

A probiotikus kefir hatása a széklet mikroflórára

Effect of the probiotic kefir on the fecal microflora

FIGLER¹, M., MÓZSIK², GY., SCHAFFER³, B., ZSINKÓ², M., SZILI³, B., SZAKÁLY³, S., RAB¹, R.

¹PTE EFK Humán Táplálkozástudományi és Diéteitikai Intézet Pécs

Pécs University, Institute of Human Nutrition and Dietetics

H-7624 Pécs, Ifjúság útja 13. e-mail: maria.figler@aok.pte.hu, tel: 36-72-536-167, fax: 36-72-513-685,

²PTE ÁOK I. sz Belgyógyászati Klinika Pécs

PTE First Department of Medicine

H-7624 Pécs, Ifjúság útja 13., e-mail: mozsi@clinics.pote.hu, tel: 36-72-536-494, fax: 36-72-536-494,

³Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet

Hungarian Dairy Research Institute

H-9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 24., e-mail: mtki@mtki.hu, tel: 36-96-215-711, fax: 36-96-215-789

Aim: To investigate the effect of a four-week-long consumption of a special Hungarian probiotic agent (Biofir®) on the faecal microflora in human healthy subjects. Methods: The effect of a special Hungarian probiotic kefir (Biofir®), with 106/cm³ initial germ number, was studied in 4 weeks, prospective and randomized study in 120 healthy volunteers (71 females, 49 males) on the faecal microflora. The traditional Russian type kefir was applied as control. The various germ groups and pH values were determined on 2nd, 4th and 6th weeks. Results: the number of all microbes increased during 4 weeks' probiotic treatment. The increase in number was 4.3 fold in the control group, while its value was 6.8 fold in the group which consumed Biofir. The probiotic kefir caused the multiplication of the probiotic flora, meanwhile the undesired bacteria multiplied in the control group. No significant change was found in the pH values of the faeces in both groups. Conclusion: The Hungarian probiotic kefir (Biofir®) is capable of promoting the multiplication of the probiotic bacterial flora in the large bowel.

1. Bevezetés – Introduction

Az emberi bélflórát 400-500 fajba sorolható, 10¹⁴ számú baktérium alkotja, amely tízszer több, mint szervezetünk összes sejtje. A bélflóra néhány baktériuma potenciálisan káros lehet, mint a Clostridiumok, Proteus és Pseudomonas aeruginosa, míg más baktériumok, pl. a Bifidobacteriumok és a Lactobacillusok, az úgynevezett probiotikus törzsek, kedvezőek a szervezet számára (1.2.). A vastagbél mikroflórája fontos szereppel bír a gazdaszervezet életében. A flóra összetétele az életünk során gyakran megváltozhat, mégis csaknem állandónak mondható. A vastagbélben élő a saját ökoszisztéma által meghatározott egyensúlyi állapotban élő apatogén, patogén és potenciálisan patogén mikroorganizmusok nemcsak lokális, de az egész szervezetet érintő metabolikus és immunológiai folyamatokban részt vesznek (3.4.).

Egyes törzsek olyan metabolitokat termelnek, amelyek antibakteriális hatásúak, pl. rövid szénláncú zsírsavakat, bakteriocinek. A mikroflóra és a nyálkahártya sejtek közötti kapcsolat eredményeképpen megváltozhat bizonyos mucosalis gének expressziója, megnőhet a citokin felszabadulás, változhat a nyálkahártya proliferációja és jelentős hatással van a bél asszociált lymphoid szövetre, amely a szervezet legnagyobb immunszerve, s amely tartalmazza az ellenanyag-termelő sejtek 80 százalékát. (5.9.). Egyes baktérium törzsek képesek javítani a nyálkahártya barrier funkcióját, fokozzák a B-sejt-differenciálódást, valamint az IgA-sekreciót (4.6.).

Az egyre szaporodó adatok birtokában felmerült az igény a táplálékok probiotikummal, prebiotikummal és a kettő együttesével, szinbiotikummal való dúsítására. A probiotikumok a bélcsatornában élő apatogén, a szervezet szá-

mára jótékony hatású, élő baktériumok, amelyek szerepet töltenek be az egészség megőrzésében (10.11.). A prebiotikumok elsősorban a növényi táplálékaink emészthetetlen alkotórészei: nagyrészt oligoszacharidok, amelyek elősegítik a probiotikus baktériumtörzsek szaporodását, növekedését és hatékonyságát a vastagbélben.

Napjainkban sokféle probiotikus baktérium vált ismertté, de a gyógyításban való felhasználásukat korlátozottá teszi, hogy a hatékony probiotikumnak változatlan formában kell áthaladnia a gyomor savas pH-ján, ellenállni az epe és hasnyál emésztésének, majd tapadnia kell valamely bélfali sejt felszínéhez. A megtapadt probiotikum élettartama rövid, néhány naptól, néhány hétig tart, általában csak a rendszeres bevétel követő rövid időtartamig. A kolonizálódó probiotikumok vetélkednek a többi mikroorganizmussal a tápanyagokért és a megfelelő kötődési helyekért. Azok a probiotikumok, amelyek akár átmenetileg is képesek kolonizálódni, fejtik csak ki a megfelelő immunológiai hatást (1.7.8.). A leghatásosabb és legismertebb probiotikum törzsek laboratóriumi és klinikai hatékonyságát már számos vizsgálatban igazolták világszerte. Elsősorban a savanyú tejtermékekből és a bélrendszerből nyert probiotikumok kerülnek felhasználásra. Közülük a legtöbbet vizsgált a Lactobacillus törzsek különböző fajtái, a Streptococcus thermophilus, a Bifidobaktériumok, a Saccharomyces boulardii, de bizonyos feltételek között a bél mikroflóra más törzsei, így az E.coli is alkalmazható probiotikumként (13.14.). Hogy az egyes probiotikus törzsek alkalmasak lehessenek az egészséget őrző és javító ún. funkcionális élelmiszerek előállítására, számos feltételnek kell megfelelniük (15.16.).

Salminen (10.) 1995-ben az alábbi technikai követelményeket fogalmazta meg a hatékony probiotikus baktériumokkal szemben (10.17.18.):

- az életképesség megtartása
- a fermentáció utáni jó íz és aroma
- enyhe savasság a tárolás során
- a colonizációs képesség megőrzése az élelmiszer-technológiai eljárások és a tárolás során
- a jó tárolási stabilitás kialakítása
- stabilitás a fagyasztva szárítás vagy más szárítási folyamatok során
- a törzs pontos és biztos meghatározása
- dózis-függő hatások

Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy elemezzük a hagyományos módon előállított ún. orosz típusú- és a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet által kifejlesztett (exopoli-szacharidot termelő) termophil törzsekből álló probiotikus tejsavbaktérium kultúrával készült kefir, a „Biofir®” 4 hetes fogyasztásának hatását a széklet mikroflórára.

2. Anyag és módszer – Material and method

A vizsgálatokat etikai bizottsági engedélyezés után 120 egészséges önkéntes egyén bevonásával kezdtük meg, köztük 71 volt a nő, 49 a férfi, életkoruk 18-59 év között volt. A vizsgálatba beválasztás alapkritériuma volt, hogy az egyének a vizsgálati periódus előtt 2 hónappal semmiféle antibiotikumot ne szedjenek.

A résztvevőket random-szerűen 2 csoportba osztottuk. Hatvanan közülük 4 hétig probiotikus kefir, hatvan fő hagyományos orosz típusú kefir fogyasztott.

A kefir összetétele (1. táblázat):

Kefir: Kontroll készítmény.

Zsírtartalom: 3,5%. Hagományos orosz-típusú készítmény, fagyasztott kefir kultúra koncentrátum felhasználásával, habarással készítve.

Kezdő sejt szám $10^6/\text{cm}^3$.

Biofir®: Probiotikus új kísérleti kefir.

Zsírtartalom 3,5% Aludttej kefir kultúra és Symbiolact-1 kultúra habarással készített keveréke. Keverési arány 1: 1.

Kezdő sejt szám $10^6/\text{cm}^3$.

1. táblázat		Table 1	
A kefir és a Biofir® eltérő Lactobacillus, Streptococcus valamint élesztő tartalma			
The content of the Lactobacillus, Streptococcus and yeast in the kefir and Biofir®			
Kefir - Kontroll készítmény Kefir – controll product		Biofir®	
Lactobacillus	0,15	Lactobacillus	1,48
Streptococcus	165,0	Streptococcus	227,50
Élesztő (yeast)	0,4	Élesztő(yeast)	0,18

A vizsgálat előtt a résztvevőktől vért, vizeletet és széklet mintát vettünk steril széklet tartályba rutin laboratóriumi vizsgálatok, valamint a széklet mikroflóra vizsgálata céljából. A vizsgálatot 6 héten keresztül folytattuk, ezalatt standard diétát írtunk elő, 2000-2200 kcal energia, 90-95 g fehérje, 65-70 g zsír, 260-300 g szénhidrát tartalommal, amely mentes volt savanyú tejtermékektől és más probiotikus élelmiszerektől. A diéta betartását dietetikus rendszeresen ellenőrizte. Ezt követően a résztvevők kontroll csoportja 4 héten keresztül napi 0,5 l orosz típusú kefir, a vizsgálati személyek 0,5 l probiotikus kefir fogyasztottak.

A széklet mintavételt a 2. és 4., majd a 6. héten megismételtük. A vér laboratóriumi vizsgálatát szűrő jelleggel a 4. héten végeztük el újra. A steril tartályba vett székletmintákat 4°C alatt tároltuk, 4-6 órán belül a Magyar Tejgazdasági Kutató Intézet pécsi részlegének mikrobiológiai laboratóriumába kerültek, ahol a különböző csírcsoportok kimutatását nemzetközileg elfogadott táptalajokon végezték el (2. táblázat). A mikroflóra meghatározása mellett vizsgálták a széklet pH-ját is.

Statisztikai analízis: A vizsgálati adatok értékelésénél az egyes eredmények átlagát, százalékos változását vizsgáltuk. A különbségek meghatározására, - tekintettel az önkontroll vizsgálatra – egymintás T próbát használtuk, a két csoport összehasonlításához kétmintás T próbát alkalmaztunk.

3. Eredmények – Results

A székletek mikroflórájának elemzése során a leglényegesebb kérdés volt, hogy a két kefir fogyasztása hogyan hatott az elsődlegesen probiotikusnak mondható Streptococcus, Lactobacillus és Bifidobaktérium nemzetségek tagjainak számára az összcsíraszámokon belül.

2. táblázat		Table 2	
A székletmintákból vizsgált csírcsoportok és a kimutatásukra alkalmazott táptalajok			
Germ groups and cultures used to determine them			
Kimutatott csírcsoport Detected germ groups		Alkalmazott táptalaj Used solution for bacterial cultures	
Összes csíra (each germ group)		Plate Count Skim Milk Agar	
Sztreptokokkuszok		M-17-agar Terzaghi szerint	
Laktobacillusok		MRS-agar De Man, Rogosa és Sharpe szerint	
Bifidobaktériumok		MGLP módosított Garcke Agar	
Bakterioideszek		Anaerob Blood Agar Base CDC szerint	
Kóliformok		Violet Red Bile (VRB) Agar	
Escherichia (E.) coli		Lauryl Sulfate Broth Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose (EMB) Agar	
Enterobaktériumok - laktóz-pozitív (lactose positive) - laktóz-negatív (lactose negative)		Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar Mossel szerint Hektoen Enteric Agar	
Enterokokkuszok		Citrate Azide Tween Carbonate (CATC) Agar Base	
Anaerob spórások (anaerobe spored)		Reinforced Clostridial Agar Anaerobic Agar Brewer szerint	
Élesztők és penészek (yeasts and blights)		Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar	

3. táblázat

Table 3

**A teszt-tejtermékek fogyasztásának hatása a résztvevők székletmintáinak lényegi mikroflórájára
a 4 hetes klinikai vizsgálat során**

**Effect of the consumption of the test dairy products on the essential microflora
of the participants' faeces sample in the course of the 4-week clinical investigation**

Fogyasztott teszt-tejtermék <i>Consumed dairy product</i>	Személyek száma, fő <i>Number of persons</i>	Csírcsoport <i>Germ group</i>	Egység <i>Unit</i>	Székletminták csíraszám-értékei <i>The rate of the germ group numbers in the defecation samples</i>		
				0	2	4
				hét után (<i>after... weeks</i>)		
Hagyományos orosz-típusú kefir (Kontroll) <i>Conventional Russian-like kefir</i>	60	Összcsíraszám <i>Each germ group (Aerob+anaerob)</i>	10 ⁶ /g	10585	7862	45125
			Index	1,0	0,7	4,3
		- Streptococcus	10 ⁶ /g	220	374	285
			Index	1,0	1,7	1,3
		- Lactobacillus	10 ⁶ /g	226	37	164
			Index	1,0	0,2	0,7
		- Bifidobacterium	10 ⁶ /g	500	197	759
			Index	1,0	0,4	1,5
		Probiotikus együttesen <i>Probiotic altogether</i>	10 ⁶ /g	946	608	1208
			Index	1,0	0,6	1,3
			Arány, %	8,9	7,7	2,7
Probiotikus Biofir® (Kísérleti) <i>Probiotic Biofir®- sample</i>	60	Összcsíraszám <i>Each germ group (Aerob+anaerob)</i>	10 ⁶ /g	4360	38278	29785
			Index	1,0	8,8	6,8
		- Streptococcus	10 ⁶ /g	134	593	930
			Index	1,0	4,4	6,9
		- Lactobacillus	10 ⁶ /g	78	81	96
			Index	1,0	1,0	1,2
		- Bifidobacterium	10 ⁶ /g	342	3723	20414
			Index	1,0	10,9	59,7
		Probiotikus együttesen <i>Probiotic altogether</i>	10 ⁶ /g	554	4397	21440
			Index	1,0	7,9	38,7
			Arány, %	12,7	11,5	72,0

Eredményeink (3. táblázat) azt mutatták, hogy mind a hagyományos orosz típusú kefir fogyasztó kontroll, mind a probiotikus Biofir®-t fogyasztó vizsgálati csoport székletében a 4 hetes rendszeres fogyasztás hatására megnövekedett az összes mikrobák száma. A kontroll csoportban 4,3-szoros, a Biofir®-t fogyasztó csoportban 6,8-szoros mértékű növekedés volt látható. Igen lényeges különbség azonban, hogy míg a probiotikus kefir fogyasztóknál a növekedést a probiotikus baktérium flóra megszorodása okozta, addig a kontroll csoportnál a nemkívánatos baktériumok szaporodtak el. Ez utóbbi csoportban a 4. hét végén a probiotikus mikrobák aránya 8,9%-ról 2,7%-ra csökkent, míg a vizsgálati csoportban 12,7%-ról 72%-ra növekedett. Az összes probiotikus csírán belül a Biofir® hatására legnagyobb mértékben (59,7-szer) a Bifidobaktérium, kevésbé a Streptococcus nemzetség alkotói nőttek (6,8-szorosra) míg a Lactobacillusok száma (indexe) lényegében nem változott. Nem tapasztaltunk szignifikáns változást a széklet pH-ban egyik csoportban sem, az átlagosan 6,56-6,74 között volt.

A 4 hetes kefir fogyasztási periódus után a résztvevők 2 hétig még az előírt diétát fogyasztották, de semmiféle probiotikus ételmiszert nem vettek magukhoz. A 6. héten megismételtük a széklet mikroflóra vizsgálatát, eredményeink azt mutatták, hogy mind az összesíraszám, mind a probiotikus csírák száma mindkét csoportban visszatért a kiindulási értékekre.

4. Megbeszélés – Discussion

Az a tény, hogy a különböző orvosi kezelések súlyos károsodást idézhetnek elő az emberi szervezet probiotikus flórájában egyre inkább az érdeklődés középpontjába kerül. A kezelések – antibiotikumok, cytostatikumok, irradiatio –

mellett hasonló károsodáshoz vezet a normál flóra megfelelő tápanyagokkal való ellátásának hiánya is. Számos kontrollált vizsgálat eredményei igazolták, hogy a különböző probiotikus törzsek képesek lerövidíteni a Rota vírus kiváltotta és más gasztroenteritiszek lefolyását, krónikus gyulladós bélbetegségek esetén is beszámoltak a probiotikumok kedvező hatásáról. A hatás ezekben az esetekben a probiotikus bélflóra proteolitikus aktivitásával lehet kapcsolatos, amely révén elősegíti az enterális antigének lebontását, csökkenti a gyulladós mediátorok szekréciójának mértékét, segíti a bél mucosalis barrierjének normális működését, normalizálja az intestinales permeabilitást és fokozza a mucosalis IgA termelődését is (19.21.). Legújabban a figyelem középpontjába került a vastagbélflóra és az allergiás, valamint atópiás betegségek közötti kapcsolat is. A bél egészséges mikroflórája gátolja a specifikus IgE termelést is, amely gátolja az allergiás reakciók kialakulását (19.22.).

Ismert probiotikus hatás egyes baktériumok béta galaktózidaze termelése, amely laktóz intolerancia esetén a használatukat kívánatosá és előnyössé teszi. A fekáli enzimek aktivitásának csökkentése, a fekáli toxinok visszaszorítása az egészséges bélflóra következménye, amely jelentős tényező a vastagbélrák megelőzésében is.

Az egészséges bélflóra fenntartásában és helyreállításában fontos szerepet töltenek be a prebiotikumok, amelyek számos növényi táplálékunk alkotóelemei, oligoszacharidok, amelyek kedvező hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre azáltal, hogy szelektíven fokozzák a probiotikus baktériumok szaporodását és aktivitását a vastagbélben, amelyet ezek a baktériumok energia-forrásként használnak fel.

A különböző ételmiszertipari termékekben a probiotikus mikroorganizmusokat és a prebiotikumokat gyakran együtt alkalmazzák.

A jelen vizsgálatunkban használt egyik probiotikus baktériumtörzs, a *Streptococcus thermophilus* rendelkezik nyálka-termelő képességgel. A termelt nyálka egy poliszacharid, amely prebiotikumként szolgál más probiotikus törzsek számára is. Emellett növeli a vele készült élelmiszerek eltarthatóságát, meggátolja azok savanyodási folyamatát.

Vizsgálataink egyértelműen bizonyítékát adták, hogy a probiotikus kefir a Biofir® képes elősegíteni a vastagbél probiotikus flórájának elszaporodását a fogyás idején, így a kapott eredményeink alapján minden tekintetben megfelel a funkcionális élelmiszer fogalmának. Alkalmazása potenciális lehetőséget biztosíthat a hagyományos orvosi és táplálkozástérapián túl különböző akut és krónikus gyulladásos betegségek, táplálkozási allergiák megelőzésében és kezelésében egyaránt. A későbbiek során további bizonyítékokat kívánunk szolgáltatni az általunk vizsgált probiotikus törzsek különböző kórképekben kimutatható hatására.

Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatok elvégzését az OMFB 110/2000 pályázat anyagi fedezete biztosította, a nyújtott támogatásért ezúton is köszönetet mondunk.

Irodalom - Referencies

- (1) **Benno Y., He F., Hosoda M., Hashimoto H., Kojima T., Yamazaki K., Iino H., Mykkanen H., Salminen S.**: Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. *Nutr. Today* **31** (Suppl 1.) 9-11 (1996)
- (2) **Famularo G., Moretti S., Marcellini S., Simone C.D.**: Stimulation of immunity by probiotics. *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects* ed R Fuller, Chapman and Hall. 1997.
- (3) **Fuller R.**: Probiotics, their development and use. In: Old Herborn University Seminar Monograph 8, van der Waaij D. Heidt PJ. Rusch VC (Eds), Institute for Microbiology and Biochemistry, Herborn-Dill, 1995, 1-8.
- (4) **Havenaar R., Huis In't Veld JH.**: A general view. In: *The Lactic Acid Bacteria*, Wood BJB 8Ed Elsevier, London (1) 151-170 (1992)
- (5) **Majamaa H., Isolauri E.**: Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin Immunol* **99** 179-185 (1997)
- (6) **Malin M., Suomalainen H., Saxelin M., Isolauri E.**: Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Am Nutr. Med* **40** 137-145 (1996)
- (7) **Matsuzaki T., Yamazaki R., Hashimoto S., Yokokura T.**: The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice *J. Dairy Sci.* **81** 48-53 (1998)
- (8) **Metchnikoff E.**: *The Prolongation of Life*. William Heinemann, London 1907.
- (9) **Ouwehand A., Salminen S.**: The health effects of viable and non-viable cultured milk. *Int. Dairy J.* **8** 749-758 (1999)
- (10) **Salminen S, Laine M., von Wright A., Vuopio-Varkila J., Korhonen T., Mattila-Sandholm T.**: Development of selection criteria for strains to assess their potential in functional foods: A Nordic and European approach. *Biosci. Microflora* **2** 23-28 (1996)
- (11) **Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K.**: Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* **10** 107-110 (1999)
- (12) **Saxelin M., Salminen A., Isolauri E.**: Clinical efficacy of a human *Lactobacillus* strain as a probiotic in functional Foods. In: *The Consumer, the Products and the Evidence* (Sadler MJ and Saltmarsh M eds.) The Royal Soc. Chem. Cambridge 1998.
- (13) **Saxelin M.**: Colonization of the human gastrointestinal tract by probiotic bacteria *Nutr. Today* **31** (Suppl. 1) 5-8 (1996)
- (14) **Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J.M., Donnet-Hughes A.**: Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J.Dairy Sci.* **78** 491-497 (1994)
- (15) **Sütas Y., Hurme H., Isolauri E.**: Downregulation of anti CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus GG* derived enzymes. *Scand J. Immunol.* **43** 687-689 (1996)
- (16) **Yasui H., Nagaoka N., Mike A., Hayakawa K., Kiyoshima J., Owaki M.**: Augmentation of IgA production by *Bifidobacterium breve*. In: *Intestinal Flora and Immune Responses*, Mitsuoka T (ed), Japan Scientific Society Press, Tokyo, 1994, 109-122.
- (17) **Yasui H., Owaki M.**: Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J. Dairy Sci* **74** 1187-1195 (1991)
- (18) **Aattouri N., Lemonnier D.**: Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus*: role of CD4 and CD8 lymphocytes. *J. Nutr. Biochem* **8** 25-31 (1997)
- (19) **Lidbeck A., Nord C.E.**: *Lactobacillus* and the normal human anaerobic microflora. *Clin Infect Dis* **16** 181-187 (1993)
- (20) **Miettinen M., Vuopio-Varkila J., Varkila K.**: Production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 induced by lactic acid bacteria *Infect. Immun* **64** 5403-5406 (1996)