási citometriával pedig az élő/holt sejtek arányát, illetve a sejtek felszabadulási profilját határozzuk meg.
4. A vizsgálataink során alkalmazott kis molekulatömegű kitozánt FITC-el jelöljük, hogy meghatározzuk a leoldódó kitozán mennyiségét.
5. A további vizsgálatainkat három, különböző molekulatömegű kitozánnal végezzük (LMW, MMW, HMW) hogy megvizsgáljuk az eddigi eredmények alapján feltételezhető interakciót a baktérium sejtek és a kitozán között. Mindhárom kitozánnal *L. plantarum*-ra meghatározzuk a MIC értéket, majd ezt követően megvizsgáljuk az ölési kinetikát, valamint ugyanezen mintákkal áramlási citometriával az élő/holt sejtek arányát.
6. Fontosnak tartjuk megismerni a kitozán interakcióját *L. plantarum* sejtekkel, hogy

érthetővé váljon az antibakteriális hatás mechanizmusa, melyet a koncentráció és a kitozán molekulatömegének függvényében vizsgálunk. Ezen mechanizmus elemzésére membránintegritást, és zéta potenciál változást vizsgálunk. Konfokális mikroszkópiával a FITC-eljelölt kitozán alkalmazásával vizualizáljuk a kitozán interakcióját a *L. plantarum* sejtfallal.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

Vizsgálataink során három probiotikus baktérium fajt használtunk, úgy, mint a *L. plantarum subsp. plantarum* (ATCC 14917) az ATCC (American Type Culture Collection) -től (Manassas, VA, USA), a *B. bifidum*-ot és az *E. faecium*-ot, amelyet Dr. Remenyik Judit (Debreceni Egyetem, MÉK, Élelmiszertechnológiai Intézet, Debrecen) biztosított számunkra. A mikrokapszula magok formulálásához alacsony viszkozitású nátrium-alginát port a Donauchemtől (Budapest), a bevonáshoz az Eudragit L100-55-öt az Evonik Industries AG-től (Niederkassel, Németország) vásároltuk. Alacsony molekulatömegű kitozánt (50–190 kDa; 20–300 cp; LMW), közepes molekulatömegű kitozánt (200–800 cp; MMW), nagy molekulatömegű kitozánt (310–375 kDa; 800–2000 cp; HMW), a foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS), a Hank's-féle pufferelt sóoldatot (HBSS), formaldehid 37% -os oldatot FITC-t a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A SYTOX Green Nucleic Acid Stain áramlási citometriához és az FM® 4–64 festéket a Thermofischer Scientific -től (Budapest) vásároltuk. A Torpac® zselatin kapszulákat a Torpac Europe BV-től (SG Heerlen, Hollandia) rendeltük. A sejtleletképeség vizsgálatához Columbia Blood Agart (CliniChem Ltd., Budapest), MRS agart (Merck, Budapest) és Bifidobacteria Selective Mediumot (Merck, Budapest) használtunk.

3.2. Alginát mikrokapszulák előállítása és bevonása

A három probiotikus baktérium törzs - *L. plantarum*, *B. bifidum* és *E. faecium* - felhasználásával egykomponensű mikrokapszulákat készítettünk, melyek csak egyfajta probiotikus törzset tartalmaztak. A probiotikus baktériummal betöltött alginát mikrokapszulákat gélesedési módszerrel állítottuk elő. Planktonikus baktériumszuszpenzióból (1,5 10⁹ CFU/ml) 1 ml -t adtunk 200 g 2 m/m% -os steril nátrium-alginát oldathoz és homogenizáltuk. Buchi 395-Pro készüléket (Buchi, Svájc) alkalmaztuk a vibrációs fúvóka technológiához. A kívánt méretű mikrokapszulák formulálásához az optimális működési körülményt 1800 Hz-es rezgési frekvenciában, 1000 V feszültségben, 150 µm fúvókaméretben és 4,5–5 ml/perces áramlási sebességben állapítottuk meg a beállítási kísérleteink során. A fúvókából távozó, külön álló cseppeket, 500 ml 0,1 M kalcium-klorid -oldatba juttattuk és a 30 perces szilárdulási idő letelte után, további feldolgozása következett. A nedves mikrokapszulák

kitozán bevonatát 200 ml 0,4 m/m%-os kitozán oldat hozzáadásával végeztük. Az alacsony molekulatömegű kitozánt 10 v/v% ecetsav -oldatban oldottuk steril körülmények között. A nedves mikrokapszulákat a kitozán oldatban 30 percig kevertettük, majd 0,1 M kalcium-klorid oldattal mostuk, hogy eltávolítsuk a mikrokapszulához nem kötődött kitozánt. A nedves, bevonat nélküli alginát mikrokapszulákat és a kitozánnal bevont mikrokapszulákat 24 órán keresztül liofilizáltuk, szárítás céljából.

A *L. plantarum*mal töltött mikrokapszulákat fagyasztva szárítás után Eudragit L100-55-el vontuk be. Az Eudragit bevonatot csak a *L. plantarum* felhasználásával készült mikrokapszulákon hoztuk létre. A bevonást Mini-GLATT + Mikro-Kit fluidizációs berendezéssel (GLATT GMBH, WEIMAR, Németország) végeztük, melybe 10,0 g mikrokapszulát töltöttünk és 20,0 ml 96 v/v% etanos EUDRAGIT L100-55 oldattal (10 tömeg%) fluidizáltuk. A fluidizációs eljárást a következő módszer szerint hajtottuk végre. A működési paramétereket konstans értéken tartottuk, a bemeneti légnyomás 0,10 bar volt és a termék hőmérsékletét 35–37 °C -on temperáltuk úgy, hogy 45 °C-os hőmérsékletű bemeneti légárammal dolgoztunk. A bevonó oldatot szobahőmérsékleten alkalmaztuk és egy kétcsatornás fűvókán (belső betét átmérője 0,3 mm) permeteztük. A perisztaltikus pumpán beállított áramlási sebesség (Flocon 1003; Berlin GmbH; Németország) 0,81 ml/perc volt és a porlasztó nyomását 0,26 bar-ra állítottuk be. A bevont részecskéket addig szárítottuk, amíg az ágy hőmérséklete el nem érte a 39 °C -ot a 45 °C -on tartott bemeneti légáram mellett. A mikrokapszulák előállítása és bevonása a Gyógyszertechnológiai Tanszéken történt. A fluidizációs eljárás Dr. Haimhoffer Ádám és Dr. Gál Bernadett segítségével történt.

3.3. Az eltartási idő hatása az életképességre

A 3.2. fejezetben leírtak szerint előállított alginát alapú mikrokapszulákba ágyazott *L. plantarum* tárolási idejének a baktérium életképességére gyakorolt hatását vizsgáltuk. A liofilizálás során kapott száraz mikrokapszulákat 4 °C-on tároltuk. A kísérletben csak a bevonat nélküli alginát mikrokapszulákból végeztünk kioldást és leoltást a mikrokapszula előállításától számított 10., 25., 45. és 75. napon. Azonos mennyiségű, 25 mg bevonat nélküli alginát mikrokapszulát 500 µl steril fiziológiás sóoldatban, 60 percig, 37 °C-os termosztátban mozgattuk. Majd a mintákat 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltunk 1 percig, a felülúszókból gyűjtött mintákat átadtuk az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben Dr. Kovács Renátónak CFU meghatározásra. A CFU meghatározást a 3.5. módszerleírás szerint végezték. A mikrokapszulákból minden időpontban három kioldást végeztünk.

3.4. A bevont és bevonat nélküli mikrokapszulák jellemzése

A nedves mikrokapszulák morfológiáját fénymikroszkóppal (Zeiss Axio Scope) illetve fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk. A mikrokapszulák méretét a ZEN 2012 v.1.1.0.0 szoftverrel elemeztük ki (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Németország). A száraz mikrokapszulák morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal jellemeztük (SEM). A SEM vizsgálat előtt a minták felületén aranyporlasztott bevonat nem rakódott le. A méréshez vákuum és alacsony, 5 kV gyorsítófeszültség volt szükséges. A pásztázó elektronmikroszkópos képeket Hitachi Tabletop Microscope 3030 (TM3030) (Hitachi, Tokió, Japán) készülékkel készítettük. A minták kémiai összetételének meghatározásához Bruker EDX 70 detektort használtunk.

A SEM felvételek a Debreceni Egyetem Műszaki Karán készültek, Dr. Budai István segítségével.

3.5. Sejtéletképességi vizsgálat

Az élő sejtek számát az előzetesen kezelt mintákból kvantitatív tenyésztéssel határoztuk meg. A 100 µl-es alikvotokat közvetlenül a különböző kezelések után vettük ki; ezt követően a mintákkal 10-szeres sorozat hígítást végeztünk, és az *E. faecium* mintákat Columbia Blood Agar (CliniChem Ltd., Budapest, Magyarország), a *L. plantarum* mintákat MRS agar (Merck, Budapest, Magyarország) és a *B. bifidum* mintákat Bifidobacteria Selective Medium (Merck, Budapest, Magyarország) táptalajra szélesztettük (4x0,03 ml). Az agarlemezeket a *L. plantarum* és a *B. bifidum* esetében három napig 37 °C -on, az *E. faecium* esetében 37 °C -on 5 v/v% CO₂ jelenlétében két napig inkubáltuk az anaerob kamrában. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. A baktériumok tenyésztése és az életképességi vizsgálatok, valamint a CFU meghatározások a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében történtek. A vizsgálatokat és a baktériumok fenttartását Dr. Kovács Renátó, valamint Kovács Fruzsina és Balla Noémi PhD hallgatók végezték.

3.6. Termotolerancia teszt száraz és nedves hőkezelés mellett

A probiotikus baktériumok hőrezisztenciájának vizsgálatára két száraz hő (80 °C, 100 °C) és egy nedves hő (80 °C) módszert végeztünk. A kísérletet a bevonat nélküli alginát és a kitozánnal bevont mikrokapszulákkal végeztük el, így probiotikumonként 2, összességében 6 mintacsoporttal. A hőterhelési teszt időtartamát 80 °C -on száraz hőn 10 percre, 100 °C -on 5

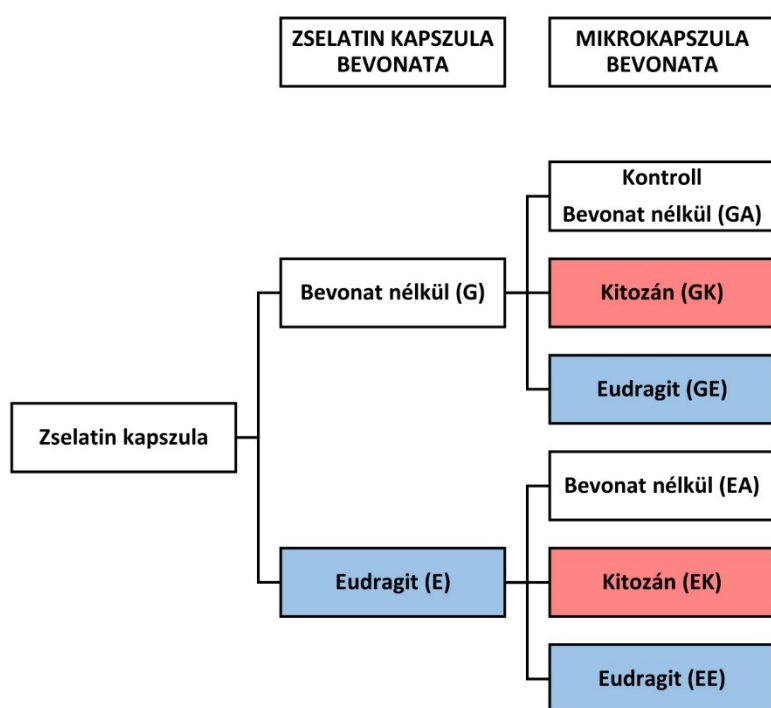
percig, 80 °C -on nedves hõn pedig 1 percben határoztuk meg. A száraz hõteszteket levegõ áramoltatásos hõlégsterilezőben végeztük, míg a nedves hõtesztnél a mintákat vízfürdőben inkubáltuk úgy, hogy 30 mg liofilizált mikrokapszulára 2 ml 80 °C-ra melegített pepton vizet pipettáztunk, majd egy percre 80 °C -ra temperált vízfürdőbe merítettük. Az inkubálás után a mintákat 20 °C-os vízfürdőben lehûtöttük, majd a mintákat 10 másodpercig ultrahanggal kezeltük és meghatároztuk a CFU/mg értéküket. A módszer kiválasztásánál a fő szempont az volt, hogy alkalmas legyen a pelletálási körülmények szimulálására. A kísérleteinket a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük.

3.7. Kioldódási vizsgálat szimulált gasztrointesztinális folyadékban

Ebben a kísérletben csak a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulákkal dolgoztunk. A mikrokapszulákat három csoportra osztottuk A: bevonat nélküli alginát; K: kitozánnal bevont és E: Eudragit L100-55 bevont minták. Torpac® zselatin kapszulákba (9el méretű) 30 mg mikrokapszulát töltöttünk kézi kapszulatólítóval (8. ábra). A zselatin kapszulába töltött mikrokapszula csoportokat további két csoportra osztottuk, Eudragit L100-55-el bevont és bevonat nélküli zselatin kapszulára. A zselatin kapszulák bevonását kézzel végeztük, az Eudragit L100-55-öt acetóban oldottuk és a bevonáshoz 20 m/m%-os oldatot használtunk. A mikrokapszulával töltött zselatin kapszulákat a bevonószerbe merítettük, majd levegõn 4 órán át szárítottuk. A kioldódási vizsgálatot mesterséges gyomor- (pH 2,0) és bélnedvekben (pH 7,4) végeztük. A steril PBS pH-ját (pH 7,4) foszforsavval 2,0-ra állítottuk be, és mesterséges gyomornedvként használtuk. A fent említett mikrokapszula és zselatin kapszula csoportokból adódóan a bevonatoktól függõen összesen hat különbözõ készítményt vizsgáltunk (9. ábra) A GA volt a kontroll csoport, amely bevonat nélküli alginát mikrokapszulát tartalmazott, bevonat nélküli zselatin kapszulába töltve. A GK a kitozán bevonatú mikrokapszula bevonat nélküli zselatin kapszulában, a GE az Eudragit L-100-55-el bevont mikrokapszula bevonat nélküli zselatin kapszulában. Az EA az Eudragit L-100-55-el bevont zselatinkapszulába töltött alginát mikrokapszula, az EK a kitozánnal bevont mikrokapszula Eudragit L100-55-el bevont zselatinkapszulában és az EE az Eudragit L100-55-el bevont mikrokapszula, Eudragit L100-55-el bevont zselatinkapszulában. A kísérletet a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük. A zselatin kapszulák töltésében és bevonásában Dr. Gál Bernadett és Dr. Vasvári Gábor volt segítségemre.



8. ábra Manuális kapszulatöltés [70]



9. ábra A különböző bevonatokkal formulált vizsgálati csoportjaink

Minden zselatin kapszulát ($n=3$) 5 ml mesterséges gyomor folyadékban 60 percig rázóinkubátorban 37 °C-on inkubáltuk, majd 500 µl mintát vettünk, 10 másodpercig ultrahanggal kezeltük, és meghatároztuk a CFU/mg értéket. A pH 2,0 közeget 60 perc elteltével eltávolítottuk, és mesterséges bélnedvvel helyettesítettük. A bélben való kioldódás szimulálását 60 percig végeztük, majd 500 µl-es mintákat ultrahanggal kezeltünk 10 másodpercig és meghatároztuk a CFU/mg értéket. A leoltások és a CFU meghatározások szintén a DE ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében történtek, Dr. Kovács Renátó segítségével.

3.8. Sejtfelszabadulási profilok és élő/holt sejtek meghatározása

Lactobacillus felszabadulását szimulált gyomor- (pH 2,0) és bélnedvben (pH 7,4) vizsgáltuk. Ugyanannyi bevonat nélküli alginát mikrokapszulát, valamint kitozán és Eudragit L-bevonatú mikrokapszula mintát mértünk ki (25 mg), és 500 µl pH 2,0 kioldó közeget adtunk hozzá. A mintákat rázóinkubátorban 37 °C-on inkubáltuk, majd a 60 perces inkubációs idő után azonos mennyiségű mintákat (50 µL) vettük a savas közegből. Ezután a savas oldóközeg pH-ját 35 µl 2,7 tömeg%-os nátrium-hidroxiddal semlegesítettük; így a pH-t 7,4-re állítottuk be. További mintákat a teljes kioldási idő 120., 180. és 240. percében vettünk. Minden mintavétel után az oldóközeget 50 µL-el kiegészítettük. A mintákat 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltunk 1 percig, a felülúszókat összegyűjtöttük, és a felszabaduló baktériumsejteket SYTOX Green reagenssel festettük 1 µM végső koncentrációban 30 percig 37 °C-on. A mintákat Guava Easy Cyte 6HT-2L áramlási citométerrel (Merck Ltd., Darmstadt, Németország) analizáltuk. Zöld (525/30 nm) és vörös (695/50 nm) fluoreszcencia csatornákat használva a sejteket a zöld és a piros pont diagramon ábrázoltuk. A felszabadult sejtszámot és az élő/holt sejtek arányát GraphPad Prism 5.0 szoftverrel értékeltük. Az áramlási citometriás méréseket a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük, Dr. Fenyvesi Ferenc segítségével.

3.9. FITC-jelölt kitozán szintézise

A FITC-vel jelölt kitozánt egy korábban kidolgozott módszer szerint szintetizáltuk és tisztítottuk [71]. A kitozán oldatot úgy állítottuk elő, hogy a kitozánt 100 ml 0,1 M ecetsavoldatban 1 m/v% koncentrációban feloldottuk. A savas vizes oldathoz FITC-oldatot (2 mg/ml metanolban, 50 ml) adtunk, majd további 100 ml dehidratált metanolt kevertünk össze. A reakcióelegyet 3 órán át sötétben tartottuk, és a FITC-el jelölt kitozánt 1 liter 1 M NaOH-dal kicsaptuk. A csapadékot szűrtük és 4 liter ionmentesített vízzel dializáltuk (Spectral/Por, Standard RC Tubing, 3,5 kD), majd naponta újratöltöttük szintén ionmentesített vízzel, amíg a FITC már nem volt jelen a dializáló edényben, amit mikrolemezes fluoriméterrel (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies Offenburg, Németország) ellenőriztünk 492 nm-es gerjesztésnél és 520 nm-es emissziós hullámhosszon. A dialízissal tisztított terméket ezután fagyasztva szárítottuk. A jelölés hatékonyságát fluorimetriásan határoztuk meg. Az FITC-t 50:50 arányú, pH 6,0 víz : propán-1,2-diol elegyében oldottuk, és standard hígításokat készítettünk. A maximális fluoreszcencia intenzitás adatait a FITC koncentráció függvényében kalibráltuk. A szabad amin és a FITC-jelölt molaránya 7,8:1 volt.

A kitozán FITC jelölését Dr. Bakai Bereczki Ilona végezte a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészi Kémiai Tanszékén. A tisztítási folyamatot és a jelölési hatékonyság meghatározását a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük.

3.10. Az oldott kitozán bevonat meghatározása

FITC-jelölt kitozánt használtunk a mikrokapszula kitozán bevonatának mennyiségi meghatározására. A mikrokapszulák és a bevonat elkészítésének lépései megegyeztek már korábban ismertetett eljárásokkal, azonban 25%-ban FITC-el jelölt kitozánt használtunk a bevonáshoz használt kitozán oldat elkészítéséhez (200 ml 0,4 m/m%-os). A bevont mikrokapszulákat liofilezéssel szárítottuk. Az oldódási tesztet a szárított mikrokapszulákkal végeztük, amelyek protokollja szintén megegyezik a korábban leírtakkal. Összesen 25 mg szárított kitozánnal bevont mikrokapszulát mértünk be, és az oldódást 500 µl pH 2,0-s kioldóközegben vizsgáltuk 37 °C-on 60 percig; majd az oldóközeg pH-ját 7,4-re emeltük, és a mintákat 240 percnél vettük. A minták fluoreszcenciáját fluoriméterrel vizsgáltuk, és a FITC-vel jelölt kitozán oldat hígítási sorozatát kalibráltuk. A meghatározást a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük.

3.11. A kitozán és Eudragit oldatok készítése az ölési kinetika vizsgálatához

A mikrokapszulák kioldáskor általában 25 mg/500 µl kioldóközeg arányt alkalmaztunk. Az Eudragittal történő bevonása során átlagosan 20% tömegnövekedést számoltunk, így a kioldásra mért minták Eudragit bevonatának mennyisége megközelítőleg 4,38 mg a számítások alapján. Ezt a mennyiséget 500 mikroliternyi PBS-ben oldottuk ki, tehát a koncentráció így 8,77 mg/ml. Az Eudragit tartalmaz nátrium-lauril-szulfátot, melynek a koncentrációja a kioldásra bemért mennyiségekben: 0,0675 mg/ml; valamint tartalmaz még Polysorbat 80-t 0,2 mg/ml koncentrációban a kioldó közeg.

Az ölési kinetikai vizsgálatot a MIC érték hiányában ezen koncentráció tartományban végeztük, feltételezve, hogy a kioldóközegben a 8,77 mg/ml koncentráció alakul ki. Készítettünk egy 40 mg/ml koncentrációjú vizes diszperziót, melyben a bevonóanyag ismert oldékonysági tulajdonságok szerint nem oldódik jól. Ennek a „törzsoldatnak” a hígításával 10 mg/ml és 2,5 mg/ml koncentrációjú közeget készítettünk, mely lényegesen kevésbé volt opaleszkáló, finom üledék sem volt jellemző.

A kitozán vízben rosszul oldódik, azonban a kémhatás csökkentésével az ioinizáció

fokozásával a polikationos állapotban oldatba vihető. A maximálisan elérhető koncentráció a szakirodalom szerint 1%. Valamennyi vizsgálathoz a különböző molekulatömegű kitozánokat 10 v/v%-os ecetsavban oldottunk, és 1,0 m/v%-os kitozán oldatokat készítettünk. Ezután a hígításokat steril 0,9 tömeg%-os nátrium-klorid oldattal végeztük, és a pH-t 6,5-re állítottuk be.

3.12. MIC értékek meghatározása

A *L. plantarum* kis molekulatömegű (LMW) kitozánnal, közepes molekulatömegű (MMW) kitozánnal és nagy molekulatömegű (HMW) kitozánnal szembeni érzékenységet BHI (CliniChem Kft., Budapest, Magyarország) tápközegekben határoztuk meg. Mindhárom molekulatömegű kitozán esetében mikrodilúciót végeztünk, a minták koncentrációja 0,0004 és 0,25 m/v% közötti volt. Egy éjszakán át BHI tápközegekben tenyésztett friss *L. plantarum* tenyészetet használtunk a baktériumszuszpenzió elkészítéséhez, melynek koncentrációját steril 0,9%-os NaCl-ban állítottuk be (a végső optikai denzitás 600 nm-en 0,5 volt). Utána 100 µl *Lactobacillus* szuszpenziót, amelyet előzőleg 1:500 arányban hígítottunk BHI tápközegekben, 100 µl kitozán oldattal, mikrolemezen kevertünk össze. Ezután a lemezeket 48 órán át 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében inkubáltuk. A MIC értéknek tekintettük a leolvasás során azt a legalacsonyabb koncentrációt, amely legalább 50%-os növekedésgátlást fejt ki a kitozánnal nem kezelt kontroll leoltáshoz képest. Ezeket a kísérleteket háromszor elvégeztük és a három független leoltás eredményének átlag értékét fogadtuk el MIC értéknek. A kísérletet és a MIC érték meghatározását a DE ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében Dr. Kovács Renátó végezte.

3.13. Az ölési kinetika vizsgálata CFU-meghatározással (Time-kill Assay)

A MIC meghatározás során használt mikrodilúciók eredményei alapján, a különböző kitozán vegyületek ölő aktivitását 10 ml BHI végtérfogatban határoztuk meg 0,125 m/v%, 0,015 m/v% és 0,003 m/v% kitozán koncentráció mellett. A kiindulási baktérium szuszpenzió $4-4,5 \times 10^4$ CFU/ml volt, a 100 µl-es mintákat 0, 4, 8, 12 és 24 óra elteltével vettük ki; ezt követően a mintákból tízszeres sorozathígítást készítettünk, és MRS (Man, Rogosa és Sharp) táptalajra (Merck, Budapest, Magyarország) szélesztettük (4×30 µL), majd 37 °C-on 48 órán át 5% CO₂-ban inkubáltuk. A különböző kitozán koncentrációkat baktericidnek tekintettük, ha az élő baktérium sejtszámban $\geq 3 \log_{10}$ csökkenést okoztak a kezdeti leoltáshoz képest.

Az idő ölési vizsgálatot a korábban használt Eudragit L100-55 bevonat anyagával is

elvégeztük. Ehhez az Eudragitből 2,5 mg/ml, 10 mg/ml és 40 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk. A kísérletet és leoltásokat a DE ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében Dr. Kovács Renátó végezte.

3.14. Élő/holt sejtek arányának és sejtszámának vizsgálata áramlási citometriával

Az idő-ölési vizsgálattal (ölési kinetika) kapott összes mintát áramlási citometriával is elemeztük. A mintákat 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 1 percig, a felülúszókat összegyűjtöttük, és a baktériumsejteket végső koncentrációban 1 μ M SYTOX Green reagenssel festettük 30 percig 37 °C-on. A mintákat Guava Easy Cyte 6HT-2L áramlási citométerrel (Merck Ltd., Darmstadt, Németország) analizáltuk. Zöld (525/30 nm) és vörös (695/50 nm) fluoreszcencia csatornákat használva a sejteket a zöld és a piros pont diagramon ábrázoltuk. Az élő/holt baktériumsejtek arányát értékeltük. A citometriás méréseket a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük, Dr. Fenyvesi Ferenc segítségével.

3.15. Membránintegritási vizsgálat

A *L. plantarum* membránintegritását a felszabaduló anyagok 260 nm-en történő mérésével vizsgálták egy korábbi publikációban, melynek alapján állítottuk össze a kísérleti protokollt [72]. A baktérium előtenyészetet 5 ml BHI tápközegben tenyésztettük 37 °C-on 18 órán át 2,3 Hz rázási frekvencián, 0,9%-os NaCl steril oldattal 0,6 optikai sűrűsége hígítva 640 nm-en (OD₆₄₀). Különböző koncentrációjú 0,1, 0,01 és 0,001 m/v%-ban, kis, közepes és nagy molekulásúlyú kitozán oldatokat adtunk a baktérium szuszpenziókhöz 1:1 térfogatarányban. A metabolikus anyagok felszabadulását Multiskan Go (ThermoFisher) mikrolemez-leolvasóval vizsgáltuk 260 nm-en 10 percenként 180 percig.

3.16. A kitozán kölcsönhatás vizsgálata konfokális lézeres pásztázó mikroszkóppal

Különböző koncentrációjú kitozán oldatokat (0,1, 0,01, 0,001 m/v%) kevertünk össze baktériumszuszpenzióval 1:1 térfogatarányban és a mintákat 37 °C-on 60 percig inkubáltuk. A bemért kitozán mennyiségének 25%-át a FITC-el jelölt kitozánból használtuk. Ezután a mintákat kétszer mostuk steril PBS-sel, hogy eltávolítsuk a felesleges FITC-kitozánt és centrifugáltuk ($11\,000 \times g$, 10 perc, 25 °C). A baktérium sejtmembránját 5 μ g/ml jéghideg

FM®4–64 festékkel festettük, majd jéghideg 4%-os formaldehiddel fixáltuk HBSS-ben, jégen 10 percig. A konfokális mikroszkópos felvételeket Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) rögzítettük Plan-Apochromat 63x NA 1.4 olajimmerziós objektívvel. A FITC-et 488 nm-en gerjesztettük Ar-ion lézerrel (1%-ra állítva), és 499-544 nm között detektáltuk, míg az FM ®4-64-et 543 nm-es HeNe lézerrel gerjesztettük (30%), és a 600-700 nm-es tartományban detektáltuk. A képparaméterek a következők voltak: 256×256 pixel, pixelméret 53 nm, zoom 10 $\times$, 0,7 μ m optikai szeletvastagság a zöld csatornában és 0,8 μ m a vörös csatornában; A z-lépték mérete a metszés során 0,37 μ m volt, a pixel tartózkodási ideje 4,1 vagy 16,5 μ s, és a kép minden sorát 4-szer pásztáztuk és átlagoltattuk. A csatornák közötti áthallást a festékek szekvenciális gerjesztésével és soronkénti átkapcsolással zártuk ki.

A konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében Dr. Vámosi György volt segítségünkre.

3.17. Zéta potenciál meghatározása a baktériumsejt felszínén

A *L. plantarum* szuszpenziókat a membránintegritás vizsgálat módszere szerint állítottuk elő. A hígított kis, közepes és nagy molekulásúlyú kitozán oldatokat 0,1, 0,01 és 0,001 m/v% koncentrációban egyenként összekevertük *L. plantarum* szuszpenzióval 1:1 térfogatarányban, és 37 °C-on 60 percig inkubáltuk. A mintákat a konfokális mikroszkópos vizsgálat előtti mosási eljárás szerint mostuk, ebben az esetben is a szuszpenzióban maradt felesleges kitozán eltávolítása volt a cél. A zéta potenciálokat nagy sejt koncentrációjú elegyben mértük Malvern Nano-ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, UK) segítségével mértük. Az adatokat GraphPad Prism 5.0 szoftverrel elemeztük.

3.18. Statisztikai analízis

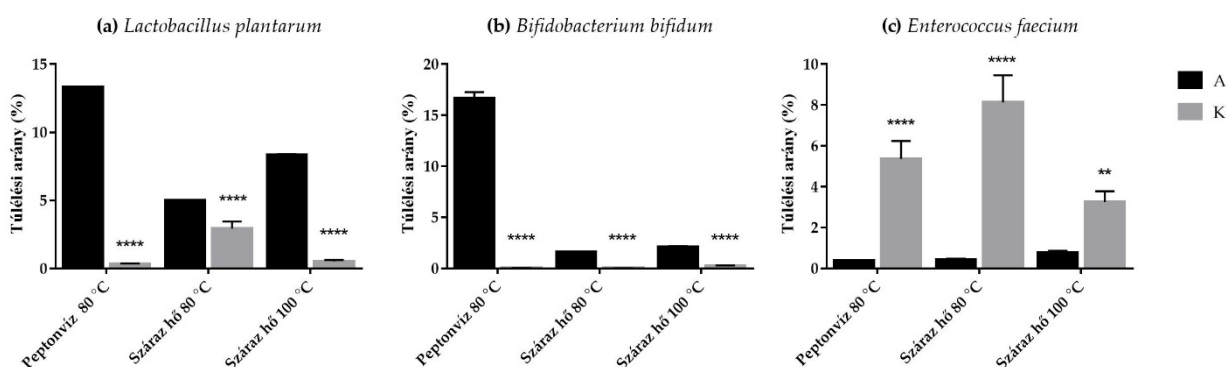
A statisztikai elemzésekhez a GraphPad Prism 5.0 szoftvert (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) használtunk. A grafikonokon és az oszlopdiagrammokon a kezelési csoportonként kapott átlagértékeket ábrázoltam, valamint a szórás értékeket tüntettem fel ($\pm$ SD). A csoportok összehasonlítása egy- és kétutas ANOVA és Bonferroni többszörös összehasonlító tesztekkel történt. A különbségeket nem tekintettük szignifikánsnak $p > 0,05$ esetén; szignifikánsnak, ha **** $p < 0,0001$ *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

4. Eredmények

4.1. Termotolerancia teszt száraz és nedves hőkezelés mellett

A különböző probiotikus baktériumok jobb hőtoleranciáját három különböző hőexpozíciós protokoll mellett vizsgáltuk, melynek eredményeit a 10. ábra mutatja. Mindhárom körülmény esetében megállapítható, hogy a *L. plantarum* és a *B. bifidum* hasonló hajlamot mutatott hőterhelésére, míg az *E. faecium* eltérő érzékenységi mintázatot mutatott a bevonat nélküli és kitozánnal bevont mikrokapszulák esetében.

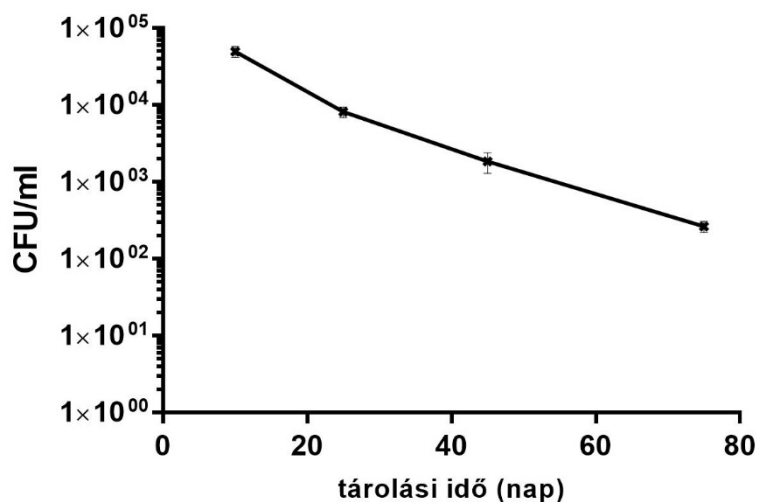
A peptonvízben történő nedves hőterhelés hatására a *L. plantarum* és a *B. bifidum* túlélési aránya bevonat nélküli mikrokapszulákban $13,33 \pm 0,023\%$ és $16,66 \pm 0,59\%$, míg a kitozánnal bevont mikrokapszulákban $0,33 \pm 0,045\%$ és $0,03 \pm 0,008\%$ volt. Az *E. faecium* túlélési aránya a bevonat nélküli mikrokapszulákban $0,36 \pm 0,042\%$, míg a kitozánnal bevont mikrokapszulákban $5,36 \pm 0,87\%$ volt nedves hőterhelés után.



10. ábra A hőterhelés vizsgálata különböző körülmények között az egyes probiotikus mikrokapszulákon.

A vizsgált mikrokapszula típusok: alginát mikrokapszula (A), kitozánnal bevont mikrokapszula (K)

4.2. Az eltartás hatása az életképességre



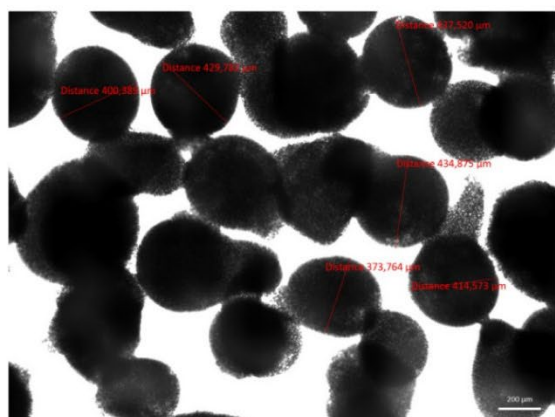
11. ábra A tárolási idő hatása a *L. plantarum* életképességére.

A CFU értékek időben változását logaritmikus léteű görbén ábrázoltuk (11. ábra). A t_0 időpontnak a nedves mikrokapszulák elkészülésének napját vettük, melynek során a *L. plantarum* sejteket az alginát oldatba kevertük. A mikrokapszulák liofilezését követően a mintákat 4 °C-on tartottuk el. A probiotikus baktériumok életképessége a tárolás során változik, azért a bevonat nélküli alginát csoportból felvettünk egy tárolási idő – CFU görbét, melyen a tárolási idő függvényében követtük a sejtek életképességének változását. Az egyes kísérleteinkben kapott “nyers” CFU értékeket a minta tárolási idejének figyelembevételével kerültek átszámításra százalékos értékben.

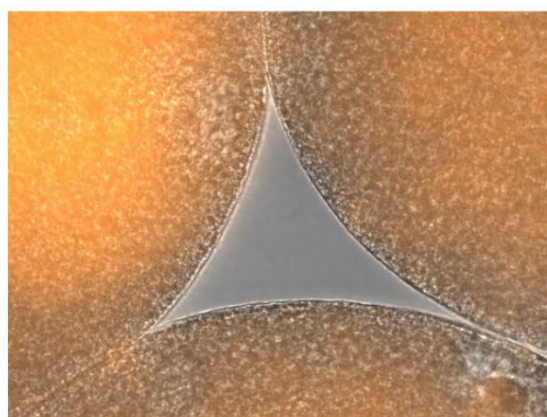
4.3. A bevont és bevonat nélküli mikrokapszulák jellemzése

A nedves alginát mikrokapszulák alakjának és méretének elemzését az előállítás után fénymikroszkóppal végeztük (12. ábra). A nedves alginát mikrokapszula átmérőjének átlagos értéke $412,54 \pm 28,83 \mu\text{m}$ volt, 150 μm -es fűvóka használatával. A nedves mikrokapszulák alakja izometrikus, közel gömb alakú, héjjal körülvett. A mikrokapszulák fagyasztva szárítása után a szilárd részecskék méretét SEM-el határoztuk meg. A bevonat nélküli alginát mikrokapszulák átlagos átmérője $187,21 \pm 24,36 \mu\text{m}$, a kitozánnal bevont $203,5 \pm 31,98 \mu\text{m}$, az Eudragit bevonatúaké pedig $312,6 \pm 50,36 \mu\text{m}$ ($n = 50,36 \mu\text{m}$). A szárított mikrokapszulák felülete enyhén érdes, bordázott, ami szabálytalanná teszi a felületet, alakja szinte izometrikus,

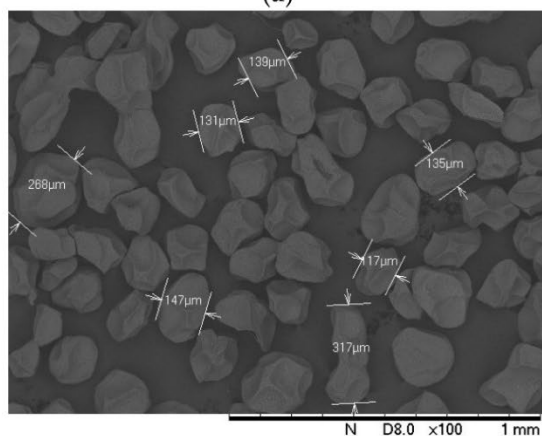
helyenként enyhén megnyúlt a szárítás során kialakuló ikrek miatt. A kitozánnal bevont mikrokapszulák felülete kissé bordázott, az Eudragit L100-55 bevonatú minták felülete szinte sima volt.



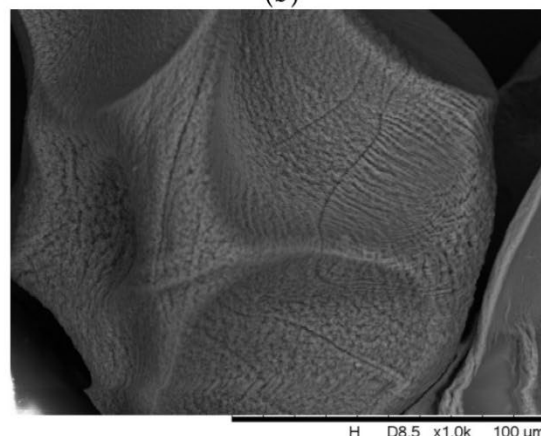
(a)



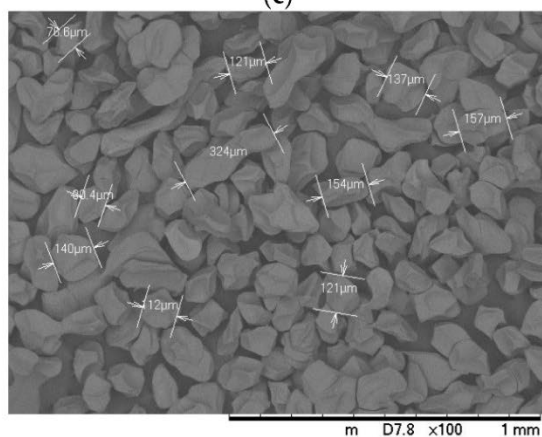
(b)



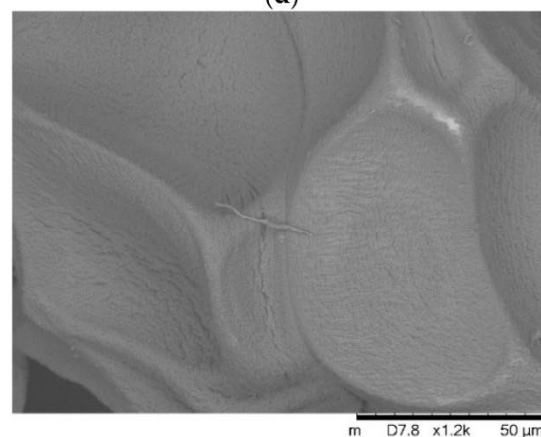
(c)



(d)



(e)



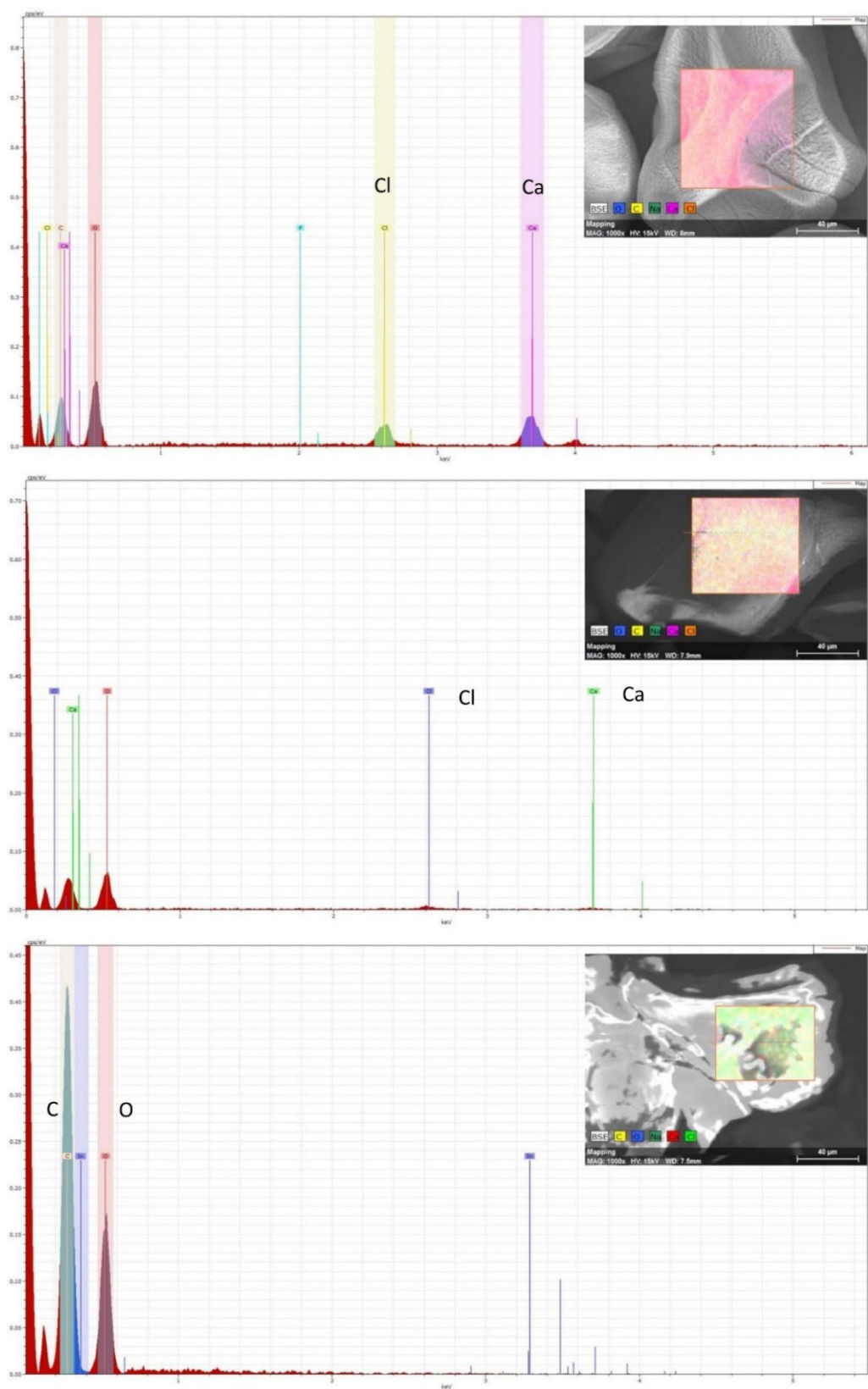
(f)

12. ábra A bevont és bevonatmentes mikrokapszulák jellemzése.

Fénymikroszkópos felvétel a bevonat nélküli nedves mikrokapszulákról (a,b). SEM-el készült kép a kitozánnal (c,d) és Eudragit L100-55-el bevont (e,f) mikrokapszulák felszínéről.

4.4. Elemi spektroszkópia

A bevonat hatékonyságának ellenőrzésére a mikrokapszulák felületét fotoelektron spektroszkópiával vizsgáltuk (13. ábra). A bevonat nélküli mikrokapszula felületének spektrumát elemezve, megerősíthetjük a kalcium jelenlétét. A mikrokapszulák előállításához nátrium-alginátot használtunk, amit kalcium-kloridban gélesítettünk. A spektrum azonban nem mutatott Na jelet, ami az alginát megfelelő kicsapódására és térhálósodására utal. A kitozán bevonást követően a kalcium és a klór jelintenzitása szignifikánsan csökkent, ami hatékony kitozán lefedettségre utal. A röntgenanalízis megerősítette, hogy a kitozán spektrumában a fő csúcsok a (C) és (O), amelyek megegyeznek a kitozán fő elemtartalmával. Az Eudragittal bevont mikrokapszula felületének a kalcium jele eltűnt, de a C és O jelei felerősödtek. A felületről végzett elemanalízisek alapján feltételezhetjük a megfelelő és hatékony bevonatot a kitozán és az Eudragit esetében is.

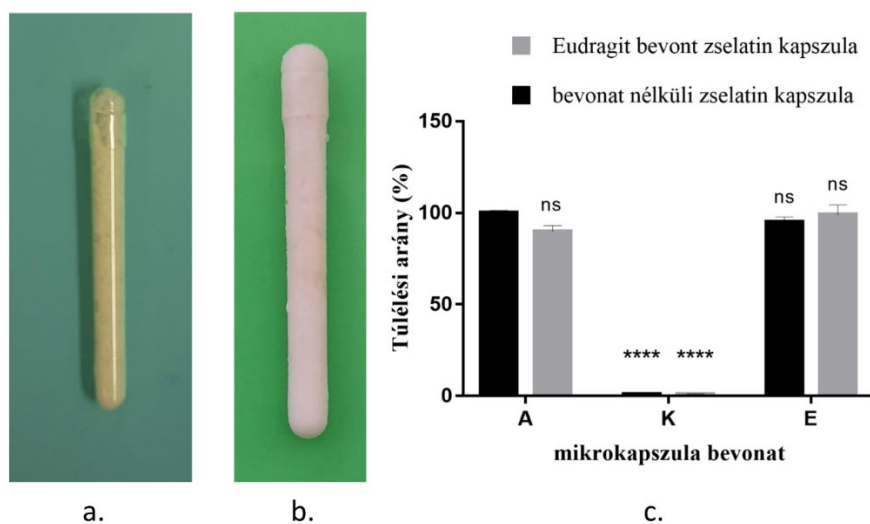


13. ábra Az elemi spektroszkópia eredményei.

A bevonat nélküli mikrokapszula (a), a kitozánnal bevont (b) és az Eudragit L100-55-el bevont mikrokapszula (c) felszínéről készült elemzés.

4.5. Kioldódási vizsgálatok

Vizsgáltuk az oldószeres közeg pH-jának hatását a különböző bevonatokra, illetve a bevonat hatását a *L. plantarum* %-os túlélési arányára (14. ábra). Az oldást 60 percig végeztük mindegyik oldóközegben. A pH 2,0-s közegű kioldódásvizsgálatot követő feloldás során az Eudragit L100-55 bevonatú zselatin kapszulák felülete nem duzzadt és nem volt látható az oldódás makroszkopikus jele. A bevonat nélküli zselatin kapszulák azonban savas közegben duzzadni kezdtek. 60 perc elteltével a pH 2,0-es kioldóközeget pH 7,4-es közegre cseréltük, ekkor a bélben oldódó bevonatú zselatin kapszulák feloldódása is megkezdődött és a zselatin duzzadása volt megfigyelhető. Az Eudragit L100-55 bevonatú zselatin kapszulába töltött alginát mikrokapszuláknál a túlélésében nem volt szignifikáns különbség ($89,81 \pm 5,64$) a kontrollhoz képest. Hasonlóképpen, nem figyeltünk meg különbséget a túlélésben az Eudragit L100-55-el bevont mikrokapszulák esetében a kontrollokhoz képest ($95,09 \pm 4,73$), illetve az Eudragit L100-55-el bevont zselatin kapszulát vizsgálva ($99,09 \pm 9,27$). A kitozán bevonatú minták oldódási vizsgálata során a *L. plantarum* életképességét teljesen gátolta, így a túlélési arány mindkét zselatin kapszulába töltve gyakorlatilag nulla volt.



14. ábra Mikrokapszulával töltött, bevonat nélküli (a) és Eudragit L100-55 bevonatú zselatin kapszula (b). Zselatin kapszulák kioldódási eredménye (c).

Az adatokat átlag $\pm$ SDS -ként mutatjuk be, $n = 3$. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük $p < 0,05$ -nél; *** $p < 0,0001$, az ns jelentése: nem szignifikáns.

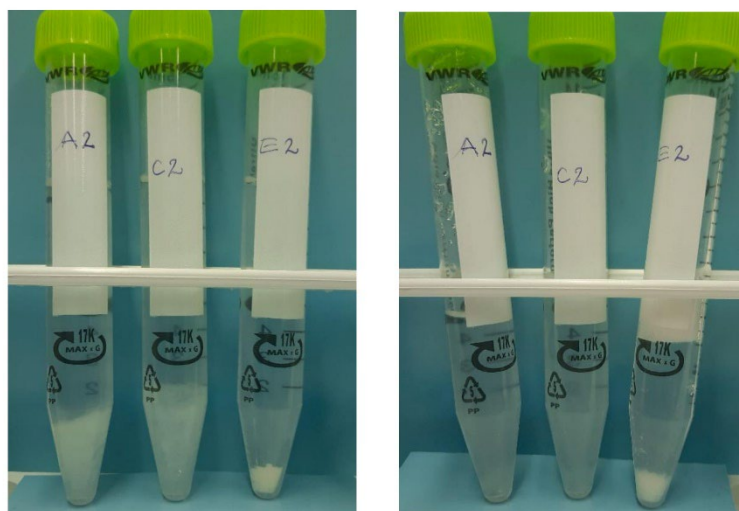
4.6. A leoldódó kitozán bevonat mennyiségének meghatározása

Tekintettel a jelölési hatékonyságra és a bevonó oldatban lévő jelölt kitozán arányára, a kitozán koncentrációja az oldóközegben 0,043% volt, ami 431 ppm. A számított értéket a mikrokapszulák pH 2,0 közegben 60 percen át történő feloldása után határoztuk meg. A kitozán bevonatot savas közegben feloldottuk, majd az oldóközeg pH-ját 7,4-re változtattuk, és 240 percnél mintát vettünk. A kitozán dezacetilációs foka 75-85%, molekulatömege 50-190 kDa. A mikrokapszulák felületéről leoldott kitozán bevonat koncentrációját elsőként határoztuk meg, erről korábban közölt szakirodalmi adatok nem álltak rendelkezésünkre.

4.7. Sejtfelszabadulási profilok és élő/holt sejtek meghatározása

Ebben a kísérletben a baktériumok felszabadulását vizsgáltuk a pH-tól és a bevonattól függően áramlási citometriával (15-16. ábra). A pH 2,0 kioldó közegben tartott mintákban alacsony sejtszámot detektáltunk 60 perc elteltével, szignifikáns különbség nélkül. A pH-t 7,40-re emelve lassú oldódást mértünk a bevonat nélküli mikrokapszulákban és a kezdeti baktérium koncentráció 42,86%-a szabadult fel 240 perc alatt. A kitozán bevonatú minták esetében a kezdeti fázisban hasonló kioldódási kinetika volt megfigyelhető, mint az alginát mintáknál, de 240 percnél már magasabb felszabadulást (71,43%) mértünk, mint az Eudragit L100-55 bevonatú mintáknál. Az Eudragit L100-55 bevonatú minták esetében a leggyorsabb felszabadulást a kioldó közeg pH-jának 7,40-re való beállítása után mértük, így a *Lactobacillusok* 80%-a szabadult fel. A baktériumsejtek felszabadulása a 60. percet követő pH-változás után szignifikánsan eltérő mechanizmust mutatott. A kitozán bevonat pH 2,0-s közegben való oldódása az utolsó mérési pontot (240 perc) leszámítva nem eredményezett szignifikánsan eltérő oldódási profilt a bevonat nélküli alginát mikrokapszulákhoz képest. Az Eudragit L100-55 bevonatú mikrokapszulák felületéről az enteroszolvens bevonat csak a pH változása után kezdett feloldódni, ami 120 percnél robbanásszerű baktériumfelszabadulást, majd lassabb telítési fázist eredményezett (17. ábra). A mintavétel után (60, 120, 180 és 240 perc) a baktériumsejteket SYTOX Green-el festettük, és megvizsgáltuk az élő/halott sejtek arányát. A bevonat nélküli alginát és az Eudragit L100-55 bevonatú mikrokapszulák esetében nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az életképességben a mintavételi időpontokban. Azonban, a kitozánnal bevont mintákban 60 perc elteltével ismét magasabb mortalitást mutattak a baktériumok, ami a vizsgálat során végig jellemző maradt. Az életképesség meghatározásához az élő és elhalt sejtek összegét, azaz a felszabaduló baktériumok számát

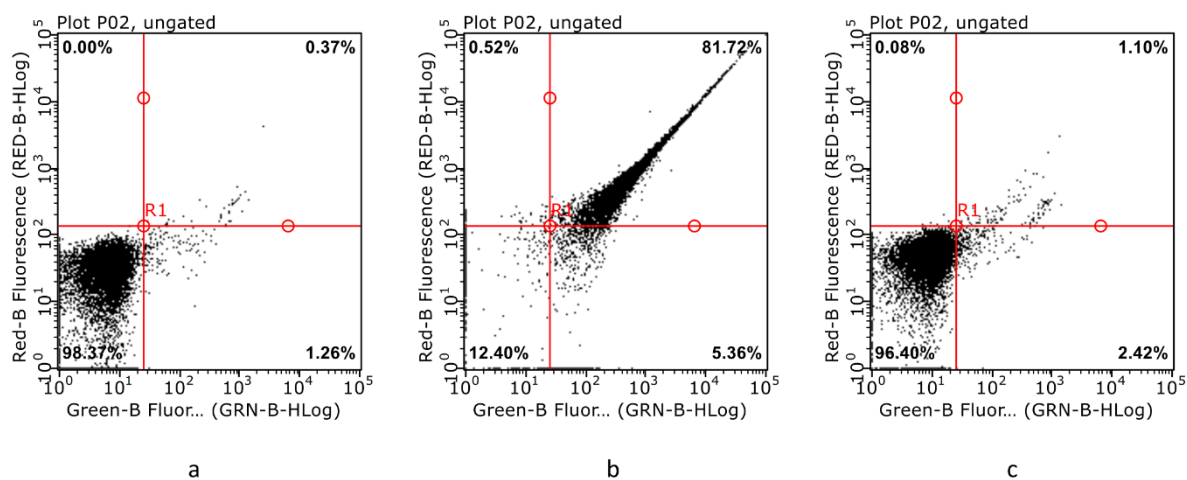
minden minta esetében 100%-nak tekintettük.



a.

b.

15. ábra Mikrokapszula kioldása 2,0 pH PBS közegben (a) és 7,4 pH PBS közegben (b). Az A2-jelű csőben bevonat nélküli alginát, a C2 jelűben kitozánnal bevont, az E2 jelűben Eudragittal bevont alginát mikrokapszula kioldását végeztük.



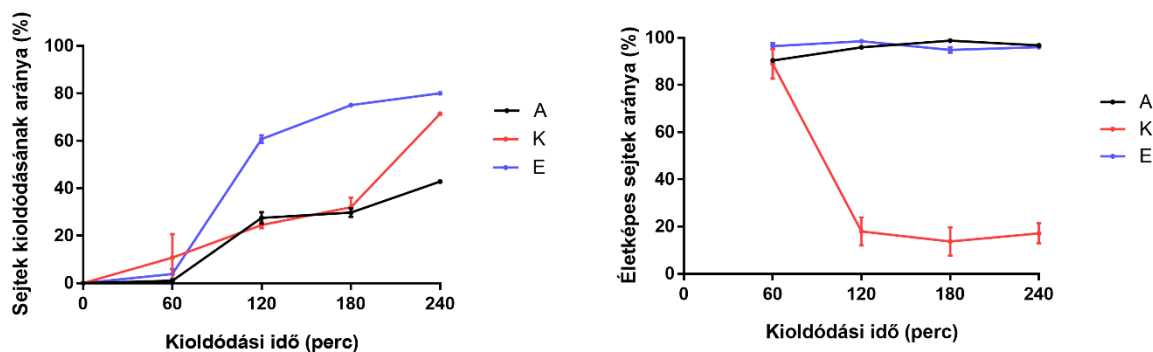
a

b

c

16. ábra A nem bevont alginát (a), kitozánnal bevont (b) és Eudragit-bevont (c) mikrokapszulákból kioldott *L. plantarum* sejtek életképességének vizsgálata áramlási citométeren.

Reprezentatív ábra, a vizsgálatot triplikátumban végeztük.

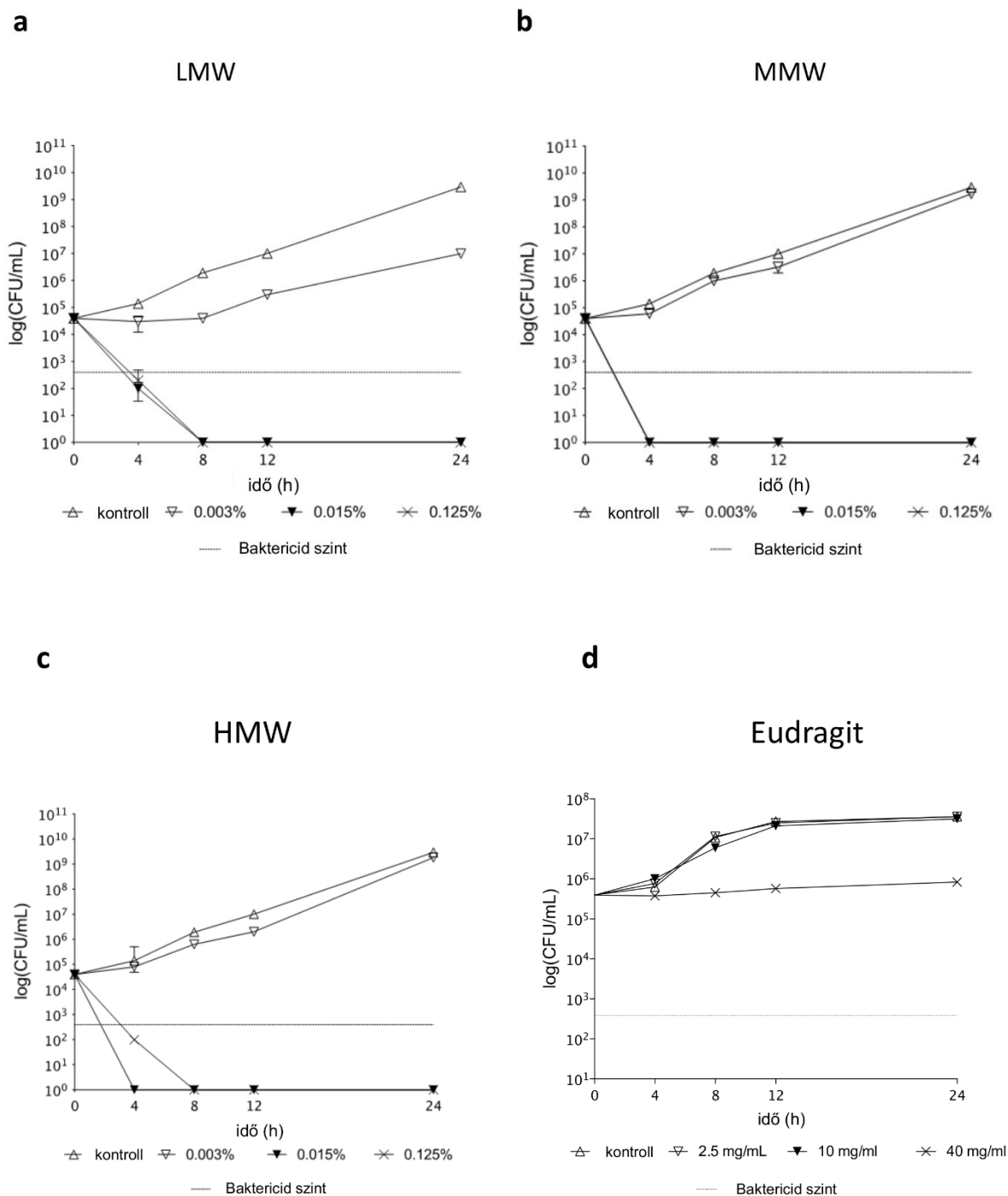


17. ábra *L. plantarum* felszabadulása a mikrokapszulákból (a), és a felszabadult baktériumok (b) életképessége az idő függvényében.

A nem bevont alginát (A), kitozánnal bevont (K) és Eudragit-bevont (E) mikrokapszulákat triplikátumban vizsgáltuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD -ként mutatjuk be, $n = 3$.

4.8. MIC érték meghatározása és idő-ölési vizsgálat

A vizsgált kitozán vegyületek MIC értékei 0,007%-nak bizonyultak mind az kis-, közepes- és nagymolekulatömegű kitozán esetében. Minden vizsgált, különböző molekulatömegű kitozán koncentrációfüggő módon kifejezett gátló hatást fejtett ki az *L. plantarum* sejtekre. Figyelemre méltó baktericid hatás (legalább három log csökkenés az élő sejtszámban a kiindulási inokulumhoz képest) a 0,015%-os kitozántól minden molekulatömeg esetén megfigyelhető volt (18. ábra). Az Eudragit L100-55 bevonat anyagára nézve a diagramon látható 2,5 mg/ml és 10 mg/ml koncentrációkban kaptunk értékelhető eredményt. A legmagasabb koncentrációban azonban a polimer rossz vízdékonysága miatt a kiindulási minta erősen opaleszkáló volt, így a CFU értékek bizonytalanul állapíthatók meg. A MIC érték meghatározása emiatt elmaradt.

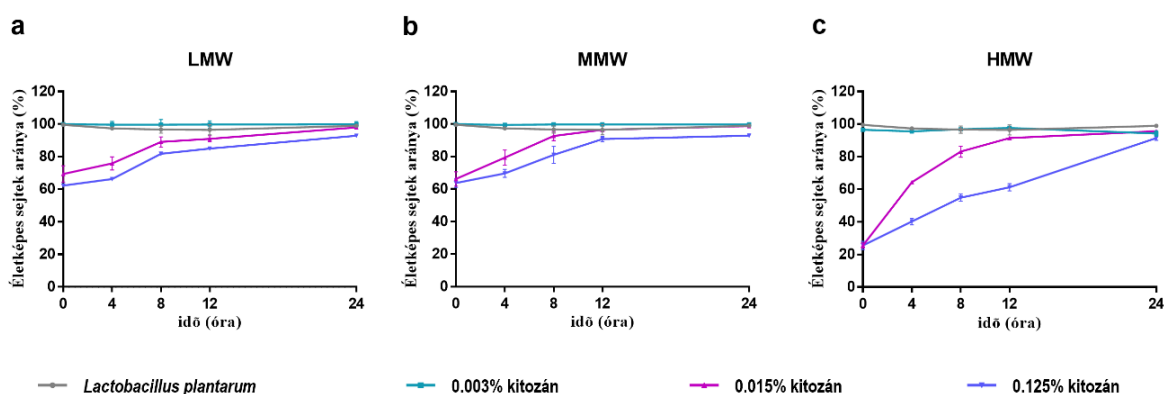


18. ábra Az idő-ölés görbe a kis (a), a közepes(b) a nagy molekulatömegű kitozánra (c) és az Eudragit L100-55(d) bevonat anyagaira.

A vizsgálatot három párhuzamos mintával végeztük, n=3

További vizsgálatokat végeztünk három különböző molekulatömegű kitozánnal. A baktériumsejtek életképességét az élő/holt sejtek aránya alapján jelen vizsgálatban is áramlási citométerrel határoztuk meg. A kontroll és a legalacsonyabb (0,001%) kitozán koncentrációjú minták esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a *L. plantarum* életképességében.

Ez mindhárom molekulatömegű kitozán vizsgálatával megállapítható. A kitozán koncentráció tízszeres növekedésével (0,01% és 0,1%) azonban az életképesség jelentős csökkenését észleltük. Ami a kitozán molekulatömegét illeti, az életképesség csökkenő tendenciát mutatott a molekulatömeg növekedésével. Az élő/holt sejtek aránya 8 óránál stabilizálódott kismolekulasúlyú kitozán esetén és 12 óránál a közepes molekulásúlyú kitozán esetében. A nagymolekulasúlyú kitozán esetében a 24 órás eredményben volt megfigyelhető a stabilizálódás. (19. ábra)

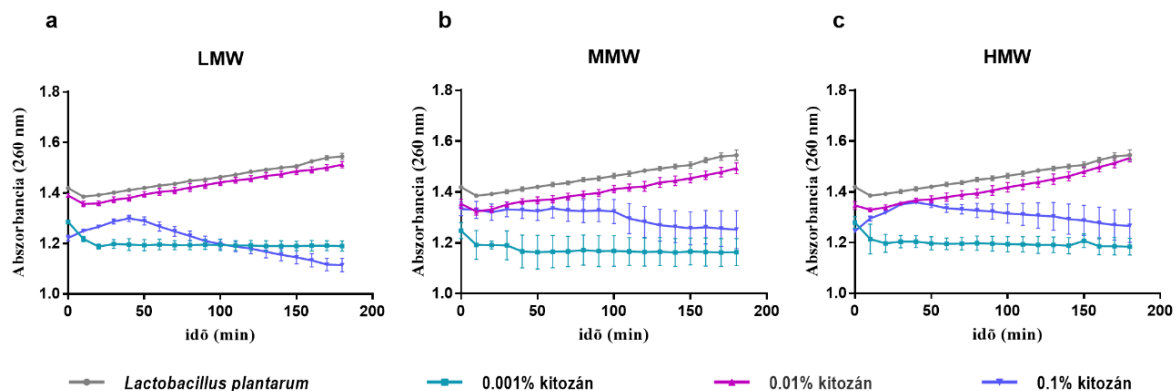


19. ábra Az idő-ölési vizsgálat eredményei áramlási citometriás meghatározással.

A vizsgálatot triplikátumban végeztük, n=3

4.9. Membránintegritási vizsgálat

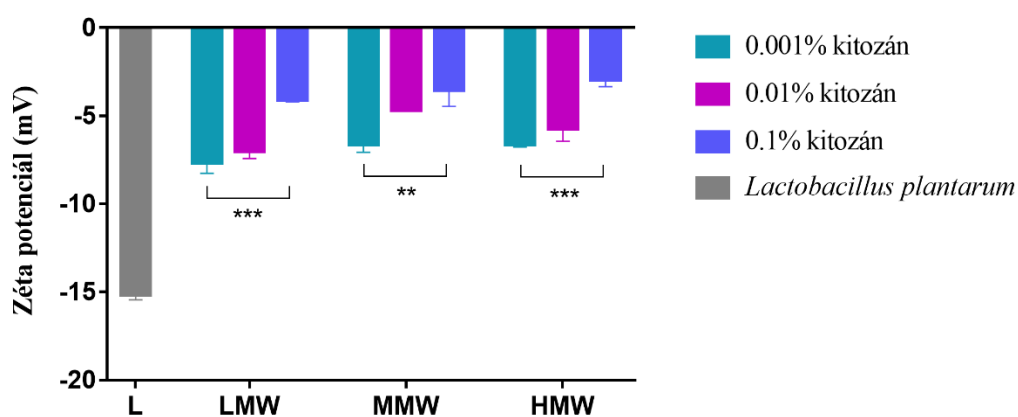
A kitozán membránra gyakorolt destabilizáló hatását a *L. plantarum* membrán integritástesztjében vizsgáltuk, és 260 nm-en mértük a felszabaduló nukleinsav mennyiségét. A kezeletlen baktériumsejtek esetében kismértékű, lineáris abszorbancia növekedést tapasztaltunk. A kitozán koncentrációjának növelésével azonban szignifikáns különbséget találtunk egyes görbék között. Mindhárom kitozán molekulatömegnél alacsonyabb abszorbanciát észleltünk 0,001%-os koncentrációnál a kontrollhoz képest. A 0,1%-os koncentrációjú kezelés során 30-40 percnél találtunk maximumot a minták abszorbanciájában, majd csökkenő tendenciát mértünk. Ezek a jellemzők a kis és nagy molekulatömegű minták esetében hangsúlyosabbak, míg a közepesek esetében kevésbé. A minták abszorbanciája 0,01%-os koncentrációnál a kezeletlen kontrollhoz hasonlóan változott. (20. ábra)



20. ábra Membránintegritás vizsgálata 260nm-en mért abszorbania változással. A vizsgálatot triplikátumban végeztük, n=3

4.10. Zéta potenciál meghatározása a baktériumsejt felszínén

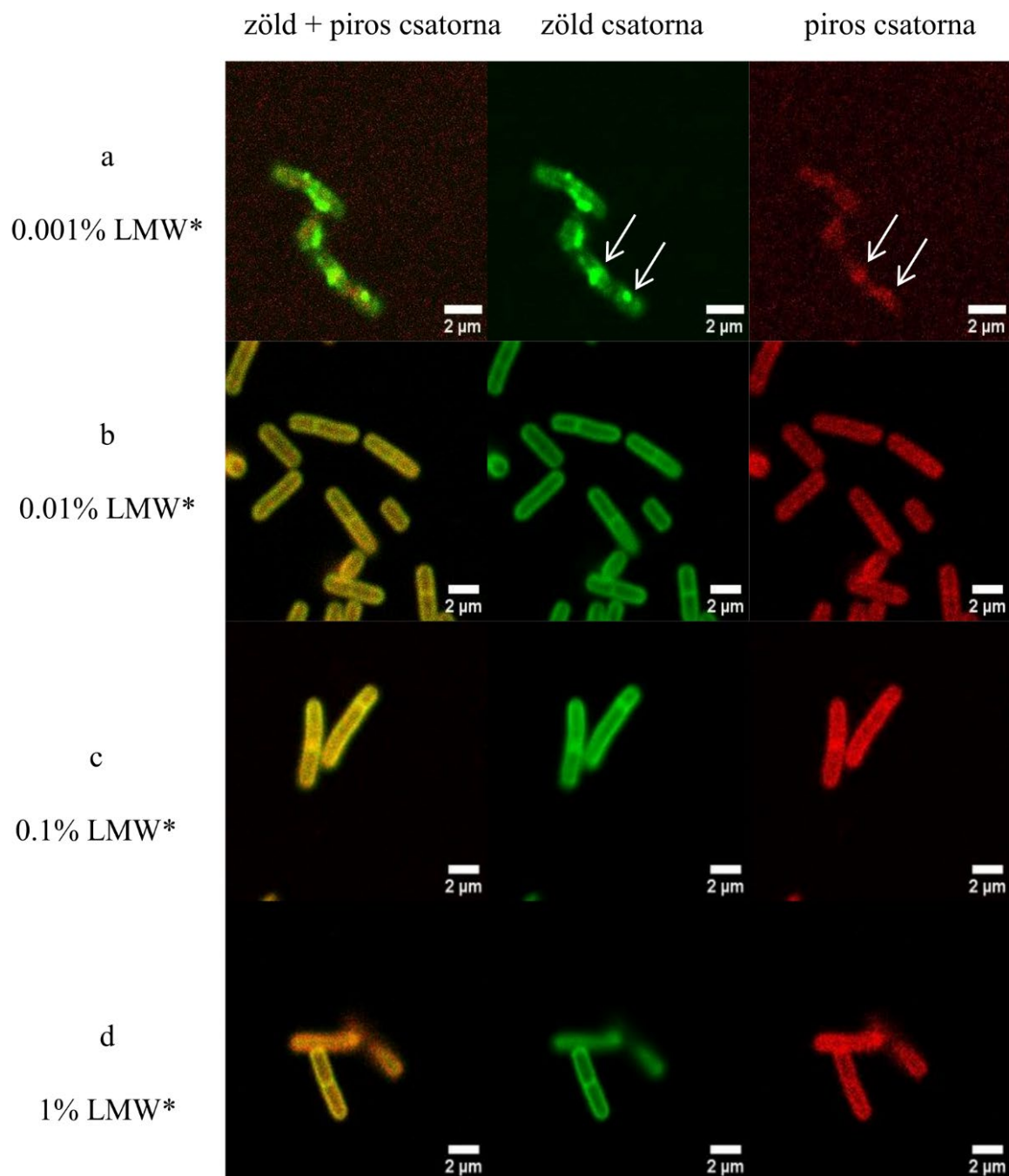
A zéta potenciált a *L. plantarum* felszínén határoztuk meg, az eredményeket a 21. ábra mutatja. A kezeletlen *L. plantarum* tartalmú mintákban a zéta potenciál értéke $-15,15 \pm 0,49$ mV volt, amely a kitozán kezelést követően pozitívabbá vált. A zéta potenciál koncentrációfüggést mutatott mindhárom molekulatömegű kitozán esetében. A legnagyobb zéta-potenciál változást a 0,1%-os kitozán kezeléssel kaptuk (LMW: $-4,10$ mV, MMW: $-3,52$ mV, HMW: $-2,96$ mV). A különböző molekulatömegű kitozánnal kapott eredményeket összehasonlítva a zéta potenciál értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.



21. ábra Zéta potenciál változás meghatározása különböző molekulatömegű kitozánok hatására. A vizsgálatot triplikátumban végeztük. Az adatokat átlag $\pm$ SD -ként mutatjuk be; *** $p < 0,001$ és ** $p < 0,01$.

4.11. A kitozán-sejtmembrán kölcsönhatás vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A *Lactobacillus* sejteket az előző vizsgálatokban használt kitozán koncentrációval (0,001-0,1%) kezeltük, valamint egy magasabb koncentrációjú (1%) kezelést is alkalmaztunk. A kitozán FITC-el jelölt volt a detektálás érdekében. A legalacsonyabb kitozán koncentráció esetén az inhomogén eloszlása volt megfigyelhető a baktériumsejteken, a sejtfal közelében, míg a membránfestéshez használt FM ® 4–64 szintén egyenetlen eloszlást mutatott, ami a membrán aggregációra enged következtetni (22. ábra). A legalacsonyabb koncentrációnál nemcsak membrán aggregációt figyeltünk meg, hanem a sejtek megváltozott alakja is sejtkárosodásra utal. A kitozán nagyobb koncentrációban (0,01-1%) egyenletesen oszlik el a bakteriális sejtfal felületén, mint egy egységes bevonatot képezve. A membrán egyenletes festődése mellett a sejtek normális morfológiáját figyeltük meg, membránkárosodás nélkül.



22. ábra Az *L. plantarum* konfokális mikroszkópos képei 0,001% (a), 0,01% (b), 0,1% (c) és 1% (d) FITC jelöléssel ellátott LMW kitozán (LMW*) kezelés után.

A második oszlopon az LMW* zöld színű, a harmadik oszlopon az FM[®] 4–64 festék piros színű, és az első oszlopon az egyesített csatornákon mutatjuk a felvételeket. A fehér nyilak membrán aggregációkat mutatnak.

5. Megbeszélés

Kutatásunk és készítményfejlesztésünk célja az volt, hogy megfelelő stabilitású, takarmányozásban használt készítményt tartalmazó probiotikumot állítsunk elő. A probiotikus készítményt premix komponensként használva általában magas nyersrosttartalmú takarmányalappal keverik, amelyet nagynyomású gőzben extrudálnak és megfelelő méretűre aprítanak. Így ebben a technológiai folyamatban a probiotikumot rövid idejű, 80-100 °C körüli hőterhelésnek teszik ki. A fejlesztés kezdetén az volt a célunk, hogy a probiotikus törzseket mikrokapszulába ágyazzuk, és termostabilitását növelő bevonatot vigyünk fel rá. A mikrokapszulák magját nátrium algináttal képeztük, mely az egyik leggyakrabban alkalmazott alapanyag. A választott módszerünk – a tanszéki infrastruktúrális lehetőségeket figyelembe véve – a vibrációs electrospray technológia, melynek körülményei a probiotikus törzsek kapszulázása szempontjából a legkíméletesebbek. A Buchi 395-Pro készülék gyártói a mikrokapszulázási hatékonyság növelése érdekében olyan nátrium alginát terméket fejlesztettek, melynek jellegzetessége oldatként alkalmazva az alacsony viszkozitás és a kedvezőbb reológiai tulajdonság.

1. A mikrokapszulázott probiotikus törzsek hőtoleranciájának értékelése

A vizsgálat három probiotikus törzs mikrokapszulázásával kezdődött. Mindhárom probiotikum tartalmú mikrokapszulát alginát magba ágyasztuk, kitozán bevonást végeztünk és első lépésben a probiotikus minták hőterhelését vizsgáltuk. A kísérleti körülmények megválasztását a szakirodalomban korábban használt paraméterek és a valós extrudálási paraméterek alapján választottuk ki [34]. Ugyanazt a tendenciát kaptuk mindhárom probiotikus törzs vizsgálatában, a bevonat nélküli és bevont mikrokapszulák esetében az egyes hőterhelési eljárások tekintetében. A peptonvízben történő hőkezelés mérsékeltebb hatást eredményezett, valamint a hővezetés jellege a valós környezetet jobban modellelzi, ezért az itt kapott CFU eredményeket vettük alapul a későbbiekben.

Különbséget figyeltünk meg a probiotikus törzsek hőterhelésre bekövetkező életképesség változása és a kitozán bevonat között, mivel az *E. faecium*ot tartalmazó mikrokapszulák esetében a kitozán bevonat növelte a termotoleranciát a bevonat nélküli mikrokapszulákhoz képest. A másik két törzs (*Lactobacillus* és *Bifidobacterium*), kitozán bevonás nélkül jobb hőállóságot mutatott, a kitozánnal való bevonás után azonban életképességük szignifikánsan csökkent. Hasonló eredményt publikáltak Surono I. és munkatársai, gasztrointesztinális traktus felső szakaszának in vitro modelljében. Megfigyelésünk szerint az *E. faecium* és a *L. plantarum* eltérő életképességet mutattak abban a vizsgálatban, melyet a szabad, planktonikus

baktériumok és az algináttal készült probiotikus mikrokapszulákkal végeztek a gyomor és a vékonybél *in vitro* modelljükben. Az *E. faecium* túlélési százaléka nem javult a mikrokapszulázást követően, míg a *L. plantarum* túlélése 18,5%-ról 84,5%-ra nőtt a szabad sejtekhez képest. Ez az eredmény – hasonlóan az általunk kapotthoz – igazolja az *E. faecium* eltérő érzékenységét a környezeti tényezőkkel szemben [73].

2. A kioldódási vizsgálatok tervezése és új vizsgálati csoportok kialakítása

A kitozán bevonattal kapott, nem várt eredmények a fejlesztési folyamatban egy új irányt indítottak. A *L. plantarum* és a *B. bifidum* hasonló érzékenységi tendenciát mutatott a hőhatás után; ezért a további kísérleteket a *L. plantarum*-ra összpontosítva végeztünk. A kitozán bevonattal kapcsolatos életképességet már csak a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulák esetében vizsgáltuk, hogy meggyőződjünk és feltárjuk a kitozán bevonás okozta életképesség csökkenést. A probiotikumok életképességét az alkalmazás során a gyomorban uralkodó savas környezet, a vékonybél felső szakaszán felszabaduló epesavak és az emésztőenzimek is csökkentik. A savas környezet azonban a kitozán oldékonyságát is növeli, így elméletileg a gyomor-bél traktusban leoldódó kitozán életképesség-csökkentő hatásával is számolnunk kell. A következő kioldódási vizsgálatokban erről kívántunk meggyőződni.

A mikrokapszulák egyik csoportját bélben oldódó polimerrel, Eudragit L100-55-tel vontuk be, hogy megvizsgáljuk a különböző oldhatóságú bevonatok hatását a *L. plantarum* életképességére. Az Eudragit L100-55 bevonat lebomlása pH-függő, pH 5,5 felett oldódik [74, 75]. Ezzel az enteroszolvens bevonattal elkerülhető volt a baktériumok felszabadulása savas közegben [76]. Mesterséges gyomornedvként általában 1-2 pH-jú sósavoldatot szoktak használni a kioldódási vizsgálatok során, néha ezt nátrium-kloriddal egészítik ki. Mivel vizsgálatainkkal a bevonatként használt anyagok életképességet befolyásoló aktivitását kívántuk felmérni a fiziológiás körülmények szimulálása mellett, ezért a Ph.Hg.VIII.-ban javasolt 2,0 pH-jú sósav oldat helyett fiziológiás PBS-t választottunk kioldó közegként. A PBS pH-ját a vizsgálat kezdetén 2,0 pH-ra, majd 60 perc eltelte után 7,4 pH-ra állítottuk be.

3. A mikrokapszula felszínének vizsgálatai

A kioldódási vizsgálatok előtt megvizsgáltuk mind a kitozán, mind az Eudragit L100-55 bevonat minőségét és hatékonyságát. A SEM felvételek bemutatják a bevonat nélküli, szárított mikrokapszula felületi különbségeit és felületi egyenetlenségeit. Az alginát mikrokapszula felszíne a liofilezést követően erősen barázdált, amely a kitozán bevonást követően simább lett; a legsimább felületet azonban az Eudragit L100-55 bevonattal alakítottuk ki, ahol a bevonat összefüggő volt. Az elemanalízis eredményei is megerősítették, hogy a pozitív töltésű kitozán a negatív töltésű algináttal komplexet képez a kitozánnal bevont minták felületén, ami

kompenzálta a felületi egyenetlenségeket. Az Eudragit L100-55 bevonatban a metakrilát polimer teljesen bevonta a mikrokapszula felületét, ami 10%-os tömegnövekedést is eredményezett.

4. A kioldódási vizsgálatok és a felszabadulási profil értékelése

A bevonatok hatékonyságának ellenőrzésére a mikrokapszulákat három csoportra: bevonat nélküli alginát (A), kitozánnal bevont alginát (K) és Eudragit L100-55 bevontú (E) mikrokapszulákra osztottuk és zselatin kapszulákba töltöttük. A zselatin kapszulák egyik felét szintén bevontuk Eudragit L100-55-tel, míg a többit bevonat nélkül vizsgáltuk. A bevonat nélküli és Eudragit L100-55 bevontú zselatin kapszulák pH 7,4-es kioldása ismét meglepő eredményeket mutatott a kitozánnal bevont mikrokapszulák csoportjaiban. A zselatin kapszula bevonatától függetlenül a kitozán bevontú mikrokapszulákból nem oldódott ki kellő számú, életképes baktérium, mely telepet képezett volna a táptalajra történő leoltást követően.

Az eredmény feltárása érdekében egy újabb kioldódási vizsgálatot végeztünk, amelyben áramlási citometriával vizsgáltuk a *L. plantarum* mikrokapszulákból való felszabadulását és a felszabaduló baktériumok életképességét. Az áramlási citometria alkalmas módszer a baktériumszám meghatározására és az életképes-holt sejtek arányának megállapítására [77, 78]. A SYTOX Green pedig széles körben alkalmazott fluoreszcens festék az élő/holt sejtek arányának áramlási citometriás vizsgálatára [24, 27]. A sejt felszabadulási vizsgálatban az időintervallumonként mikrokapszulákból felszabaduló *Lactobacillus*ok számát vizsgáltuk. Kísérleteinkben a kitozánnal bevont mikrokapszulákról a bevonat pH 2,0-s közegben feloldódott, majd ezt követően a közeg pH-ját 7,4-re emeltük, ami gélréteg kialakulását okozta a mikrokapszulák felületén. Emiatt a kitozánnal bevont mikrokapszulákban a baktériumok kioldóközegbe történő diffúziója az utolsó mintavételi időpontig gátolt volt, azt követően a gél-gát megbomlott, amely a *Lactobacillus* szám hirtelen növekedését eredményezte. Az Eudragit L100-55 (Evonik Industries AG, Germany) két emulgenst tartalmaz: nátrium-lauril-szulfátot (0,7%) és poliszorbát 80-at (2,3%). Az emulgensek koncentrációja nem csökkentette a baktériumok életképességét, de hatékonyan oldotta az alginátot [79]. Így ezek a segédanyagok felgyorsíthatják az alginát szétesését és oldhatóságát, ami a *Lactobacillus*-ok fokozott felszabadulását eredményezhette.

Az áramlási citometriás vizsgálatokban kapott alacsony élő/holt sejtek aránya megerősítette a CFU-meghatározás túlélési eredményeit a kitozánnal bevont mintákban. *Lactobacillus* tartalmú minták áramlási citometriás és CFU meghatározási eredményei hasonló korrelációt mutattak más kutatók szerint is, tehát a két módszer jól kiegészíti egymást [78, 80]. Mindezeket az eredményeket összevetettük a publikált adatokkal, ahol a kitozán bevontú

minták esetében nem írtak le hasonló tapasztalatokat, sőt a *Lactobacillus*ok jobb életképességet mutattak a kitozán bevonatú mintákban.

5. A kitozán koncentráció és a MIC érték meghatározása

A kioldódási eredmények mellett érdemes összehasonlítani a kioldódási vizsgálatok módszerét és az alkalmazott mikrokapszula/oldóközeg arányt. A termotoleranciát 15 mg mikrokapszula/mL peptonvíz koncentrációban teszteltük, ami valamivel hígabb koncentráció, mint az irodalomban találtak. Cheow és munkatársai például 20 mg/ml peptonvizet, Jiang és munkatársai még nagyobb koncentrációjú, 100 mg/ml peptonvizet alkalmaztak vizsgálataik során [34, 81]. A szimulált gyomornedvben és bélmedvben végzett kioldódási és felszabadulási tesztek, valamint az alkalmazott mikrokapszula/közeg arány 10-20-100 mg/ml volt [66, 82-85]. A kitozán antibakteriális hatása miatt fontos tényező a mikrokapszula koncentrációja az oldóközegben. A kitozánnal bevont probiotikus mikrokapszulákat számos tanulmány jellemezte, például a rétegvastagságot, az alginát-kitozán-alginát szerkezet kialakulását és a kitozán bevonatú mikrokapszulák felületét figyelembe véve. A kitozán koncentrációját azonban a kioldóközegben még nem vizsgálták és nem hasonlították össze a kitozán MIC-értékével (minimális gátló koncentráció) a kapszulázott probiotikus törzsre nézve, így elsőként végeztünk ilyen jellegű összehasonlító vizsgálatot.

Egyes összefoglaló jellegű publikációk a kitozán MIC értékek vizsgálataival foglalkoznak [86, 87], de a *Lactobacillus* törzsekre megfigyelt MIC-értékek érthetően alul vizsgáltak., többnyire patogén mikroorganizmusokra vonatkozó adatokat közölnek. Az egyetlen publikáció, amely a *Lactobacillus* törzsekkel kapcsolatos kutatásokat is publikál [88], a MIC értékeket három törzsre adta meg, a különböző molekulatömegű kitozánokra vonatkozóan. A következő MIC értékeket tették közzé 28-224 kDa-ra: *L. plantarum* (0,05–0,05%), *Lactobacillus brevis* (>0,1–0,08%) és *Lactobacillus bulgaricus* (0,1-0,1%). A tanulmányban a kitozán molekulatömegének és pH-jának MIC-re gyakorolt hatását vizsgálták. Ezeket a MIC értékeket a 28-224 kDa tömegű kitozánra adták meg, de a kitozán acetiláltsági fokát nem vették figyelembe, ami szintén hatással van a MIC értékre.

Kísérleteinkben a kitozán koncentrációját a 3.10 fejezetben leírt módszerrel határoztuk meg. A mikrokapszula és az oldódási közeg aránya ugyanakkora volt, mint az áramlási citometriás kísérletekben. A mikrokapszuláról felszabaduló kitozán számításaink szerint 0,043%-os koncentrációt eredményezett a kioldóközegben. A készítményhez és a kísérleteinkhez 50-190 kDa tömegű kitozánt használtunk, amely a H.K. No és munkatársai által megadott nagyságrenddel azonos (28–228 kDa). Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy kísérleteinkben a kioldóközegben az oldott kitozán koncentrációja meghaladja a *L. plantarum*

MIC értékét.

Hipotézisünket további vizsgálatokkal is igazolni szeretnénk volna, melyeket már nem mikrokapszula formulációval végeztünk, hanem az oldott kitozán és a *L. plantarum* kölcsönhatására fókuszáltunk. Vizsgálni kívántuk a *L. plantarum* esetében tapasztalt antibakteriális hatás mechanizmusát. Ebben a vizsgálatokban elsőként három különböző molekulatömegű kitozán termék (LMW, MMW és HMW) MIC értékét határoztuk meg *L. plantarum*-on. Ezen kitozán termékek kereskedelmi forgalomban kapható, gélképzésre és bevonásra használt anyagok. A mikrodilúciós kísérletekben a MIC értékekre mindhárom kitozán esetében 0,007% -ot kaptunk. Ezzel igazoltuk a korábbi feltételezésünket, miszerint a kitozán a MIC-érték feletti koncentrációban jelenik meg a kioldóközegben a kioldódási vizsgálatok során.

6. A kitozán gátló hatásának igazolása és koncentrációfüggésének vizsgálata

Az idő-ölési görbék elemzésével, a CFU értékek alapján kifejezett baktericid hatást figyeltünk meg 0,007 m/v% koncentráció felett mindhárom molekulatömegű kitozán esetében. Baktericid hatást a legalacsonyabb koncentrációnál (0,003%) nem tapasztaltunk, ami korrelál a MIC értékkel. Az idő-ölési vizsgálatban leoltott mintákat áramlási citométerrel is megvizsgáltuk. A *Lactobacillus* életképességét a holt sejtek fluoreszcens jelölésével határoztuk meg. Eredményeink itt is összhangban vannak a Time-Kill Assay vizsgálattal. A *L. plantarum* életképességét a legalacsonyabb koncentrációjú kezelés (0,003 m/v%) esetén nem, de magasabb koncentrációknál (0,015-0,125 m/v%) a kitozán 25-75%-ra csökkentette. Kitozánra a *Lactobacillus* törzsek esetében nem végeztek idő-ölési tesztet, de galluszsav-kitozán származékot teszteltek *S. aureus*-on és *E. coli*-n [76]. Ezekben az idő-ölési vizsgálatokban a baktériumokat a MIC érték többszörösével kezelték, ami egyértelműen mutatja, hogy a MIC feletti koncentráció a baktériumok pusztulását eredményezte.

7. A bakteriális sejttel kitozánnal kialakuló kölcsönhatásának igazolása

A bakteriális sejttel kölcsönhatása bizonyos anyagokkal citoplazmatikus anyagok felszabadulásához vezethet. Ezek a kölcsönhatások csökkentik a membrán integritását, melynek során először a citoplazmában nagyobb koncentrációban található kálium- és foszfátionok szabadulnak fel, majd nagyobb molekulák aminosavak, peptidek és nukleinsavak is kijutnak a sejtől. A kitozán membránpermeabilitásra gyakorolt hatását különböző Gram-negatív baktériumokban (*P. aeruginosa* és *E. coli*) is vizsgálták [89]. Az *E. coli* esetében, a nukleinsavak és fehérjék felszabadulását 260 és 280 nm-en követték az idő függvényében. Amikor a nukleinsav 30 perc elteltével felszabadul, az időgörbe maximuma 40 perc után van 0,1% 50 kDa és 5000 kDa kitozán hatására, majd 100 perc után csökkenő tendenciát mutat. Liu

és munkatársai vizsgálták a sejtmembránok kitozán által okozott károsodását a *S. aureus*-ban, amely egy Gram-pozitív kórokozó baktérium, és megállapította, hogy a folyamat koncentrációfüggő. TEM-mikroszkóppal igazolták, ha a *S. aureus*-t 0,5%-os kitozánnal kezelték, az osztódó sejtek membránja sérült és a sejttartalom elvesztése következett be [90]. Saját eredményeink is hasonló tendenciát mutatnak, a *L. plantarum* kitozánnal való kezelése után, mivel a 0,1%-os kitozán oldat görbéi maximumot mutatnak. Vizsgálatokat végeztünk 0,01%-os és 0,001%-os kitozán oldattal is, mely esetben eltérő tendenciát tapasztaltunk. A 0,001%-os kitozán oldat használatakor alacsony abszorbanciát mértünk, míg a közepes koncentrációban (0,01%) a kontrollhoz hasonlót, de ezeken a görbéken nem figyelhető meg olyan egyértelmű nukleinsav felszabadulás, mint a legmagasabb koncentrációban tapasztalt esetben. Ez arra utal, hogy a baktérium sejtfala csak a 0,1%-os kezelésre válik permeábilissá, ami a fenti idő-ölési eredmények alapján valószínűleg a baktericid hatásra vezethető vissza. Az alacsonyabb koncentrációjú kezeléseknél nem tapasztaltunk a citoplazmából nukleinsav felszabadulást, ami a 0,01%-os kezeléseknél bakteriosztatikus kölcsönhatásra utal. Vizsgálataink során nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a nukleinsav-felszabadulásban a különböző molekulatömegű kitozán termékek között; azonban a közepesmolekulatömegű kitozán görbéjén a maximum megnyúlt, a nukleinsav felszabadulás alacsonyabb a kis- és nagymolekulatömegű kitozánhoz képest. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a közepes molekulatömegű kitozán a kis- és nagymolekulatömegű kitozán fizikai keveréke, amely közepes viszkozitású terméket ad. A közepes molekulatömegű kitozán esetében általában nagyobb szórást tapasztaltunk az eredményekben, ami feltehetően a fenti okból is adódik.

A permeabilitási teszt alapján feltételeztük, hogy koncentrációfüggő kölcsönhatás lép fel a *L. plantarum* Gram-pozitív sejtfala és a kitozán között. Eddig Gram-negatív kórokozó baktériumokon végeztek permeabilitási vizsgálatokat, így a *L. plantarum*, mint Gram-pozitív baktérium esetében célul tűztük ki, hogy alaposabban tájékozódjunk a kölcsönhatás és a gátlás mechanizmusáról. A kitozán polikationos természete miatt várható, hogy a negatív töltésű baktérium sejtfal kölcsönhatásba lép a kitozánnal [91]. A Gram-pozitív baktériumok sejtfalának fő összetevője a peptidoglikánok, amelyekhez kovalensen kötődnek a sejtfalban lokalizálódó teikolsavak (WTA-k) és lipoteikolsavak (LTA-k). Ezek a Gram-pozitív baktériumokban található anionos polimerek, WTA-k, amelyek a sejtfal teljes száraz tömegének csaknem felét teszik ki és nagy sűrűségű negatív töltést biztosíthatnak a sejtfalban [92, 93]. A zéta-potenciál mérésével megvizsgáltuk, hogy ez a kölcsönhatás milyen mértékben befolyásolja a baktériumsejtfal felszínének töltését. A kísérletekben a baktériumszuszpenziókat és a kitozán

oldatokat homogenizáltuk. Az inkubációt követően a folyékony táptalajt centrifugálással eltávolítottuk a mintákból, a sejtszuszpenziót fiziológias sóoldattal mostuk, majd megmértük a zéta potenciált. A zéta-potenciál eredmények alapján megállapítható, hogy a kitozán a minták mosása után is a felszínen maradt, mivel a bakteriális sejtek felülete a kitozán koncentrációjának növekedésével egyre pozitívabb lett. Ez arra utal, hogy minél nagyobb a kitozán koncentrációja, annál jobban befedi a baktériumok felszínét. Nagyobb koncentrációban a polimer láncok összefonódása miatt a kitozán itt úgy viselkedik, mintha nagy molekulatömegű, hosszú lánc lenne. Nagy mérete miatt nem tud belépni a sejtbe, de extracellulárisan kölcsönhatásba lép vele.

Valószínűleg ez a hosszan tartó kölcsönhatás lehetővé teszi a baktériumsejt membránjának megnyílását és permeabilitásának növekedését [94, 95]. A kölcsönhatást konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a membrán fluoreszcens jelölésével és FITC-el jelölt, kismolekulatömegű kitozánnal. Az FM[®]4-64-et membránfestékként használtuk, amelyet endoszómák jelölésére is használnak [96]. Alacsonyabb koncentrációban (0,001%) a kitozán nem egyenletesen oszlik el a baktériumsejt felszínén, amit a FITC-kitozán zöld foltjai jeleznek. Ezenkívül hasonló aggregátumokat figyeltünk meg a bakteriális membránban (piros színű), amelyek átfedésben vannak a FITC-kitozán aggregátumokkal. Alacsony kitozán koncentrációban a helyenként megvastagodott membránstruktúra is utalhat a bakteriális sejtbe jutó kitozán hatására bekövetkező internalizációra [94, 95]. A kitozán 0,001%-os koncentrációnál azonban valószínűleg nem okoz baktericid vagy bakteriosztatikus hatást sem, mivel a MIC-nél alacsonyabb koncentrációnál nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a CFU értékekben. Ennek ellenére a kis molekulatömegű kitozán mintákban a CFU enyhén alacsonyabb a vizsgálat elején, ami bizonyos gátló hatásra utalhat.

6. Összefoglalás

A probiotikus baktériumok mikrokapszulázása számos előnnyel jár. Javíthatja az életképességet, megkönnyíti a tárolást és az adagolást, valamint célzottan képes a megfelelő helyen és időben felszabadulni a gasztrointesztinális rendszerben. A vizsgálatok és formulálás során azonban vannak olyan tényezők, amelyeket figyelembe kell vennünk, mivel jelentős mértékben torzíthatják a vizsgálati eredményeket és csökkenthetik a készítmény hatékonyságát.

A doktori munkámban a mikrokapszula bevonatként alkalmazott kitozán életképesség-csökkentő hatását vizsgáltam a probiotikus – elsősorban *Lactobacillus plantarum* – törzseken. A munkám során az alábbi megállapításokat tettem:

1. A kitozán bevonat a mikrokapszula felszínéről leoldódva csökkentette a *Bifidobacterium bifidum* és a *Lactobacillus plantarum* életképességét. Ezen életképesség-csökkentő hatás miatt a kitozán termoprotektív szerepének értékelése e két törzsnél nem megalapozott. Az *Enterococcus faecium* esetében a kitozán termostabilizáló hatását igazoltam.
2. A kitozán bevonattal ellátott *Lactobacillus plantarum* tartalmú mikrokapszulák mesterséges gyomor-, és bélnedvben történő kioldása során jelentős életképesség csökkenést állapítottam meg.
3. Elsőként határoztam meg a mikrokapszula felszínéről leoldódó kitozán bevonat mennyiségét FITC-el jelölt származék segítségével. Megállapítottam, hogy a kitozán koncentrációja a kioldóközegben a *L. plantarum* MIC értékéhez viszonyítva legalább ötszörös.
4. Igazoltam, hogy a kitozán életképesség-csökkentő hatása koncentrációfüggést mutat a *L. plantarum* esetében. Az általam felhasznált különböző molekulatömegű kitozán származékok életképesség-csökkentő hatása között azonban szignifikáns különbséget nem állapítottam meg.
5. Igazoltam, hogy a kitozán a *L. plantarum* sejtek membránjával létesít irreverzibilis kapcsolatot, mely kölcsönhatás a kitozán polikationos jellegéből adódik. A kitozán életképesség-csökkentő hatása 0,1% koncentrációban a membránintegritás csökkentésével függ össze. Elsőként igazoltam a konfokális mikroszkópos felvételekkel a kitozán *L. plantarum* sejtfalához történő adszorpcióját.

Eredményeim alapján ezért javaslom a probiotikus készítmények preformulációs vizsgálata alatt a felhasznált segédanyagok MIC értékének meghatározását és a kioldódás során kialakuló segédanyag koncentráció meghatározását, hogy következtetéseket tudjunk levonni a készítmény várható hatékonyságáról és stabilitásáról.

7. Conclusion

Microencapsulation of probiotic bacteria has many advantages. It can improve viability, facilitate storage and administration, and can be released in the gastrointestinal system at the right place and time in a targeted manner. However, during examination and formulation, some factors must be considered, as they can significantly influence the test results and the effectiveness of the preparation.

In my doctoral work, I investigated the viability-reducing effect of chitosan applied as a microcapsule coating agent on probiotic strains, mainly *Lactobacillus plantarum*. Based on my work, I made the following conclusions:

1. The chitosan coating dissolved from the surface of the microcapsule and reduced the viability of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus plantarum*. Due to this viability-reducing effect, the assessment of the thermoprotective role of chitosan for these two strains is not established. In the case of *Enterococcus faecium*, I verified the thermostabilizing effect of chitosan.
2. During the dissolution of microcapsules, containing *L. plantarum* coated with chitosan, in artificial gastric and intestinal juice, I experienced a significant decrease in viability.
3. I determined the amount of chitosan coating released from the surface of the microcapsule using a FITC-labeled chitosan for the first time. I found that the concentration of chitosan in the release medium is at least five times higher than the MIC value of *L. plantarum*.
4. I verified that the viability-reducing effect of chitosan on *L. plantarum* is concentration-dependent. However, I found no significant differences among the viability-reducing effect of the chitosan derivatives with different molecular weights that I used.
5. I proved that chitosan establishes an irreversible connection with the membrane of *L. plantarum* cells, which interaction results from the polycationic nature of chitosan. The viability-reducing effect of chitosan at a concentration of 0.1% is related to the reduction of membrane integrity. I confirmed the adsorption of chitosan to the cell wall of *L. plantarum* for the first time with confocal microscopy.

Based on my results, I recommend that the determination of the concentration and MIC values of the excipients used in the preformulation tests of the probiotic preparations is necessary. Therefore, we can predict the expected effectiveness and stability of the preparation.

8. Irodalomjegyzék

8.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Sanders, M.E., *Probiotics: definition, sources, selection, and uses*. Clin Infect Dis, 2008. **46 Suppl 2**: p. S58-61; discussion S144-51.
2. Bell, V., et al., *One Health, Fermented Foods, and Gut Microbiota*. Foods, 2018. **7**: p. 195.
3. Islam, S.U., *Clinical Uses of Probiotics*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(5): p. e2658.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations., *FAO animal production and health paper*, in *Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation*, A.V.K. Yadav S. Bajagai, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar, Editor. 1977, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome,. p. volumes.
5. Czarán, T. and R.F. Hoekstra, *Microbial communication, cooperation and cheating: quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6655.
6. Medellín-Pena, M.J., et al., *Probiotics affect virulence-related gene expression in Escherichia coli O157:H7*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(13): p. 4259-67.
7. Lee, Y.K., et al., *Probiotic Microorganisms*, in *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. 2008. p. 1-176.
8. Taft, D.H., et al., *Bifidobacterium Species Colonization in Infancy: A Global Cross-Sectional Comparison by Population History of Breastfeeding*. Nutrients, 2022. **14**(7).
9. Arsene, M.M.J., et al., *The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics*. Vet World, 2021. **14**(2): p. 319-328.
10. Hazards, E.P.o.B., et al., *Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021*. EFSA J, 2022. **20**(1): p. e07045.
11. Hanchi, H., et al., *The Genus Enterococcus: Between Probiotic Potential and Safety Concerns-An Update*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1791.
12. Bednorz, C., et al., *Feeding the probiotic Enterococcus faecium strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of Escherichia coli pathotypes that adhere to the gut mucosa*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(24): p. 7896-904.
13. Kleerebezem, M., et al., *Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1990-5.

14. Giraud, E., B. Lelong, and M. Raimbault, *Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991. **36**(1): p. 96-99.
15. Matejčková, Z., et al., *Characterization of the growth of Lactobacillus plantarum in milk in dependence on temperature*. Acta Chimica Slovaca, 2016. **9**.
16. Rustanti, N., et al., *Effect of Probiotic Lactobacillus plantarum Dad-13 on Metabolic Profiles and Gut Microbiota in Type 2 Diabetic Women: A Randomized Double-Blind Controlled Trial*. Microorganisms, 2022. **10**(9).
17. Kim, M.J., et al., *Effects of Lactobacillus plantarum CJLP55 on Clinical Improvement, Skin Condition and Urine Bacterial Extracellular Vesicles in Patients with Acne Vulgaris: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study*. Nutrients, 2021. **13**(4).
18. Niedzielin, K., H. Kordecki, and B. Birkenfeld, *A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum 299V in patients with irritable bowel syndrome*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001. **13**(10): p. 1143-7.
19. Hickson, M., et al., *Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial*. BMJ, 2007. **335**(7610): p. 80.
20. Klarin, B., et al., *Lactobacillus plantarum 299v reduces colonisation of Clostridium difficile in critically ill patients treated with antibiotics*. Acta Anaesthesiol Scand, 2008. **52**(8): p. 1096-102.
21. Ghoddusi, H. and A.Y. Tamime, *Microflora of the Intestine: Biology of Bifidobacteria*. 2014. p. 639-645.
22. Kim, S., et al., *Antimicrobial Action of Oleanolic Acid on Listeria monocytogenes, Enterococcus faecium, and Enterococcus faecalis*. PloS one, 2015. **10**: p. e0118800.
23. Bruschi, M.L., *6 - Drug delivery systems*, in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, M.L. Bruschi, Editor. 2015, Woodhead Publishing. p. 87-194.
24. Bakry, A.M., et al., *Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016. **15**(1): p. 143-182.
25. Choudhury, N., M. Meghwal, and K. Das, *Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods*. Food Frontiers, 2021. **2**(4): p. 426-442.
26. Jennings, V., A.F. Thünemann, and S.H. Gohla, *Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **199**(2): p. 167-177.

27. Müller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **242**(1): p. 121-128.
28. Rázga, F., et al., *Production of Ca-alginate microspheres using Buchi encapsulator B-395 PRO*, in *XXII International Conference on Bioencapsulation*. 2014: Bratislava, Slovakia.
29. Buchi. *Operation Manual Encapsulator B-395 Pro*. 2023.04.18]; Available from: http://assets.buchi.com/image/upload/v1605799582/pdf/Operation-Manuals/OM_11593484_B-395_en.pdf.
30. Bekhit, M., et al., *Bioactive Films Containing Alginate-Pectin Composite Microbeads with Lactococcus lactis subsp. lactis: Physicochemical Characterization and Antilisterial Activity*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(2): p. 574.
31. Kieps, J. and R. Dembczynski, *Current Trends in the Production of Probiotic Formulations*. Foods, 2022. **11**(15).
32. dos Santos, R.C.S., L. Finkler, and C.L.L. Finkler, *Microencapsulation of Lactobacillus casei by spray drying*. Journal of Microencapsulation, 2014. **31**(8): p. 759-767.
33. Barbosa, J., et al., *Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder*. Journal of Functional Foods, 2015. **17**: p. 340-351.
34. Cheow, W.S. and K. Hadinoto, *Biofilm-like Lactobacillus rhamnosus probiotics encapsulated in alginate and carrageenan microcapsules exhibiting enhanced thermotolerance and freeze-drying resistance*. Biomacromolecules, 2013. **14**(9): p. 3214-22.
35. Li, W., et al., *Encapsulation of Lactobacillus plantarum in cellulose based microgel with controlled release behavior and increased long-term storage stability*. Carbohydrate Polymers, 2019. **223**: p. 115065.
36. Fu, N. and X.D. Chen, *Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes*. Food Research International, 2011. **44**(5): p. 1127-1149.
37. Broeckx, G., et al., *Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. **505**(1): p. 303-318.
38. Stummer, S., et al., *Fluidized-bed drying as a feasible method for dehydration of Enterococcus faecium M74*. Journal of Food Engineering, 2012. **111**(1): p. 156-165.
39. Strasser, S., et al., *Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria*. Journal of Applied Microbiology, 2009. **107**(1): p. 167-177.

40. Sánchez-Portilla, Z., et al., *Incorporation of *Bifidobacterium* sp. into powder products through a fluidized bed process for enteric targeted release*. Journal of Dairy Science, 2020. **103**(12): p. 11129-11137.
41. Arslan-Tontul, S. and M. Erbas, *Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling*. LWT - Food Science and Technology, 2017. **81**: p. 160-169.
42. Arslan, S., et al., *Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **63**(1): p. 685-690.
43. Avila-Reyes, S.V., et al., *Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability*. Carbohydrate Polymers, 2014. **102**: p. 423-430.
44. Gwak, H.J., et al., *Protective effect of soy powder and microencapsulation on freeze-dried *Lactobacillus brevis* WK12 and *Lactococcus lactis* WK11 during storage*. Food Science and Biotechnology, 2015. **24**(6): p. 2155-2160.
45. Abourehab, M.A.S., et al., *Alginate as a Promising Biopolymer in Drug Delivery and Wound Healing: A Review of the State-of-the-Art*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(16).
46. Hay, I.D., et al., *Microbial alginate production, modification and its applications*. Microb Biotechnol, 2013. **6**(6): p. 637-50.
47. Eiselt, P., K.Y. Lee, and D.J. Mooney, *Rigidity of Two-Component Hydrogels Prepared from Alginate and Poly(ethylene glycol)–Diamines*. Macromolecules, 1999. **32**(17): p. 5561-5566.
48. Smeds, K.A., et al., *Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation*. J Biomed Mater Res, 2001. **54**(1): p. 115-21.
49. Seifert, D.B. and J.A. Phillips, *Production of Small, Monodispersed Alginate Beads for Cell Immobilization*. Biotechnology Progress, 1997. **13**(5): p. 562-568.
50. Whelehan, M. and I.W. Marison, *Microencapsulation using vibrating technology*. J Microencapsul, 2011. **28**(8): p. 669-88.
51. Ibrahim, H.M. and E.M.R.E.-. Zairy, *Chitosan as a Biomaterial — Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers*, in *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*, B. Varaprasad, Editor. 2015, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 4.
52. Kou, S.G., L.M. Peters, and M.R. Mucalo, *Chitosan: A review of sources and preparation methods*. Int J Biol Macromol, 2021. **169**: p. 85-94.
53. Kozma, M., B. Acharya, and R. Bissessur, *Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications*. Polymers (Basel), 2022. **14**(19).

54. Percot, A., C. Viton, and A. Domard, *Optimization of chitin extraction from shrimp shells*. Biomacromolecules, 2003. **4**(1): p. 12-8.
55. Tan, Y.N., P.P. Lee, and W.N. Chen, *Microbial extraction of chitin from seafood waste using sugars derived from fruit waste-stream*. AMB Express, 2020. **10**(1): p. 17.
56. Aspras, I., M.M. Jaworska, and A. Gorak, *Kinetics of chitin deacetylase activation by the ionic liquid [Bmim][Br]*. J Biotechnol, 2017. **251**: p. 94-98.
57. Cheung, R.C., et al., *Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications*. Mar Drugs, 2015. **13**(8): p. 5156-86.
58. Ke, C.L., et al., *Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan*. Polymers (Basel), 2021. **13**(6).
59. Bellich, B., et al., *"The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans*. Mar Drugs, 2016. **14**(5).
60. Ramos, P., et al., *Physiological Protection of Probiotic Microcapsules by Coatings*. Critical reviews in food science and nutrition, 2017. **58**.
61. Ismail, M., et al., *Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of Lactobacillus plantarum LAB12*. International Journal of Biological Macromolecules, 2014. **72**: p. 1419-1428.
62. Pupa, P., et al., *Use of Lactobacillus plantarum (strains 22F and 25F) and Pediococcus acidilactici (strain 72N) as replacements for antibiotic-growth promotants in pigs*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 12028.
63. Lopes, L.A.A., et al., *Spreadable goat Ricotta cheese added with Lactobacillus acidophilus La-05: Can microencapsulation improve the probiotic survival and the quality parameters?* Food Chemistry, 2021. **346**: p. 128769.
64. Wu, Q.-X., et al., *Evaluation of chitosan hydrochloride-alginate as enteric micro-probiotic-carrier with dual protective barriers*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **93**: p. 665-671.
65. Mi, Y., et al., *Preparation of N,O-carboxymethyl chitosan coated alginate microcapsules and their application to Bifidobacterium longum BIOMA 5920*. Materials science & engineering. C, Materials for biological applications, 2013. **33**(5): p. 3047-3053.
66. Ta, L.P., et al., *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*. Int J Biol Macromol, 2021. **183**: p. 1136-1144.
67. Cook, M., et al., *Microencapsulation of a synbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels*. International journal of pharmaceutics, 2014. **466**.

68. Chen, H., et al., *Effect of complexation conditions on microcapsulation of Lactobacillus acidophilus in xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels*. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2015. **14**: p. 207-213.
69. Graff, S., et al., *Increased Intestinal Delivery of Viable Saccharomyces boulardii by Encapsulation in Microspheres*. Pharmaceutical research, 2008. **25**: p. 1290-6.
70. Torpac. *ProFunnel SellSheet 1802 TNP.docx*. 2023.02.25.]; Available from: <https://www.torpac.com/Reference/ProFunnel%20SellSheet.pdf>.
71. Cook, M.T., et al., *Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria*. Biomacromolecules, 2011. **12**(7): p. 2834-40.
72. Je, J.Y. and S.K. Kim, *Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(18): p. 6629-33.
73. Surono, I., et al., *Microencapsulation increases survival of the probiotic Lactobacillus plantarum IS-10506, but not Enterococcus faecium IS-27526 in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the upper gastrointestinal tract*. J Appl Microbiol, 2018. **124**(6): p. 1604-1609.
74. Tan, E.W., et al., *Enhanced gastrointestinal survivability of recombinant Lactococcus lactis using a double coated mucoadhesive film approach*. PLoS One, 2019. **14**(7): p. e0219912.
75. Zawari, M., et al., *Formulation of Broccoli Sprout Powder in Gastro-Resistant Capsules Protects against the Acidic pH of the Stomach In Vitro but Does Not Increase Isothiocyanate Bioavailability In Vivo*. Antioxidants (Basel), 2019. **8**(9).
76. Gartzandia, O., et al., *Preparation and Characterization of Resveratrol Loaded Pectin/Alginate Blend Gastro-Resistant Microparticles*. Molecules, 2018. **23**(8).
77. Bunthof, C.J., et al., *Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(5): p. 2326-35.
78. Kramer, M., et al., *Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **84**(6): p. 1137-47.
79. Matulyte, I., G. Kasparaviciene, and J. Bernatoniene, *Development of New Formula Microcapsules from Nutmeg Essential Oil Using Sucrose Esters and Magnesium Aluminometasilicate*. Pharmaceutics, 2020. **12**(7).
80. Roth, B.L., et al., *Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(6): p. 2421-31.
81. Deng, Z., et al., *The Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria and Their Applications in Animal Husbandry*. Curr Microbiol, 2021. **79**(1): p. 22.

82. Albadran, H.A., et al., *Stability of probiotic Lactobacillus plantarum in dry microcapsules under accelerated storage conditions*. Food Res Int, 2015. **74**: p. 208-216.
83. Chávarri, M., et al., *Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions*. International journal of food microbiology, 2010. **142**(1-2): p. 185-189.
84. Mawad, A., et al., *E. coli Nissle microencapsulation in alginate-chitosan nanoparticles and its effect on Campylobacter jejuni in vitro*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(24): p. 10675-10690.
85. Olivares, A., P. Silva, and C. Altamirano, *Microencapsulation of probiotics by efficient vibration technology*. Journal of Microencapsulation, 2017. **34**(7): p. 667-674.
86. Sahariah, P. and M. Masson, *Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship*. Biomacromolecules, 2017. **18**(11): p. 3846-3868.
87. Verlee, A., S. Mincke, and C.V. Stevens, *Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives*. Carbohydr Polym, 2017. **164**: p. 268-283.
88. No, H.K., et al., *Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights*. Int J Food Microbiol, 2002. **74**(1-2): p. 65-72.
89. Li, X.-f., et al., *Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism*. Carbohydrate Polymers, 2010. **79**(3): p. 493-499.
90. Liu, H., et al., *Chitosan kills bacteria through cell membrane damage*. Int J Food Microbiol, 2004. **95**(2): p. 147-55.
91. Tamara, F.R., et al., *Antibacterial Effects of Chitosan/Cationic Peptide Nanoparticles*. Nanomaterials (Basel), 2018. **8**(2).
92. Chapot-Chartier, M.P. and S. Kulakauskas, *Cell wall structure and function in lactic acid bacteria*. Microb Cell Fact, 2014. **13 Suppl 1**(Suppl 1): p. S9.
93. Yan, D., et al., *Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections*. Molecules, 2021. **26**(23).
94. Chen, J., et al., *Cationic nanoparticles induce nanoscale disruption in living cell plasma membranes*. J Phys Chem B, 2009. **113**(32): p. 11179-85.
95. Wang, Y., et al., *Effect of polymer chain length on membrane perturbation activity of cationic phenylene ethynylene oligomers and polymers*. Langmuir, 2011. **27**(17): p. 10770-5.
96. Lam, S.K., et al., *BFA-induced compartments from the Golgi apparatus and trans-Golgi network/early endosome are distinct in plant cells*. Plant J, 2009. **60**(5): p. 865-81.

8.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/121/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Erdélyi Lóránd József
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10083518

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, R. L.^{*}, Erdélyi, L. J.^{*}, Fenyvesi, F., Balla, N., Kovács, F., Vámosi, G., Klusóczki, Á., Gyöngyösi, A., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Váradi, J.: Concentration-Dependent Antibacterial Activity of Chitosan on *Lactobacillus plantarum*. *Pharmaceutics*. 15 (1), 1-11, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15010018>
^{*} These authors contributed equally to this work.
IF: 6.525 (2021)
2. Erdélyi, L. J., Fenyvesi, F., Gál, B., Haimhoffer, Á., Vasvári, G., Budai, I., Gálné Remenyik, J., Bereczki, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Kovács, R. L., Váradi, J.: Investigation of the Role and Effectiveness of Chitosan Coating on Probiotic Microcapsules. *Polymers*. 14 (9), 1-18, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/polym14091864>
IF: 4.967 (2021)

További közlemények

3. Erdélyi, L. J., Váradi, J.: Lokális antibiotikum-felhasználás csökkentése, illetve kiváltása sebkezelésben. *Gyógyszerészet*. 67, 199-202, 2023.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,492

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,492

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.04.24.



9. Ábrajegyzék

1. ábra Porlasztva szárítás sematikus ábrája [24]
2. ábra Koaxiális elektro spray rendszer sematikus ábrája [24]
3. ábra Fluidizációs eljárások sematikus ábrája [24]
4. ábra Extrudálás sematikus ábrája [25]
5. ábra Buci 395-Pro sematikus ábrája [29]
6. ábra A target sejt és a különböző polimerlánc-konfigurációjú kitozán közötti kölcsönhatás mechanizmusai a molekulatömeg különbségek szerint [52].
7. ábra A kitozán gélképző mechanizmusai; ionos térhálósítás (A), kovalens térhálósítás (B), polielektrolit komplexképzés (C), önrendeződés (D) [59]
8. ábra Manuális kapszulatöltés [70]
9. ábra A különböző bevonatokkal formulált vizsgálati csoportjaink
10. ábra A hőterhelés vizsgálata különböző körülmények között az egyes probiotikus mikrokapszulákon.
11. ábra A tárolási idő hatása a *L. plantarum* életképességére.
12. ábra A bevont és bevonatmentes mikrokapszulák jellemzése.
13. ábra Az elemi spektroszkópia eredményei.
14. ábra Mikrokapszulával töltött, bevonat nélküli (a) és Eudragit L100-55 bevonatú zselatin kapszula (b). Zselatin kapszulák kioldódási eredménye (c).
15. ábra Mikrokapszula kioldása 2,0 pH PBS közegben (a) és 7,4 pH PBS közegben (b).
16. ábra A nem bevont alginát (a), kitozánnal bevont (b) és Eudragit-bevont (c) mikrokapszulákból kioldott *L. plantarum* sejtek életképességének vizsgálata áramlási citométeren.
17. ábra *L. plantarum* felszabadulása a mikrokapszulákból (a), és a felszabadult baktériumok (b) életképessége az idő függvényében.
18. ábra Az idő-ölés görbe a kis (a), a közepes(b) a nagy molekulatömegű kitozánra (c) és az Eudragit L100-55(d) bevonat anyagaira.
19. ábra Az idő-ölési vizsgálat eredményei áramlási citometriás meghatározással.

20. ábra Membránintegritás vizsgálata 260nm-en mért abszorbancia változással. A vizsgálatot triplikátumban végeztük, n=3

21. ábra Zéta potenciál változás meghatározása különböző molekulatömegű kitozánok hatására.

22. ábra Az *L. plantarum* konfokális mikroszkópos képei 0,001% (a), 0,01% (b), 0,1% (c) és 1% (d) FITC jelöléssel ellátott LMW kitozán (LMW*) kezelés után.

Táblázatok

1. Táblázat Az állatok takarmányozásában leggyakrabban alkalmazott probiotikus törzsek[4]

2. Táblázat A mikrokapszulázásra kiválasztott probiotikus törzsek nemzettségeinek bemutatása a főbb jellemzőik alapján

3. táblázat A probiotikus mikroorganizmusok mikrokapszulázásának módszerei

4. Táblázat A kitozán alkalmazása a probiotikus törzsek mikrokapszulázása során

10. Tárgyszavak

kitozán, *Lactobacillus*, mikrokapszulázás, probiotikum, antimikrobiális hatás

11. Keywords

chitosan, *Lactobacillus*, microencapsulation, probiotic, antimicrobial effect

12. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom Dr. Váradi Judit témavezetőmnek, hogy még hallgatóként, a TDK keretein belül kísérletes kutatómunkára adott lehetőséget a Gyógyszertechnológiai tanszéken. Iránymutatásával elkészíthettem szakdolgozatomat, majd folytathattam a munkát PhD hallgatóként. Köszönöm, hogy bármikor számíthattam ötleteire, tanácsaira és szaktudására. Köszönöm a kezdetektől való támogatását, az építő szakmai kritikákat és azt a baráti munkakapcsolatot, ami jellemezte közös munkánkat.

Köszönetet kell mondanom Prof. Dr. Bácskay Ildikónak és Prof. Dr. Vecsernyés Miklósnak, hogy lehetőséget biztosítottak a Gyógyszertechnológiai Tanszéken a kísérleti tudományos munka végzésére és hogy későbbiekben a PhD doktori kutatásaimhoz az anyagi hététeret biztosították.

Köszönettel tartozok a Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház vezetésének, illetve a Gyógyszerészeti Osztály vezetőjének, Hutyánné Dr. Somogyi Aranka Főgyógyszerész Asszonynak, hogy engedélyezték a PhD képzésbe való belépésemet.

Hálás vagyok Dr. Remenyik Judit a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar tudományos főmunkatársának és a kar vezetésének, hogy a TDK munkám alapgondolatát adták és anyagi támogatást adtak. Külön köszönöm Tanárnő tutori támogatását is a PhD munkám során.

Köszönöm a segítséget a Gyógyszertechnológiai Tanszékről Dr. Haimhoffer Ádámak és Dr. Gál Bernadettek a fluidizációs eljárás kidolgozásáért és kivitelezéséért, Dr. Vasvári Gábornak a zselatin kapszulák bevonásában és töltésében nyújtott segítségéért. Dr. Budai Istvánnak, a Debreceni Egyetem Műszaki Karán készült SEM felvételekért, Dr. Bakai Bereczki Ilonának a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerész Kémiai Tanszékén a FITC-el jelölt kitozán elkészítéséért, Dr. Vámosi Györgynek a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében készült konfokális mikroszkópos felvételek.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács Renátónak, valamint Kovács Fruzsina és Balla Noémi PhD hallgatóknak, a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében végzett segítő munkájukért, a baktériumok tenyésztésért, az életképességi vizsgálatokért, a CFU meghatározásokért, a MIC érték meghatározásáért és az ezzel járó számtalan leoltásért.

Köszönöm továbbá a segítséget Dr. Fenyvesi Ferencnek, a Gyógyszertechnológiai Tanszék munkatársának az áramlási citometriás mérések elvégzéséért, valamint köszönettel tartozom

még a sok szakmai iránymutatásért, amit kaptam tőle.

Köszönetet szeretnék még mondani a Gyógyszertechnológiai Tanszék minden név szerint nem említett munkatársának.

Végül, de nem utolsó sorban, kifejezhetetlen hálával tartozok a Családomnak a támogatásukért és azért, hogy megteremtették azt a kiegyensúlyozott, nyugodt háttérrel, ami lehetővé tette, hogy eddig eljussak.

13.Függelék