



## PROBIOTIKUS BAKTÉRIUMTÖRZSEK SZELEKTÁLÁSÁRA ALKALMAS KÍSÉRLETI RENDSZER EGYES ELEMEINEK KIDOLGOZÁSA

SÜLE JUDIT<sup>1\*</sup> - VARGA LÁSZLÓ<sup>2,3</sup> - VARGA KAROLINA<sup>2</sup> - HATVAN ZOLTÁN<sup>2</sup>  
- SZAFNER GÁBOR<sup>1</sup> - BUZÁS HENRIETTA<sup>1,3</sup> - KERÉNYI ZOLTÁN<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft., Mosonmagyaróvár

<sup>2</sup> Széchenyi István Egyetem Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar, Mosonmagyaróvár

<sup>3</sup> Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi  
Multidiszciplináris Doktori Iskola, Mosonmagyaróvár

<sup>4</sup> Carlsbad Research Organization Kft., Mosonmagyaróvár

### ÖSSZEFOGLALÁS

A célunk olyan mérési módszerek kidolgozása és értékelése volt, amelyekkel viszonylag gyorsan és hatékonyan lehet akár állati, akár humán eredetű, potenciálisan probiotikus baktériumtörzsek gyomorsavval és epesavval szembeni ellenállását tesztelni. Három eljárást vizsgáltunk, melyek közül az *in vitro* emésztési modell szolgáltatta a legmegbízhatóbb eredményeket. A másik két metódus (cseppentéses-, illetve folyadékkultúrás módszer) előszelektálásra bizonyult alkalmasnak, ugyanis elsősorban azt képesek jelezni, hogy mely törzseket érdemes alávetni a hosszadalmasabb *in vitro* emésztési protokollnak.

**Kulcsszavak:** probiotikumok, savtűrés, epesavtűrés, *in vitro* vizsgálatok

### BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyeket megfelelő mennyiségben alkalmazva jótékonyan befolyásolják a gazdaszervezet egészségét (Anadón *et al.* 2006,

Hill et al. 2014; Fijan et al. 2019). Számos feltételnek kell eleget tenniük ahhoz, hogy a probiotikus jelzőt viselhessék. Egyebek mellett fokozott tűrőképességgel szükséges rendelkezniük a különféle testfolyadékokkal (gyomorsav, epesavak, emésztőenzimek) szemben és adhéziós képességük révén, a bélhámşövet sejtjeihez kötődve stabilizálniuk kell a bélmikrobiótát (Szakály 2004).

Az egészségre jótékony hatást kifejtő probiotikus termékek iránt világszerte növekvő igény mutatkozik, legyen szó akár humán táplálkozásról, akár haszonállatok takarmányozásáról. A haszonállattartók a probiotikumok alkalmazásától hozamfokozó hatásokat és az értékmérő tulajdonságok (pl. takarmányértékesítő képesség, hústermelő képesség) javulását várják (Anadón et al. 2006, Papadimitriou et al. 2015). Az Európai Unió 2006-tól betiltotta az antibiotikumok hozamfokozó célból történő alkalmazását, ezt követően kerültek még inkább a figyelem középpontjába a probiotikumok (European Parliament, Council of the European Union 2003; Essősy et al. 2020). A piacon jelenleg elérhető termékekről csak korlátozott mennyiségű tudományos információ áll rendelkezésre, így nem ismert, hogy valóban javítják-e a haszonállatok teljesítménymutatóit. Ezt komplex és költséges állatkísérletekkel lehet ellenőrizni.

Évről-évre baktériumtörzsek sokaságát izolálják azzal a céllal, hogy egészségre gyakorolt pozitív hatásait kiaknázzák. A komplex és költséges állatkísérleteket meg kell előznie egy *in vitro* vizsgálatokból álló szelekciós rendszernek, mellyel egyszerűen, gyorsan és költséghatékonyan kiválaszthatók azok a törzsek – a több száz vagy akár több ezer izolátum közül –, amelyek remélhetőleg probiotikusnak bizonyulnak majd az *in vivo* kísérletek során (Anadón et al. 2006, Papadimitriou et al. 2015, Williams et al. 2015, Antal et al. 2020).

## SAJÁT VIZSGÁLAT

Munkánk célja olyan *in vitro* mérési módszerek kidolgozása és értékelése volt, amelyekkel gyorsan és hatékonyan lehet baktériumtörzsek gyomorsav és epesav destruktív hatásával szembeni ellenállóságát vizsgálni. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy melyek azok az *in vitro* módszerek, amelyek alkalmazásával ismeretlen izolátumok közül a jó sav-, és epesav-tűrő baktériumtörzsek kiválaszthatók. E tulajdonságok vizsgálatára, kontroll törzsek mérésével beállítottuk a kísérleti rendszer paramétereit és kidolgoztuk a mérési protokollokat.

A tesztelt törzseket kereskedelmi forgalomban lévő sertés-probiotikumokból izoláltuk, feltételezve, hogy jól fognak teljesíteni, mivel e készítmények forgalomba hozatala előtt a gyártónak állatkísérletekkel kellett bizonyítania az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság (EFSA) felé a készítmény hatékonyságát és ártalmatlanságát. Az *in vitro* körülmények modellezésének három lehetséges módszerét mutatjuk be közleményünkben:

- savval vagy epesavval kiegészített szilárd táptalaj felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálat;
- folyadékkultúrában végzett sav- vagy epesav-kezelés és azt követő élősejtszám-meghatározás;
- sertés emésztőrendszerében uralkodó viszonyokat szimuláló *in vitro* emésztési modell.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### A kísérletekbe bevont baktériumtörzsek

Vizsgálatainkat az *1. táblázat*ban felsorolt baktériumtörzsekkel végeztük.

1. táblázat: A kísérletekbe bevont baktériumtörzsek

Table 1: Bacterial strains involved in this study

Faj	Törzs	Forrás
<i>Streptococcus thermophilus</i>	TH-4	Chr. Hansen, Hørsholm, Dánia
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA-5	Chr. Hansen, Hørsholm, Dánia
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 4515	Fecinor Soluble Plus (Evonik, Essen, Németország)
<i>Enterococcus faecium</i>	NCIMB 10415	Piglobin (Sano, Loiching, Németország)
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 7134	Piglet Protector (Biochem, Lohne, Németország)
<i>Enterococcus faecium</i>	Ismeretlen (MTKL.B32)	Agroferm Pig (Tolnagro, Szekszárd)

### **Baktériumtörzsek izolálása, tartósítása és tárolása**

Kereskedelmi forgalomban lévő, Fecinor Soluble Plus (Evonik, Essen, Németország), Piglobin (Sano, Loiching, Németország), Piglet Protector (Biochem, Lohne, Németország) és Agroferm Pig (Tolnagro, Szekszárd) elnevezésű készítményekből a következőképpen izoláltuk az *E. faecium* törzseket: a készítmények 10–10 g-ját 90 ml ¼ erősségű Ringer-oldatban hígítottuk. Ezt követően decimális hígítási sort készítettünk mindegyik alaphígításból, majd a  $10^{-4}$ – $10^{-10}$  hígítási tagokat leoltottuk szelektív táptalajra, felületi szélesztéssel. Az *E. faecium* szelektív kimutatása CATC (Citrát Azide Tween Carbonate) agaron (Biolab, Budapest) történt, 37 °C-on 24–48 óráig tartó aerob tenyésztéssel.

Az állati probiotikumokból izolált törzsek tárolása glicerines törzsoldatban történt. 3 ml CASO (Casein peptone–soymeal peptone) tápvesbe belemostunk egy kacsnyi, CATC agar felületéről levett törzset, majd inkubáltuk a törzs igényeinek megfelelő körülmények között (*Enterococcus faecium* törzsek esetén 37 °C, 24–48 óra, aerob körülmények). Krio (fagyasztó) csőbe adagoltunk 300 µl-t a felszaporított tenyészetből és 900 µl 60%-os glicerinnel oldatot adtunk hozzá, vortexeltük és cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk kb. 30 mp-ig. A tárolás -80 °C-on történt, ultramély-fagyasztóban.

**Baktériumtörzsek felélesztése és tenyésztése**

A vizsgálandó törzseket a 2. táblázatban közölt paraméterek szerint élesztettük fel és tenyésztettük.

2. táblázat: A kísérletekbe bevont baktériumtörzsek felélesztésének és tenyésztésének körülményei

Table 2: Culturing conditions used to grow the bacterial strains involved in this study

Törzs	Tápleves	Szelektív táptalaj	Inkubálási körülmények
<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4	M17 leves (Biokar, Bécs, Ausztria)	M17 agar (pH = 6,8; Biokar)	37 °C, 48 óra, aerob
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	MRS leves (VWR, Debrecen)	MRS agar (pH = 6,2; VWR)	37 °C, 72 óra, anaerob
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 4515	CASO leves (VWR)	MRS agar (pH = 6,2; Carl Roth, Karlsruhe, Németország)	37 °C, 24–48 óra, aerob
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	CASO leves (VWR)	MRS agar (pH = 6,2; Carl Roth)	37 °C, 24–48 óra, aerob
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134	CASO leves (VWR)	MRS agar (pH = 6,2; Carl Roth)	37 °C, 24–48 óra, aerob
<i>Enterococcus faecium</i> MTKI.B32	CASO leves (VWR)	MRS agar (pH = 6,2; Carl Roth)	37 °C, 24–48 óra, aerob

**Savval és epesavval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálatok**

*A vizsgálatokhoz szükséges savas és epés táptalajok*

A savtűrés vizsgálatához az M17 (Biokar, Bécs, Ausztria), valamint az MRS táptalajokat (VWR, Debrecen és Carl Roth, Karlsruhe, Németország) előírás szerint előkészítettük, majd sterilizálás előtt 1 M NaOH-dal, ill. 1 M HCl-dal a következő pH-értékekre állítottuk be: 7,0; 6,0; 5,5; 5,0; 4,0; 3,0. A táptalajok sterilizálását követően lemezeket öntöttünk.

Az epesavtűrés vizsgálatához az M17 (Biokar) és az MRS táptalajokat (VWR és Carl Roth) előírás szerint előkészítettük, majd sterilizálás után sterilre szűrt sertéséjét (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk a 45 °C-ra visszahűtött tápközegekhez úgy, hogy a táptalajban az epe végleges koncentrációja 0%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%, ill. 2,0% (m/V%) legyen.

#### *Törzsélesztés és optikai denzitás (OD) mérés*

A baktériumtörzseket a 2. táblázatban feltüntetett paraméterek szerint élesztettük fel. A felszaporított, egynapos törzstenyészet tízszeres hígításának optikai denzitás (OD) értékét 600 nm-en mértük. Egységesen  $OD_{600} = 0,5$  értékű oldatokat készítettünk. A tízszeres hígítású minták  $OD_{600}$  értékét megbízhatóbbnak ítéltük, hiszen a spektrofotométer a hígabb, és így kevesebb ülepedő részecskét tartalmazó mintákat nagyobb pontossággal méri, mint a tömény, jobban ülepedő mintákat. A tízszeres hígítású törzsszuszpenziók értékeit megszoroztuk tízzel, hogy megkapjuk az eredeti, hígítatlan minták OD-értékét.

#### *Jelenlét-hiány vizsgálat*

Az  $OD_{600} = 0,5$  értékre beállított tenyészetekből egyenként  $9 (3 \times 3 \text{ ismétlés}) \times 10 \mu\text{l}$ -t a táptalajok felületére cseppentettük, majd a 2. táblázatban feltüntetettek szerint inkubáltuk őket. Az inkubációs idő letelte után megvizsgáltuk, hogy a cseppek helyén szaporodott-e az adott törzs.

#### Folyadék kultúrában végzett sav-, illetve epesav-kezelés és azt követő élősejtszám-meghatározás

#### *Kezelőfolyadékok és elkészítésük*

0,126 g sertésepét (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, United States) feloldottunk 9 ml desztillált vízben és mágneses keverőn kevertettük. Maximum 40 °C-ig melegítettük az epeoldatot, majd 0,45  $\mu\text{m}$  pórusátmérőjű membránszűrőn sterilre szűrtük. Az 1,4%-os epeoldat 900  $\mu\text{l}$  tenyészet hozzáadása után felére, azaz 0,7%-ra hígult.

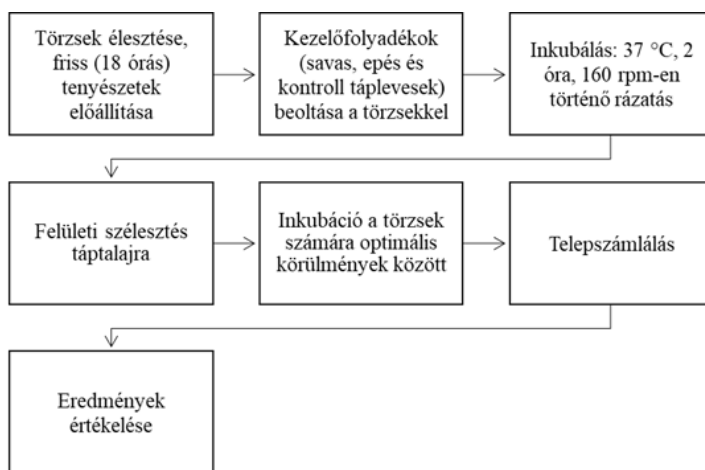
50–50 ml steril CASO-, M17- és MRS-leves pH-értékét 2,0-re állítottuk be 1 M HCl-oldattal. Az egyes levesek pH-értékének 2,0-nek kellett lennie ahhoz, hogy 900  $\mu\text{l}$  törzstenyészet és 900  $\mu\text{l}$  tápleves összeöntése után az Eppendorf csőben a pH-érték 3,0 legyen.

### Kezelésre történő előkészítés és optikai denzitás mérés

A felélesztés körülményei a 2. táblázatban láthatók. Az optikai denzitás mérését a “Törzsélesztés és optikai denzitás (OD) mérés” című alfejezetben ismertettek szerint végeztük.

### Epesav- és sósavkezelés folyamata

Az epesav- és sósavkezelés folyamatát az 1. ábra illusztrálja.



1. ábra: Epesav- és sósavkezelés folyamatábrája

Figure 1. Flowchart of treatments with bile acids and hydrochloric acid

A vizsgált baktériumtörzseket négy kezelésnek vetettük alá: (a) epe nélküli kontroll tápleves (desztillált vizes), (b) epével kiegészített tápleves, (c) sav nélküli kontroll tápleves és (d) savval kiegészített tápleves. A frissen elkészített kezelőfolyadékokból 900 µl-t 2 ml-es reakciócsövekbe pipettáztunk. A kiadagolt kezelőfolyadékokra ráértünk 900 µl törzstenyészetet, majd 37 °C-on, szemiaerob körülmények között, síkrázón (160 rpm-en), 2 órán keresztül ráztuk az oldatokat.

Az epesavtűrés vizsgálatának tervezésekor a sertés emésztési sajátosságait vettük figyelembe, tehát sertés eredetű epét használtunk, a szakirodalomban számos helyen említett ökörepe helyett. A sertésepe 0,7% epesavas sót tartalmaz (Chiba 2014). A kétórás kezelési időtartam megválasztása a sertés emésztőrendszerében zajló körülményeknek (a

sertésével a tápanyagok 2 órán keresztül emésztődnek) megfelelően történt (Yeo *et al.* 2016).

### *Leoltás és élősejtszám-meghatározás*

A kontroll és a kezelt baktériumtenyészetekből hígítási sort készítettünk, majd steril szélesztőgyöngyök (Rattler Plating Beads, Zymo Research Corp.) segítségével, szelektív táptalajon elszélesztettünk 100 µl tenyészetet. A szelektív tenyésztés körülményei a 2. táblázatban láthatók. Az inkubációs idő letelte után telepszámlálást végeztünk.

### *In vitro* emésztési modell

Az *in vitro* emésztési modell beállításához a Yeo *et al.* (2016) által leírt emésztési protokollt vettük alapul. A modell három szakaszból épül fel: a száj-, a gyomor-, és a vékonybél-fázisból.

### *A szerves-, a szervetlen-, és a pufferoldatok, valamint az emésztőnedvek előkészítése*

A szervetlen oldatokat a 3. táblázatban, a szerves oldatokat pedig a 4. táblázatban szereplő mennyiségeknek megfelelően, analitikai mérlegen bemértük és mágneses keverővel beoldódásig kevertettük.

### 3. táblázat: Szervetlen oldatok

Table 3: Inorganic solutions used in the *in vitro* digestion model

Szervetlen komponens	Desztillált víz (ml)	Bemért tömeg (g)
KCl	100	8,960
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	4,440
NaCl	100	17,500
NaHCO <sub>3</sub>	100	8,470
NH <sub>4</sub> Cl	50	1,530
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	0,800
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100	1,060
CaCl <sub>2</sub>	100	1,665

Megjegyzés: A szervetlen oldatok előre elkészíthetők és 121 °C-on, 15 percig sterilizálhatók.



4. táblázat: Szerves oldatok

Table 4: Organic solutions used in the in vitro digestion model

Szerves komponens	Desztillált víz (ml)	Bemért tömeg (g)
Karbamid	50	1,250
Glükóz	50	3,250
Glükuronsav	50	0,100
Glükózamin	50	2,825

Megjegyzés: A szerves oldatokat mindig frissen kell elkészíteni és tilos autoklávozni!

Az 5. táblázat alapján összemértük külön a szerves és külön a szervesetlen összetevőket a három kezelőfolyadékra megfelelően, majd desztillált vízzel kiegészítettük 250 ml-re. Az így kapott  $3 \times 250$  ml szerves és  $3 \times 250$  ml szervesetlen oldatot összeöntöttük, előállítva a háromféle, egyenként 500 ml mennyiségű puffer kezelőfolyadékokat. Az oldatokat vízfürdőben 37 °C-ra melegítettük.

5. táblázat: Pufferoldatok elkészítése

Table 5: Preparation of buffer solutions

Oldat	Gasztrikus	Duodenum	Epe
	puffer		
Szervesetlen	7,85 ml NaCl	20 ml NaCl	15 ml NaCl
	1,5 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 ml NaHCO <sub>3</sub>	34,15 ml NaHCO <sub>3</sub>
	4,6 ml KCl	5 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,1 ml KCl
	9 ml CaCl <sub>2</sub>	3,15 ml KCl	75 µl HCl 37%
	5 ml NH <sub>4</sub> Cl	5 ml MgCl <sub>2</sub>	
	3,25 ml HCl 37%	90 µl HCl 37%	
Szerves	5 ml glükóz	2 ml karbamid	5 ml karbamid
	5 ml glükuronsav		
	1,7 ml karbamid		
	5 ml glükózamin		

A puffer kezelőfolyadékokból 50 ml-t kipipettáztunk, majd a 6. táblázatban szereplő egyéb komponenseket hozzáértük és mágneses keverővel beoldódásig kevertettük. Az így kapott oldatokat 37 °C-os vízfürdőben tároltuk a gasztrikus kezelés megkezdéséig.

6. táblázat: 50 ml emésztőnedv elkészítéséhez szükséges egyéb komponensek

Table 6: Other components needed to prepare 50 ml of digestive fluids

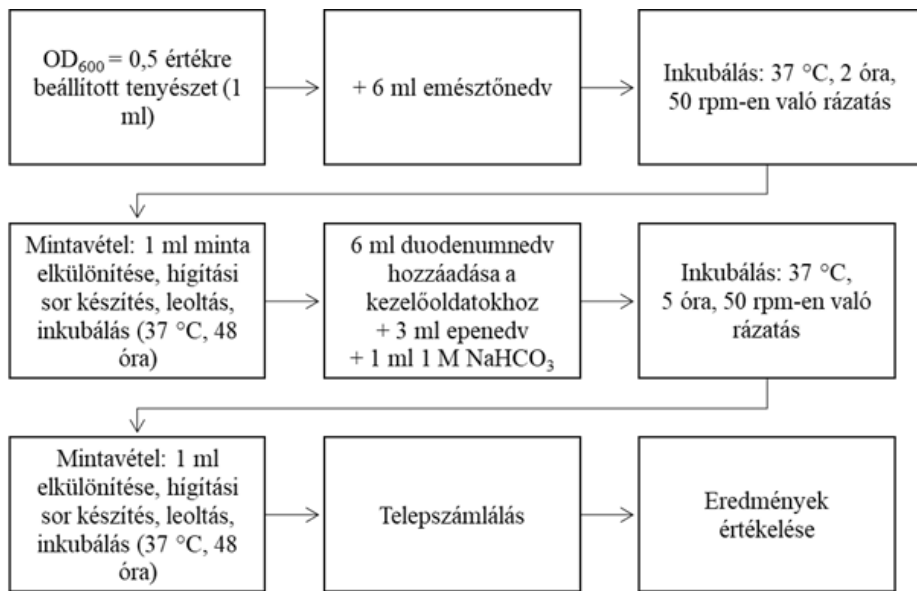
Komponens	Mennyiség
<i>Gyomornedv</i>	
BSA (bovine serum albumin)	0,050 g
Pepszin	0,125 g
Mucin	0,275 g
<i>Duodenumnedv</i>	
BSA	0,050 g
Pankreatin	0,450 g
Lipáz	0,075 g
CaCl <sub>2</sub>	450 µl
<i>Epenedv</i>	
BSA	0,090 g
Sertésepe	1,500 g
CaCl <sub>2</sub>	500 µl

#### *Optikai denzitás mérés*

Az optikai denzitás mérését a “Törzsélesztés és optikai denzitás (OD) mérés” című alfejezetben ismertetettek szerint végeztük.

#### *A gasztrikus emésztései modell leírása*

Ahogy a 2. ábra szemlélteti, a felfaporított és OD<sub>600</sub> = 0,5 értékre beállított tenyészetekből 1–1 ml-t pipettáztunk steril kémcsövekbe. Ehhez hozzáadtunk 6 ml emésztőnedvet, majd 2 órán keresztül, 37 °C-on, síkrázón (50 rpm-en) rázattuk. Az inkubációs idő letelte után mintát vettünk (1 ml), a maradék oldatokhoz hozzáadtunk 6 ml duodenumnedvet és 3 ml epenedvet, illetve 1 ml NaHCO<sub>3</sub>-ot, majd még 5 órán keresztül rázattuk az előzőekben ismertetettek szerint. Az inkubációs idő letelte után újból mintát vettünk, hígítási sort készítettünk és felületi szélesztéses módszerrel meghatároztuk a kezelést követően a tenyészetek élősejtszámát.



2. ábra: In vitro emésztési modell folyamatábrája

Figure 2: Flowchart of the in vitro digestion model

### Matematikai–statisztikai elemzés

Az elősejtszám-átlagértékek közötti eltérések szignifikáns, ill. nem szignifikáns voltát *t*-próba segítségével állapítottuk meg, 95%-os valószínűségi szinten.

### EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

#### Savval és epesavval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálatok

*A. S. thermophilus* TH-4, a *L. acidophilus* LA-5 és az *E. faecium* törzsek savval és epével szembeni ellenálló-képességét először oly módon teszteltük, hogy spektrofotométerrel  $OD_{600} = 0,5$ -re beállított sejtsűrűségű szuszpenzióból 10-10  $\mu$ l-t cseppentettünk különböző sav- és epesav-tartalmú táptalajokra, majd megvizsgáltuk a tenyészetek szaporodási képességét, tehát azt, hogy 24 órás inkubációt követően képes volt-e az adott törzs szaporodni a savval, ill. epével kiegészített táptalajokon (jelenlét–hiány vizsgálat). Eredményeinket a 7. és 8. táblázatban szemléltetjük.

7. táblázat: Savval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálat eredményei\*

Table 7: Results of presence–absence tests performed in solid culture media supplemented with hydrochloric acid\*

Tejsavbaktérium-törzs	M17 vagy MRS agar** pH-értéke					
	7,0	6,0	5,5	5,0	4,0	3,0
<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4	+++	+++	++	0	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	+++	+++	+++	+++	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 4515	+++	+++	+++	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	+++	+++	+++	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134	+++	+++	+++	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> MTKI.B32	+++	+++	+++	0	0	0

\* n = 9 (3 párhuzamos × 3 ismétlés).

\*\* *S. thermophilus* TH-4: M17 agar, többi törzs: MRS agar.

0: nincs szaporodás, +: gyenge szaporodás, ++: közepes mértékű szaporodás, +++: jól látható, erőteljes szaporodás.

8. táblázat: Epesavval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálat eredményei\*

Table 8: Results of presence–absence tests performed in solid culture media supplemented with bile acids\*

Tejsavbaktérium-törzs	M17 vagy MRS agar**					
	0%	0,1%	0,2%	0,5%	1,0%	2,0%
	sertésépével kiegészítve					
<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4	+++	+	0	0	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	+++	+++	++	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 4515	+++	+++	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	+++	+++	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134	+++	+++	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> MTKI.B32	+++	+++	0	0	0	0

\* n = 9 (3 párhuzamos × 3 ismétlés).

\*\* *S. thermophilus* TH-4: M17 agar, többi törzs: MRS agar.

0: nincs szaporodás, +: gyenge szaporodás, ++: közepes mértékű szaporodás, +++: jól látható, erőteljes szaporodás.

Megállapítható, hogy a deklarált probiotikus tulajdonságokkal rendelkező *L. acidophilus* LA-5 az 5,0–7,0 pH-értékű MRS agarokon, valamint a 0,1% és 0,2% epesav-tartalmú MRS agarokon is megfelelően szaporodott, vagyis az LA-5 törzs jó sav- és epesav-tűrőnek bizonyult. A 3,0–4,0 pH-értékű, ill. 0,5–2,0% epetartalmú MRS agaron viszont már nem képzett telepeket. *Gupta et al.* (1996) kísérletei során mindösszesen két *L. acidophilus* törzs volt képes 3,0-as pH-értéken szaporodni, míg *Gomez-Gil et al.* (1998) csupán egy ilyen törzset találtak. Mivel a 6 db megvizsgált tejsavbaktérium-törzsünk közül a *L. acidophilus* LA-5 tolerálta legjobban a táptalaj kis pH-értékét, érdemes a későbbi kísérletek során pozitív kontrollként alkalmazni.

A *S. thermophilus* és az *E. faecium* törzsek savtűrés tekintetében hasonlóan teljesítettek, ugyanis az 5,5–7,0 közötti pH-értékű szilárd tápközegekben egyaránt jól szaporodtak, viszont az 5,5-esnél kisebb pH-értékű táptalajokat nem tolerálták. Ezek az eredmények alátámasztják *Du Toit et al.* (2000) tapasztalatait, miszerint az *E. faecium* 6,0–10,0 közötti pH-tartományban jól szaporodik, viszont 5,0-ös pH-érték alatt lecsökken e faj törzseinek szaporodási sebessége.

Epesav-tűrést illetően a *S. thermophilus* TH-4 gyengének mutatkozott, mert 0,1% epetartalmú táptalajon is csupán kismértékben szaporodott, ennél nagyobb epetartalom mellett pedig egyáltalán nem. A *S. thermophilus* törzsek sav- és epesav-tűrésére vonatkozóan nagyon kevés információ áll rendelkezésre a szakirodalomban (*Uriot et al.* 2017). Az *E. faecium* törzsek 0,1% epetartalmú MRS táptalajon még jól látható telepeket képeztek, ennél nagyobb epekoncentráció viszont már gátolta a szaporodásukat.

A savval és epesavval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálat viszonylag gyors módszernek tekinthető, mert a szükséges táptalajok könnyen elkészíthetők, a felületre történő cseppentés gyorsan kivitelezhető, így az eredmények rövid időn (48-72 óra) belül rendelkezésre állnak.

### **Folyadék kultúrában végzett sav-, illetve epesav-kezelés és azt követő élősejtszám-meghatározás**

A tejsavbaktérium-törzseket négyféle kezelésnek vetettük alá. A kontroll kezelések (desztillált víz és savmentes M17-, MRS-, ill. CASO-leves) nem tartalmazták a destruktív ágenseket, míg a kezeléseket 0,7%-os epekoncentrációjú és 3,0-as pH-értékű táplevesekben végeztük. A tenyészetek optikai denzitását 600 nm-en 0,5-re állítottuk be.

A tenyészetek élősejtszámát 2 órás savas és epés kezelést követően vizsgáltuk. Az eredményeket a 9. táblázat mutatja.

9. táblázat: Folyadékkultúrában végzett sav-, illetve epesav-kezelés és az azt követő élősejtszám-meghatározás eredményei\*

Table 9: Viability of bacterial strains upon treatment with distilled water (control), hydrochloric acid, or bile acids in liquid culture media\*

Tejsavbaktérium-törzs	Kezelés			
	sav nélkül (kontroll)	savval (pH = 3,0)	epesav nélkül (kontroll)	epesavval (0,7%)
	Log <sub>10</sub> CFU/ml átlag ± szórás			
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,85 ± 0,43 <sup>a</sup>	6,73 ± 0,91 <sup>a</sup>	7,11 ± 0,46 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>
TH-4*	(100%)	(76%)	(100%)	(0%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5**	7,75 ± 0,53 <sup>a</sup>	7,76 ± 0,54 <sup>a</sup>	7,60 ± 0,75 <sup>a</sup>	6,39 ± 0,18 <sup>b</sup>
	(100%)	(102%)	(100%)	(6,13%)
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 4515***	9,65 ± 0,46 <sup>a</sup>	5,23 ± 0,54 <sup>b</sup>	9,26 ± 0,19 <sup>a</sup>	7,55 ± 0,40 <sup>b</sup>
	(100%)	(0,004%)	(100%)	(1,95%)
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415***	9,67 ± 0,30 <sup>a</sup>	5,29 ± 0,29 <sup>b</sup>	9,07 ± 0,15 <sup>a</sup>	7,25 ± 0,12 <sup>b</sup>
	(100%)	(0,004%)	(100%)	(1,52%)
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134***	9,80 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,59 ± 0,43 <sup>b</sup>	9,25 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,74 ± 0,34 <sup>b</sup>
	(100%)	(0,001%)	(100%)	(3,12%)
<i>Enterococcus faecium</i> MTKI.B32***	9,48 ± 0,54 <sup>a</sup>	6,64 ± 0,97 <sup>b</sup>	9,13 ± 0,26 <sup>a</sup>	7,59 ± 0,78 <sup>b</sup>
	(100%)	(0,14%)	(100%)	(2,88%)

\* n = 9 (3 párhuzamos × 3 ismétlés).

<sup>a,b</sup> Az azonos kezeléstípuson (sav vagy epesav) belül, ugyanabban a sorban szereplő eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ( $P < 0,05$ ).

A *L. acidophilus* LA-5 kiváló sav- és jó epesav-tűrőnek bizonyult. Látható, hogy a 3,0-as pH-értékű közegben, kétórás kezelés után az élősejtek száma nem változott, míg az epesavas kezelés több mint egy nagyságrenddel csökkentette a *L. acidophilus* vizsgált törzsének életképességét. A *S. thermophilus* TH-4 a 0,7% epesav-tartalmú közegben történő kétórás inkubálást követően nem képzett telepeket, a savas kezelés viszont csak kismértékben csökkentette a szaporodni képes sejtek koncentrációját. A 4 db *E. faecium* törzs nagyon hasonlóan teljesített. A savkezelés utáni élősejtszám a

savnélküli kezeléshez képest átlagosan mintegy négy nagyságrendet csökkent, a 0,7% epetartalmú közegben pedig kb. két nagyságrendnyi pusztulást észleltünk.

*Park et al.* (2006) négy *L. acidophilus* törzset vizsgáltak 2,0 és 7,0 közötti pH-értékű agarokon. A patkányból, csirkéből és sertésből izolált törzsek 4 óra elteltével nem, vagy csak alig pusztultak a 3,0–7,0-es pH-értékű tápközegekben; a humán eredetű törzs viszont 4 nagyságrendnyi sejtszámcsökkenést mutatott 3,0 és 5,0 közötti pH-értéken. Ennek ellenére, 2,0-es pH-n 90 perc elteltével mind a négy törzs képes volt szaporodni ( $0,5\text{--}5,5 \times 10^4$  CFU/ml).

*Ortakci és Sert* (2012) mikrokapszulázott és kapszulázás nélküli *L. acidophilus* ATCC 4356 túlélését vizsgálták mesterségesen összeállított gasztrikus emésztőfolyadékokban. A gyomorfázist szimuláló gasztrikus nedv 0,08 M HCl-t (pH 1,5) és 0,2% NaCl-ot tartalmazott. A kapszulázás nélküli törzs a kétórás savas kezelést nem élte túl, azaz több mint 7 nagyságrendnyi élősejtszám-csökkenést tapasztaltak a szerzők. A gasztrikus epefolyadékban (1,2% epesavas sóval kiegészített MRS leves) 6 óráig kezelt törzsnek se a kapszulázott, se a kapszulázatlan formája nem mutatott szignifikáns élősejtszám-csökkenést.

*Hafsa et al.* (2015) azt tapasztalták, hogy az általuk megvizsgált *E. faecium* törzs akár 8 órán keresztül is túlél 2,5-es pH-értékű közegben, valamint képes 24 órát átvészelni 0,2% epesavas sók jelenlétében. A savas és a sav nélküli kezelések során hozzávetőleg felére csökkent az *E. faecium* élősejtszáma, míg az epesavas és epe nélküli kezelések kb. két nagyságrendnyi pusztulást okoztak.

A folyadékkultúrában végzett sav- és epesav-kezelés meglehetősen hosszadalmas folyamat, mely komoly előkészületeket igényel. A telepszámlálás is időigényes, ugyanis sok agarlemezt kell értékelni, így nagy az élőmunka-szükséglete. Különbség, hogy a törzsek itt csak rövid ideig érintkeznek a szelektív ágenssel, majd a kezelés után számukra kedvező közegbe (agarlemez felületére) kerülnek.

### ***In vitro* emésztési modell**

Az *in vitro* emésztési modell beállításához a *Yeo et al.* (2016), valamint a *Versantvoort et al.* (2005) által leírt emésztési protokollt vettük alapul. Célunk az volt, hogy laboratóriumi körülmények között próbáljuk szimulálni a sertés emésztését, létrehozva egy olyan szelektáló módszert, amely megalapozhat egy esetleges állatkísérletet.

Megvizsgáltuk, hogy a tejsavbaktérium-törzsek  $OD_{600} = 0,5$ -re beállított sűrűségű sejtszuszpenziója a mesterségesen elkészített emésztőnedvekkel való kezeléseket után milyen mértékű szaporodóképességgel rendelkeznek, azaz, hogy a szelektív táptalajra történő leoltást és 48 órás inkubációt követően képes-e az adott törzs telepeket képezni. Eredményeinket a 10. táblázat szemlélteti.

10. táblázat: In vitro emésztési kísérlet eredményei\*

Table 10: Results of in vitro digestion trials\*

Tejsavbaktérium-törzs	Kezelés fázisa		
	Kezdeti	Gyomor	Vékonybél
	Log <sub>10</sub> CFU/ml átlag ± szórás		
<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4	8,28 ± 0,05 <sup>a</sup> (100%)	4,04 ± 0,01 <sup>b</sup> (0,006%)	4,10 ± 0,06 <sup>b</sup> (0,006%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	8,63 ± 0,06 <sup>a</sup> (100%)	0,00 <sup>b</sup> (0%)	0,00 <sup>b</sup> (0%)
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 4515	9,22 ± 0,04 <sup>a</sup> (100%)	4,19 ± 0,10 <sup>b</sup> (0,001%)	4,13 ± 0,02 <sup>b</sup> (0,001%)
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	9,25 ± 0,04 <sup>a</sup> (100%)	4,13 ± 0,02 <sup>b</sup> (0,001%)	4,17 ± 0,06 <sup>b</sup> (0,001%)
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134	9,20 ± 0,05 <sup>a</sup> (100%)	4,23 ± 0,01 <sup>b</sup> (0,001%)	4,16 ± 0,03 <sup>c</sup> (0,001%)
<i>Enterococcus faecium</i> MTKI.B32	9,20 ± 0,04 <sup>a</sup> (100%)	4,06 ± 0,08 <sup>b</sup> (0,001%)	4,16 ± 0,09 <sup>b</sup> (0,001%)

\* n = 3.

<sup>a-c</sup> Az azonos sorban szereplő eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ( $P < 0,05$ ).

Látható, hogy az *in vitro* emésztés túl erős szűrési rendszernek bizonyult, ugyanis a 7 órás gasztrikus kezelés végén a tejsavbaktérium-törzsek szaporodóképes sejtjeinek koncentrációja legalább 4–5 nagyságrenddel kisebbnek mutatkozott a kiindulási állapothoz képest. A későbbiekben finomítani lehet a rendszert úgy, hogy a kezelést követő mintavétel után, leoltás előtt semlegesítjük a közeget, vagy centrifugálással eltávolítjuk az emésztőnedveket a mintákból.

A miénkhez hasonló megállapításra jutottak *Kabluchko et al.* (2017) is, akik kapszulázott probiotikus készítményekben található törzsek túlélési képességét



vizsgálták, *in vitro* körülmények között szimulálva a gyomorban és a vékonybélben uralkodó viszonyokat. Azt tapasztalták, hogy míg a kezdeti élősejtszámok megfelelően nagyok voltak a termék többségében, addig a gasztrikus emésztést követően a készítmények felében nem volt kimutatható mennyiségű életképes probiotikus sejt.

Az *in vitro* emésztés nagyon hosszú (legalább 120 órás) folyamat és rengeteg előkészületet igényel. További nehezítő körülmény, hogy mindent frissen kell elkészíteni. Hosszúak az inkubációs idők, nagyszámú agarlemezre kell leoltani. Az eredmények értékelése szintén meglehetősen hosszadalmas.

### Eredmények összevetése

Ha összevetjük a savval és epesavval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálatot (7. és 8. táblázat) a folyadékkultúrában végrehajtott sav- és epesav-kezeléssel (9. táblázat), megállapíthatjuk, hogy az eredmények hasonlóak. A cseppentéses módszernél kapott eredményeket jellemzően visszakaptuk a folyadékkultúrában végzett kísérletnél, így a cseppentéses módszer jól használható a vizsgálni kívánt törzsek számának leszűkítésére.

A *S. thermophilus* TH-4 a folyadékkultúrában (9. táblázat) végzett kísérletben egyáltalán nem tolerálta az epés közeget, és ez a tény jól látszott a cseppentéses kísérletben is (8. táblázat); a savkezelés során (9. táblázat) viszont jobban szerepelt annál, mint ami a cseppentés vizsgálat eredményeiből következett volna (7. táblázat). A *L. acidophilus* LA-5 a folyadékkultúrában végzett kezeléseknél is megmutatta jó sav- és epesavtűrő képességét. Az *E. faecium* törzseinek savtűrése hasonló volt, mint a *S. thermophilus* TH-4-é (7. táblázat), de a folyadékkultúrában végzett savkezelés esetükben mégsem hozott olyan jó eredményeket (9. táblázat). Az epesavas kezelést viszont nagyobb mértékben tolerálták az enterokokkusok (9. táblázat), ami nem meglepő, hiszen a cseppentéses kísérletben is jobban szerepeltek (8. táblázat).

A cseppentéses és a folyadékkultúrás módszerrel kapott eredményeket az *in vitro* emésztés eredményeivel összevetve ellentmondásokba ütközünk, ugyanis a cseppentéssel, ill. a folyadékkultúrában végzett kísérletek alapján jó sav- és epesavtűrőnek vélt törzs (*L. acidophilus* LA-5) kifejezetten rosszul szerepelt az *in vitro* emésztésben. Az első két eljárással végzett sav- és epesavkezelés tehát nem ad megfelelő

---

útmutatást arra vonatkozóan, hogy mely törzseket lenne tanácsos megvizsgálni *in vitro* emésztési modellel.

## **KÖVETKEZTETÉSEK**

Érdemes lenne kombinálni az *in vitro* emésztéses módszert a cseppentéses eljárással, továbbá az egyes fázisokból vett mintákat nem széleszteni, hanem cseppenteni kellene a szelektív táptalajra. Amennyiben egy törzs gyomorsav és epesav destruktív hatásával szembeni ellenállóságát kívánjuk vizsgálni, egyértelműen az *in vitro* emésztés eredményeire támaszkodhatunk leginkább, hiszen ez szimulálja legjobban az emésztés folyamatát. Ezért is fontos a módszer további finomítása, mert a másik két eljárás inkább csak előszelektálást tesz lehetővé, jelezvén, hogy mely törzseket érdemes a hosszadalmas *in vitro* emésztési protokollnak alávetni. A módszer továbbfejlesztésével eredményeinket összevethetnénk állatkísérletek meglévő eredményeivel. Akár az is kiderülhet, hogy a gyomorsav- és epesavtűrés, mint másodlagos probiotikus tulajdonság nincs összhangban az elsődleges, értékmérő probiotikus tulajdonságokkal.

## DEVELOPING BASIC ELEMENTS OF AN EXPERIMENTAL SYSTEM FOR SELECTION OF PROBIOTIC BACTERIAL STRAINS

JUDIT SÜLE<sup>1</sup> - LÁSZLÓ VARGA<sup>2,3</sup> - KAROLINA VARGA<sup>2</sup> - ZOLTÁN HATVAN<sup>2</sup>  
- GÁBOR SZAFNER<sup>1</sup> - HENRIETTA BUZÁS<sup>13</sup> - ZOLTÁN KERÉNYI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Hungarian Dairy Research Institute Ltd., Mosonmagyaróvár

<sup>2</sup> Széchenyi István University, Albert Casimir Faculty at Mosonmagyaróvár,  
Mosonmagyaróvár

<sup>3</sup> Széchenyi István University, Wittmann Antal Multidisciplinary Doctoral School in  
Plant, Animal and Food Sciences, Mosonmagyaróvár

<sup>4</sup> Carlsbad Research Organization Ltd., Mosonmagyaróvár

### ABSTRACT

**Background:** A multitude of potentially probiotic microbial strains are isolated each year from various sources. For any live microorganism to qualify as a probiotic, it must scientifically be demonstrated that, when administered in adequate amounts, it confers a health benefit on the host. However, animal and human studies are rather expensive and complicated and, therefore, implementing a preselection system consisting of simple and cost-effective *in vitro* tests can be helpful in reducing the number of isolates that should be involved in subsequent *in vivo* trials.

**Objectives:** The primary purpose of this research was to develop and evaluate *in vitro* methods capable of rapidly and efficiently assessing the resistance of bacterial strains to destruction by gastric and bile acids.

**Materials and Methods:** Three *in vitro* protocols were tested as follows. (1) Solid culture media supplemented with either hydrochloric acid or bile acids at various levels were used to grow *Streptococcus thermophilus* TH-4, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, and four strains of *Enterococcus faecium* isolated from commercial animal probiotics. (2) Viability of the same bacterial strains was also determined upon treatment with hydrochloric acid or bile acids in liquid culture media. (3) Finally, the resistance of lactic acid bacteria strains to artificially prepared digestive fluids was tested in an *in vitro* digestion model.

---

**Results and Discussion:** Overall, similar results were provided by protocols 1 and 2. However, the bacterial strain showing the best results in these two tests was shown to perform poorly in the *in vitro* digestion model. It was concluded that, in assessing the resistance of specific isolates to gastric and bile acids, the *in vitro* digestion model should be used because it best mimics the processes of digestion. Nevertheless, the model needs to be further improved and it may be combined with protocols 1 and 2, which are suitable for the rapid preselection of strains.

**Keywords:** probiotics, acid tolerance, bile acid tolerance, *in vitro* tests

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönik a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból finanszírozott RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt támogatását.

A szerzők köszönik az EFOP-3.6.1-16-2016-00024 azonosítószámú, “Intelligens szakosodást szolgáló fejlesztések az Állatorvostudományi Egyetem és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Karának együttműködésében” című projekt anyagi támogatását.

## IRODALOM

Anadón, A. - Martínez-Larrañaga, M. R. - Martínez, M. A. (2006): Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 45, 91–95.

Antal, O. - Némethné Szerdahelyi, E. - Takács, K. (2020): *In vitro* humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 66, (4) 3140–3157.

Chiba, L. I. (ed.) (2014): *Animal Nutrition Handbook*. Auburn University, Auburn, AL, USA.

- Du Toit, M. - Franz, C. M. A. P. - Dicks, L. M. T. - Holzapfel, W. H.* (2000): Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 88, (3) 482–494.
- Essősy, M. - Fodor, I. - Ihnáth, Z. - Karancsi, Z. - Kovács, D. - Szalai, K. V. - Szentmiklósi, D. - Jerzsele, Á.* (2020): Az antibiotikum-mentes brojler-házityúk-hizlalás lehetőségei, különös tekintettel a pre- és probiotikumok használatára I. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 142, (7) 397–407.
- European Parliament, Council of the European Union* (2003): Regulation (EC) no. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*. L268: 29–43.
- Fijan, S. - Frauwallner, A. - Varga, L. - Langerholc, T. - Rogelj, I. - Lorber, M. - Lewis, P. - Povalej-Bržan, P.* (2019): Health professionals' knowledge of probiotics: an international survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16, (17) 3128.
- Gomez-Gil, B. - Roque, A. - Turnbull, J. F. - Inglis, V.* (1998): A review on the use of microorganisms as probiotics. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 40, (3-4) 166–172.
- Gupta, P. K. - Mital, B. K. - Garg, S. K.* (1996): Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. *International Journal of Food Microbiology*. 29, (1) 105–109.
- Hafsa, S. H. A. - Mendonca, A. - Brehm-Stecher, B. - Hassan, A. A. - Ibrahim, S. A.* (2015): Probiotic potential and antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* isolated from chicken caecal and fecal samples. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 9, (4) 378–382.
- Hill, C. - Guarner, F. - Reid, G. - Gibson, G. R. - Merenstein, D. J. - Pot, B. - Morelli, L. - Canani, R. B. - Flint, H. J. - Salminen, S. - Calder, P. C. - Sanders, M. E.* (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology*. 11, 506–514.
- Kabluchko, T. V. - Bomko, T. V. - Nosalskaya, T. N. - Martynov, A. V. - Osolodchenko, T. P.* (2017): Survival of microorganisms from modern probiotics in model conditions of the intestine. *Annals of Mechnikov Institute*. 13, (1) 28–33.

Ortakci, F. - Sert, S. (2012): Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of Dairy Science*. 95, (12) 6918–6925.

Papadimitriou, K. - Zoumpopoulou, G. - Foligné, B. - Alexandraki, V. - Kazou, M. - Pot, B. - Tsakalidou, E. (2015): Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*. 6:58.

Park, S. C. - Hwang, M. H. - Kim, Y. H. - Kim, J. C. - Song, J. C. - Lee, K. W. - Jeong, K. S. - Rhee, M. H. - Kim, K. S. - Kim, T. W. (2006): Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 35–37.

Szakály, S. (szerk.) (2004): Probiotikumok és humánegészség. Vissza a természethez! Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, Mosonmagyaróvár, 1-52.

Uriot, O. - Denis, S. - Junjua, M. - Roussel, Y. - Dary-Mourot, A. - Blanquet-Diot, S. (2017): *Streptococcus thermophilus*: from yogurt starter to a new promising probiotic candidate? *Journal of Functional Foods*. 37, 74–89.

Versantvoort, C. H. M. - Oomen, A. G. - Van de Kamp, E. - Rempelberg, C. J. M. - Sips, A. J. A. M. (2005): Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*. 43, (1) 31–40.

Williams, C. F. - Walton, G. E. - Jiang, L. - Plummer, S. - Garaiova, I. - Gibson, G. R. (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual Review of Food Science and Technology*. 6, (1) 329–350.

Yeo, S. - Lee, S. - Park, H. - Shin, H. - Holzapfel, W. - Huh, C. S. (2016): Development of putative probiotics as feed additives: validation in a porcine-specific gastrointestinal tract model. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100, (23) 10043–10054.

*A szerző levélcíme – Address of the corresponding author:*

Süle Judit

Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.

9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony utca 24.

E-mail cím: [jsule@mtki.hu](mailto:jsule@mtki.hu)