

Zurbó Zsófia¹, Csapó János^{1,2}

Érkezett: 2019. december – Elfogadva: 2020. március

Prebiotikumok előállítása a laktóz-almasav és a laktóz-citromsav reakciójával

KULCSSZAVAK: laktóz, almasav, citromsav, prebiotikum, cukor-meghatározás, enzimes bontás

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A prebiotikumok olyan emészthetetlen élelmiszer komponensek, amelyek a vastagbélbe jutva a bifidobaktériumok és a laktobacillusok számára tápanyagul szolgálnak. A diétás rostok és az oligoszacharidok tipikus prebiotikumok, ezért kísérleteink során prebiotikumokat állítottunk elő a laktóz, az almasav, valamint a citromsav megfelelő koncentrációban és megfelelő ideig, optimális hőmérsékleten végzett reakciójával. Meghatároztuk a reakció ideális paramétereit, mértük a kiindulási anyagok fogyását és a végtermék koncentrációjának növekedését, sósavas hidrolízist követően elemeztük a hidrolizált prebiotikum összescukor-tartalmát. In vitro kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy az általunk előállított végtermék ellenáll a szénhidrátbontó enzimeknek (ez egy prebiotikum esetében alapkövetelmény), hogy végül a vastagbélbe jutva tápanyagul szolgáljon az ott élő probiotikus baktériumok számára.

2. Bevezetés

A probiotikumok nemzetközi nevezéktana (probiotikum, prebiotikum és szinbiotikum) a 20. század utolsó két évtizedében alakult ki, miközben a készítmények összetevőik tekintetében is egységessé váltak.

Probiotikumoknak nevezzük mindazokat a bélbaktériumokat, amelyek jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségi állapotára. Azokat a természetes tápanyagokat, amelyek jellemzően a probiotikumok kizárólagos tápanyagai – ennél fogva elősegítik azok elszaporodását, túlsúlyba kerülését – *Prebiotikumoknak* nevezzük.

A *szinbiotikum* kifejezés a pro- és prebiotikumok együttesét jelenti. A szinbiotikus élelmiszerekben az előbb említett két előnyös tényező hatása összeadódik, hatásuk szinergistává válik. Ebből eredően például szinbiotikusak azok a tejtermékek, amelyek készítéséhez nemcsak probiotikumokat, hanem egy vagy több prebiotikumot is felhasználtak.

A prebiotikumok (korábbi nevükön bifidus-, vagy bifidogén-faktorok) 2-9 egyszerű cukorból (monosza-

charidból) felépülő oligoszacharidok. A gyomorban és a vékonybélben nem metabolizálódnak, így vízben oldódó diétás rostokként emészthetetlenül jutnak el a vastagbélbe. A diétásrost-funkció mellett igazi értékük abban rejlik, hogy a probiotikumok kizárólagos táplálékait képezik. Mivel a vastagbélben már kevés az emészthető táplálékmaradvány, ott a mikroflóra számára relatív táplálékhiány áll fenn. Az elfogyasztott prebiotikum azonban elősegíti a humánbarát probiotikumok elszaporodását [1].

A prebiotikumok természetes állapotukban számos élelmiszerben előfordulnak. Gazdag forrásai például a csicsóka- és a cikóriagyökér, de megtalálhatók a vöröshagymában, a fokhagymában, a póréhagymában, az articsókában, a zabpehelyben, a búzában, a banánban, a tejben és az érett sajtokban is. A probiotikus hatású készítmények gyártásánál jellemzően az ipari technológiával előállított tiszta készítményeket használják fel, amelyeket 40-95% hatóanyag-koncentrációjú folyékony sűrítmenyek vagy porok formájában hoznak forgalomba. A természetes ipari koncentrátumok – aszerint, hogy milyen típusú monoszacharidokból épülnek fel – lehetnek például galakto-, frukto-, malto- vagy xylo-oligoszacharidok.

¹ Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszer-tudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszerteknológiai Intézet

² Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Campus

A kép illusztráció / Picture is for illustration only

1995-ben több mint 80 ezer tonna prebiotikumot állítottak elő világszerte, de a termelés ma már 200 ezer tonna körül van. A világtermelés növekedése azt jelzi, hogy a probiotikus élelmiszerek iránti érdeklődés folyamatosan növekszik. A termelt mennyiség mintegy 40%-a galakto-oligoszacharid (például laktulóz), amelynek alapanyaga a tejcukor [2, 3, 4].

A prebiotikumok tehát nem emészthető poliszacharidok és oligoszacharidok. Eljutva a vastagbélbe gátolják a *Salmonella* és az *Escherichia coli* szaporodását, ugyanakkor elősegítik a bifido- és a tejsavbaktériumok szaporodását. A „prebiotikus” elnevezés 1995-ből származik [5]. Egy tápanyag prebiotikus hatásának több feltétele van [6], amelyek közül a legfontosabbak:

- Ellenállási képesség a gyomorsavnak és a pepszin emésztő hatásának;
- Tápanyagszolgáltatási képesség a bélrendszer hasznos mikroflórája részére, amelyek anyagcsere-termékei hozzájárulnak a probiotikumot fogyasztó ember egészségi állapotának, közérzetének javításához.

Ezeknek a kritériumoknak számos élelmiszer komponens megfelel, úgy mint az inulin, a fruktooligoszacharidok (FOS), a galaktooligoszacharidok (GOS), a laktulóz és a ploidextróz. Az izomaltol oligoszacharidokat (IMO), a xylooligoszacharidokat (XOS) és a laktitolt a potenciónális prebiotikum csoportba sorolták [7].

A prebiotikumok sokféle élelmiszerben előfordulnak. A cikória gyökere például inulin eredetű fruktooligoszacharidokat, a búzakarpa pedig arabinooligoszacharidokat (AOXS) és xilooligoszacharidokat (XOS) tartalmaz. Ezeket az anyagokat a probiotikus hatású készítmények gyártásánál széles körben alkalmazzák [8, 9, 10].

A mannitol, a maltodextrin, a raffinóz, a laktulóz és a szorbitol ugyancsak egészségvédő hatással rendelkező prebiotikumok [11, 12, 13]. A rezisztens keményítőben gazdag magokat is prebiotikumoknak tartják; ezek nem emészthetők meg, ezért nem szívódnak fel a vékonybélben, ám a vastagbélbe jutva annak mikroflórája a fermentáció során hasznosítani tudja azokat, miközben rövid szénláncú zsírsavak (SCFA [Small Chain Fatty Acid], például propionsav, vajsav, valeriansav, kapronsav) keletkeznek. Ezek a zsírsavak a vastagbélben a pH csökkentése révén visszaszorítják a rothasztó, mérgeanyagokat termelő baktériumok szaporodását [14].

A rozs β -glükánjához hasonló fermentálható diétás rostok, valamint a lenmag és a görögcséna gumi-szerű poliszacharidjai ugyancsak prebiotikumnak tekinthetők, és szintén a rövid szénláncú zsírsavak előállításának alapanyagai, ezért egészségvédő hatással rendelkeznek. Prebiotikumoknak tekinthetők az élesztősejtek sejtfalában nagyobb mennyiségben található mannátok is [15].

Napjainkban az alultápláltság, a dohányzás és az alkoholisztikus hatására jelentős a megbetegedések és a halálozások száma. Korunkra jellemző betegségek a krónikus elhízás, a gyomor- és bélrendszeri panaszok, a cukorbetegség, a szív és érrendszeri megbetegedések, a rák és a degeneratív elváltozások, amelyek száma az utóbbi időben jelentősen nőtt. Ezeknek a betegségeknek a megelőzésére vagy tüneteik mérséklésére az élelmiszerfogyasztók egyre nagyobb számban fordulnak az egészségvédő, prebiotikumokat is tartalmazó élelmiszerek felé, amelyek életminőségük jelentős javulását várják.

A fogyasztók jelentős hányada a szénhidrátszegény, magas rost- és fehérjetartalmú élelmiszereket keresi, amellyel párhuzamosan megnőtt az érdeklődés a prebiotikus élelmiszerek iránt is. Jó példának számítanak minderre a feketeribizli levélkivonat-port, laktoferrin és luteint tartalmazó élelmiszertípusok, amelyeket világszerte nagy mennyiségben állítanak elő. Ezek a készítmények szignifikánsan növelik a bifidobaktériumok és a laktobacillusok mennyiségét, és jelentősen visszaszorítják a bakteroideszek és a klostridiumok számát a vastagbélben. Ezen túlmenően csökkentik a β -glükuronidáz, és növelik a β -galaktózidáz enzimek aktivitását a vékonybélben, ilyen módon elősegítve például a laktóz emésztését a laktázhiányos egyéneknél [16].

A búzacsíra-kiegészítés hatására 20 nap után szignifikánsan csökkent a vastagbél tartalmának pH-ja, a clostridium-populáció száma, és szignifikánsan nőtt a laktobacillus-ok és a bifidobaktériumok mennyisége, miközben az ilyen típusú készítményt fogyasztók életminősége jelentősen javult [17]. Az arabgumiról (gumiarábikum) megállapították, hogy a szisztolés vérnyomásban és a diabéteszes veseelégtelenségben szenvedők esetében csökkentette a betegségekkel kapcsolatba hozható panaszokat [18]. Megállapították, hogy 8-12 héten keresztül napi 25 g gumiarábikum készítmény elfogyasztása jó hatással volt a cukorbeteg állapotrúra, és jelentősen csökkentette a szisztolés vérnyomást [19].

Munkacsoportunk korábban [2, 3, 4] elvégezte a tejsavbaktériumok által termelt exopoliszacharidok és oligoszacharidok szerkezeti és mennyiségi analizisét. Jelen dolgozatunkban azon kísérleteink eredményeiről számolunk be, amelyek során a laktóz, valamint az almasav és a citromsav reakciójának segítségével prebiotikumokat állítottunk elő. Munkánk során alapnak tekintettük a [20] valamint [21] forrásokban megtalálható szabadalmi leírást, amelyben a szénhidrátok és a dikarbonsavak közti észterkötések létrehozásával felületaktív anyagokat kívántak előállítani, illetve ezen reakciók mechanizmusát tanulmányozták. A szerzők a módszert sikerrel próbálták ki cukoralkoholok, cukrok, oligoszacharidok és poliszacharidok esetében is [20, 21].

3. Célkitűzés

A szakirodalom eredményeire, valamint saját korábbi kutatásainkra támaszkodva olyan prebiotikumok előállítását tűztük ki célul, amelynek során a laktóz és az almasav, valamint a laktóz és a citromsav között hoztunk létre olyan kötések, amelyek az ember gyomrában és bélrendszerének elülső szakaszában ellenállnak a savas közegnek és a szénhidrátbontó enzimek támadásának, eljutnak a vastagbélbe, ahol azután táplálékul szolgálnak az ott megtelepedett probiotikus mikroorganizmusoknak. Célunk volt meghatározni a reakció optimális paramétereit, a hőmérsékletet, az időt és a reagáló anyagok koncentrációját, mérni a kiindulási anyagok fogyását és a végtermék koncentrációjának növekedését, sósavas hidrolízist követően elemezni a hidrolizált prebiotikum összecukor-tartalmát. In vitro kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy az általunk előállított végtermék ellenáll a szénhidrátbontó enzimeknek, amely alapkövetelmény egy prebiotikum esetében.

4. Anyag és módszer

4.1. Felhasznált anyagok, alkalmazott analitikai módszerek

Kísérleteinket gyógyszerkönyvi minőségű laktózzal, citromsavval és almasavval végeztük. Az általunk felhasznált almasav 99,5%-os tisztaságú volt, amely kevesebb, mint 1% fűmásvavat, és kevesebb, mint 0,05% malonsavat tartalmazott. Az E296 E-számú almasav minőségi bizonyítványa a <http://bbbb.hu/spec/almasav.jpg> linkről letölthető. Az általunk felhasznált anyag megfelel az USA, az EU és a Magyar Gyógyszerkönyv minőségi követelményének, valamint az EU és a Magyar Élelmiszerkönyv 1-2-89/107 sz. előírásainak.

A kísérleteinkhez használt citromsav ugyancsak étkezési, sőt gyógyszerkönyvi minőségű citromsav-monohidrát (E330) volt, amelynek minőségi bizonyítványa a <http://www.bbbb.hu/spec/Citrom.jpg>, biztonságtechnikai adatlapja pedig a <http://www.bbbb.hu/spec/citrombizt.jpg> linkről tölthető le. CAS száma 5949-29-1, EU száma 201-069-1. A minőségi bizonyítvány szerint citromsav-monohidrát tartalma közel 100%, víztartalma maximum 8,8%, oxálsav tartalma pedig kevesebb, mint 100 mg/kg. Minden paraméterében megfelel az EU és a Magyar Élelmiszerkönyv előírásainak.

A kísérletekhez használt laktóz 99,7%-os tisztaságú, étkezési minőségű, finomra porított, szarvasmarha tejből elkülönített, porlasztva szárítással előállított D(+)-laktóz 1-hidrát volt. Minősége megfelelt a Ph.Eur 8.0 minőségi előírásnak.

4.2. Alkalmazott analitikai módszerek

A laktóz és az almasav, valamint a citromsav reakciójának nyomon követésére a laktóztartalom mérését választottuk. A probiotikumok képződési reakcióját a

laktóz mennyiségének csökkenéséből tudtuk követni. A tejcukor a redukáló diszacharidok csoportjába tartozik, ezért jelenlétében működik a Fehling-reakció. Ha azonban a laktóz szabad glikozidos hidroxil csoportja kötésbe kerül, akkor a cukormolekula a továbbiakban nem adja a redukáló cukrokra jellemző reakciót. A reakció során a cukor aldehidcsoportjának hatására a Cu^{2+} -ionokból Cu^+ -ionok keletkeznek. A Cu^+ -ionok mennyiségét meghatározva a cukor mennyisége analitikai pontossággal meghatározható. A vizsgálati eljárás során 2 g mintát mértünk be egy 100 cm^3 -es mérőlombikba, hozzáadtunk 50 cm^3 vizet, és egy órán át rázógéppel ráztattuk. A cukor meghatározását zavaró anyagok eltávolítására 20-20 cm^3 Carrez I- és II-oldatot adtunk az oldathoz. A mérőlombikot ezt követően 80%-os etanollal jelre töltöttük, összeráztuk, tartalmát szűrőpapíron leszűrtük. A szűrletből kivettünk 20 cm^3 -t, amelyből az etanol fő tömegét elpárologtattuk, a bepárlási maradékot pedig kb. 50 $^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletű desztillált vízzel egy 20 cm^3 -es mérőlombikba átmostuk, majd lehűlés után jelre töltöttük. Ezt az oldatot használtuk a későbbiekben a redukáló cukortartalom meghatározásához.

Az így előkészített oldatból 5 cm^3 -t vettünk ki egy 100 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikba, hozzáadtunk 5 cm^3 Luff-Schoorl-reagenst, pár darab horzsakövet, majd szabad láng felett rázogattuk 2 percen belül forrásba hoztuk, 10 percig forraltuk, azt követően pedig azonnal lehűtöttük. A kivált réz(II)-oxidot jodometrián, 0,1 mol/l koncentrációjú nátrium-tioszulfát oldattal megtitáltuk. A tejcukor mennyiségét a titrálószert felhasználva számítottuk ki.

4.3. Az almasav, a citromsav és a laktóz közötti reakciók tervezése

A gyógyszerári minőségű laktózhoz első lépésben 20% citromsavat, második lépésben 20% almasavat kevertünk. Áttanulmányozva a rendelkezésre álló szakirodalmat és szabadalmakat megállapítottuk, hogy a legtöbb reakciót 130-180 $^{\circ}\text{C}$ között végezték. Kísérleteinkhez ezért 170 $^{\circ}\text{C}$ reakció-hőmérsékletet választottunk. A mintákat dörzsmozsárban összekevertük, biztosítva a minták megfelelő homogenitását. Ezt követően kb. 10-10 gramm mintát különböző üvegedényekbe szétosztva 5-10-20-30-40-50-60 percig végeztük azok hőkezelését, majd lehűlés után elvégeztük a minták laktóztartalmának meghatározását.

A következő kísérletben a hőmérséklet hatását vizsgáltuk a citromsav, az almasav és a laktóz közötti reakcióra. A 20% citromsavat, 20% almasavat, valamint 80% laktózt tartalmazó mintákat első kísérletben 130 $^{\circ}\text{C}$ -on, a második kísérletben 140 $^{\circ}\text{C}$ -on, a harmadik kísérletben 150 $^{\circ}\text{C}$ -on, a negyedik kísérletben 160 $^{\circ}\text{C}$ -on, az ötödik kísérletben pedig 170 $^{\circ}\text{C}$ -on egyaránt 30 percig kezeltük. Lehűlés után egyenként elvégeztük a minták laktóztartalmának meghatározását. A visszamaradó laktóz mennyiségét a reakciótermék 100 grammjában mérhető arányban (tömegszázalék) adtuk meg.

4.4. Eredmények és értékelésük

4.4.1. A 170 °C-on végzett hőkezelés idejének hatása a laktóz és a karbonsavak közötti reakcióra

Az **1. táblázat** a 170 °C-os hőkezelés idejének hatását mutatja be a laktóz és a citromsav közötti reakcióra.

20% citromsavat adva a laktózhoz, a hőkezelést pedig 170 °C-on különböző ideig végezve megállapítottuk, hogy hőkezelés hatására a kiinduló fehér színű keverék 5 perc alatt megsárgult, 10 perc alatt megbarnult és felhólyagzott. Ezt követően pedig csak a keverék színe mélyült, látszólagos térfogata gyakorlatilag változatlan maradt.

A laktóz és az almasav közötti reakcióban 170 °C-on a hőkezelés idejének hatását a **2. táblázat** mutatja be.

20% almasavat adva a laktózhoz, a hőkezelést pedig a citromsavhoz hasonlóan különböző ideig végezve megállapítottuk, hogy a minták színe 5 perc alatt alig változott, 10 perc alatt kissé megsárgult, 20 perc alatt sárgásbarnává vált, majd folyamatosan duzzadt, az utolsó mintánál pedig a reakciókeverék színe sötétbarnává változott.

A citromsavval és az almasavval végrehajtott reakciókból visszamaradó laktóz-mennyiségeket grafikusan az **1. ábrán** mutatjuk be.

4.4.2. Az azonos ideig különböző hőmérsékleten végzett hőkezelés hatása a laktóz és a karbonsavak közötti reakcióra

A **3. táblázat** a különböző hőmérsékleten azonos időtartam alatt (30 percig) végzett hőkezelés hatását mutatja a laktóz és a citromsav, valamint a laktóz és az almasav közötti reakció esetében.

1. táblázat. A 170 °C-on végzett hőkezelés idejének hatása a laktóz és a citromsav közötti reakcióra
Table 1. Effect of heat treatment time at 170 °C on the reaction between lactose and citric acid

Minta jelzése Sample ID	Minta (reakciókeverék) Sample (reaction mixture)	Hőkezelés ideje (perc) Heat treatment time (min)	Maradék laktóz (%) Residual lactose (%)
M1	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	5	73.6
M2	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	10	63.4
M3	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	20	48.4
M4	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	30	35.4
M5	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	40	21.9
M6	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	50	12.3
M7	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	60	7.1

2. táblázat. A 170 °C-on végzett hőkezelés idejének hatása a laktóz és az almasav közötti reakcióra
Table 2. Effect of heat treatment time at 170 °C on the reaction between lactose and malic acid

Minta jelzése Sample ID	Minta Sample	Hőkezelés ideje (perc) Heat treatment time (min)	Laktóz (%) Lactose (%)
M8	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	5	70.6
M9	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	10	68.3
M10	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	20	52.1
M11	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	30	33.4
M12	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	40	25.3
M13	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	50	19.2
M14	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	60	16.4

A 130 °C-on fél óráig történő hőkezelés hatására a minták fehér színüket gyakorlatilag megtartották, 140 °C-on mind a citromsavat, mind az almasavat tartalmazó minták megsárgultak, 150 °C-on a sárgulás mindkét karbonsavnál tovább fokozódott, 160 °C-on a citromsavas és az almasavas minta is erőteljesen megbarnult, míg a 170 °C-on fél órán át végzett hőkezelésnél a citromsavas minta egy barna masszává állt össze. Az almasavas minta szintén barnára változott, a barna elszíneződés azonban a többi mintához képest világosabb maradt.

A különböző hőmérsékleteken 30 perc alatt végrehajtott reakciókban visszamaradó laktóz százalékos arányát a **2. ábra** szemlélteti.

4.5. Következtetések

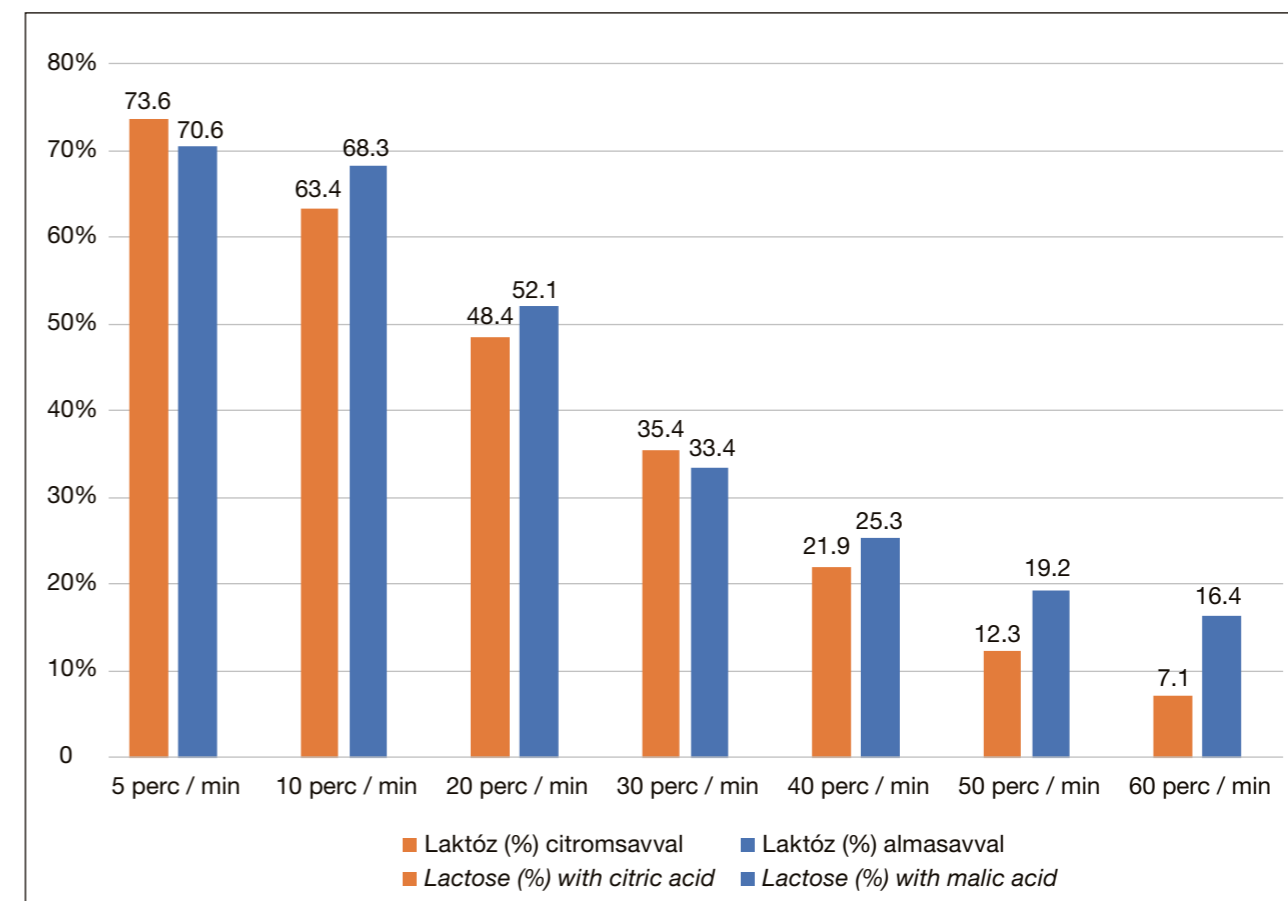
4.5.1. Idő- és hőmérsékletfüggés

A laktóztartalom meghatározásával sikerült megállapítani, hogy az eredetileg 80% laktózt tartalmazó keverékből hány százalék alakult át valamilyen oligomerré vagy polimerré. Amennyiben a hőkezelés során a laktózkoncentrációja jelentős mértékben csökkent, úgy az alkalmazott hidroxikarbonsavak vélhetően különböző lánc hosszúságú molekulákat létrehozva reagáltak a laktózzal.

A 24 mintából elvégezve a laktóztartalom meghatározást a következő eredményeket kaptuk. Az első kísérletben 80 g laktózhoz 20 g citromsavat, a második kísérletben 80 g laktózhoz 20 g almasavat kevertünk, majd elvégeztük a hőkezelést 170 °C-on, rendre 5, 10, 20, 30, 40, 50 és 60 percig. Egy ezt követő kísérletben a hőmérsékletfüggést vizsgáltuk, amelynek során az előzőekben felsorolt mintákat (citromsavas, illetve almasavas) 30 percig 130, 140, 150, 160 és 170 °C-on kezeltük. Ebben a kísérletsorozatban arra kívántunk választ kapni, hogy melyik az az optimális hőmérséklet, amelynek alkalmazásával a laktóz és a hozzákevert karbonsavak között lejátszódó reakció során a legtöbb oligomert, polimert sikerül előállítani.

Kísérleteinkhez 20% eritritet és 80% laktózt tartalmazó kontrollminta-keveréket állítottunk össze annak érdekében, hogy a 30 percig tartó, 170 °C-os hőkezelés során megállapíthassuk, hogy – mivel a laktóz az eritrittel nem reagál – milyen mértékű a tejcukor hóbomlása. A hőkezelés során a keverék laktóztartalmát 79,1%-nak találtuk.

A laktóz citromsavval 5 percig történő hőkezelése után annak mennyisége 73,6%-ra, 60 percig történő hőkezelés után pedig 7,1%-ra csökkent. Ezek alapján úgy véljük, hogy a citromsavas hőkezelés során a laktóz kb. 93%-a valamiféle oligomer vagy polimer vegyületté alakult át.



1. ábra. A citromsavval és az almasavval különböző időtartam alatt végrehajtott reakciókból visszamaradó tejsav mennyisége
Figure 1. Amount of residual lactose after reaction with citric acid and malic acid over different periods of time

A második kísérletben az 5 percen keresztül hőkezelt, almasavat tartalmazó minta laktóz tartalmát 70,6%-nak, a 60 perces kezelés utáni laktózmaradékot pedig 16,4%-nak mértük. 60 perc alatt a laktóz 83-84%-a alakult át reakciótermékké. Kísérleti eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy úgy az almasav, mint a citromsav laktózzal való reagálásával oligomerek vagy polimerek előállítására van lehetőség.

A reakció hőmérsékletfüggésével kapcsolatban a következő eredményeket kaptuk. A citromsavas mintát 130 °C-on 30 percig hőkezelve a laktózból csupán mintegy 1-2% mennyiség alakult át a kívánt reakciótermékké. Ugyanebből a mintából a 170 °C-os hőkezelés után viszont csak 16,4% laktózt tudunk visszanyerni, tehát a laktóz több mint 80%-a oligomerré vagy polimerré alakult át. Almasavval 130 °C-on megismételve a kísérletet a laktóz mintegy 30%-a alakult át 30 perc alatt. Szintén 30 perc alatt 170 °C-on a laktóz tömegének 70%-a lépett reakcióba az almasavval.

A második kísérletből le lehet vonni azt a következtetést, hogy magasabb hőmérsékleten a citromsav és az almasav is megfelelő partnernek bizonyult laktóz oligomerek vagy polimerek kialakítására. A 130 °C-os hőmérséklet kevésnek tűnik, ezért inkább a 160-170 °C-on 30 percig, esetleg 150-160 °C-on 1 órán át végzett hőkezelést javasoljuk az ideális oligomer-és polimer-kihozatal érdekében. Az eritrittel végzett

kontrollminta-kísérletből kiderült, hogy az alkalmazott hőmérsékleti viszonyok és időtartam mellett a laktóz nem bomlott el, hiszen a mintához kevert tej-cukrot szinte teljes egészében visszanyertük.

4.5.2. Az előállított prebiotikum cukortartalmának meghatározása sósavas hidrolízis után

A kapott reakciótermékekből sósavas hidrolízissel kíséreltük meg a laktóz kémiai kötéseiből történő felszabadítását. Hipotézisünk az volt, hogy a hidrolízist követő cukormeghatározás eredményeiből majd látni lehet, hogy a laktóz csakugyan beépült-e a nem redukáló hatású polimerekbe, vagy esetleg más – nem várt – kémiai átalakulás ment végbe a reakció során. A sósavas hidrolízist követően az összes cukortartalom-meghatározás kedvező eredményt hozott. Annál a mintánál, amelyet 170 °C-on 60 percig 20% citromsav jelenlétében hőkezeltünk, a maradék laktóztartalom 7,1% volt, amely a sósavas hidrolízist követően összescukor-tartalomban mérve 46,3%-ra nőtt. A 20% almasavval 170 °C-on 60 percig végzett hőkezelést követően a maradék laktóztartalom összes cukorban kifejezve a sósavas hidrolízist követően 16,4%-ról 51,2%-ra emelkedett. A 170 °C-on 30 percig végzett hőkezelést követően 20% citromsav jelenlétében a maradék laktóztartalom összes cukorban kifejezve 16,4%-ról 54,9%-ra, almasav esetében pedig 25,5%-ról 53,8%-ra nőtt.

3. táblázat. A különböző hőmérsékleten 30 percig végzett hőkezelés hatása a laktóz, a citromsav és az almasav közötti reakcióra

Table 3. Effect of heat treatment at different temperatures for 30 minutes on the reaction between lactose and citric acid and between lactose and malic acid

Minta jelzése Sample ID	Minta Sample	Hőmérséklet (°C) Temperature (°C)	Laktóz (%) Lactose (%)
M15	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	130	78.2
M16	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	130	56.8
M17	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	140	48.1
M18	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	140	55.4
M19	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	150	33.4
M20	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	150	38.3
M21	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	160	25.6
M22	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	160	29.7
M23	80 g laktóz + 20 g citromsav 80 g lactose + 20 g citric acid	170	16.4
M24	80 g laktóz + 20 g almasav 80 g lactose + 20 g malic acid	170	25.5

Mérési eredményeinkből az következik, hogy a hőkezeléses reakciók alatt a tejcukor legnagyobb része nem bomlott el, hanem olyan oligomerré vagy polimerré alakult át, amely a Fehling-reakciót csak minimális mértékben adja. Amikor azonban az oligomereket, illetve a polimereket sósavas hidrolízissel mono- esetleg diszacharidokká alakítottuk át, akkor a keletkezett cukorszerű anyagok (valószínűleg nagyobb részben glükóz és galaktóz, kisebb részben laktóz) adták a Fehling-reakciót, és összes cukorként voltak meghatározhatók.

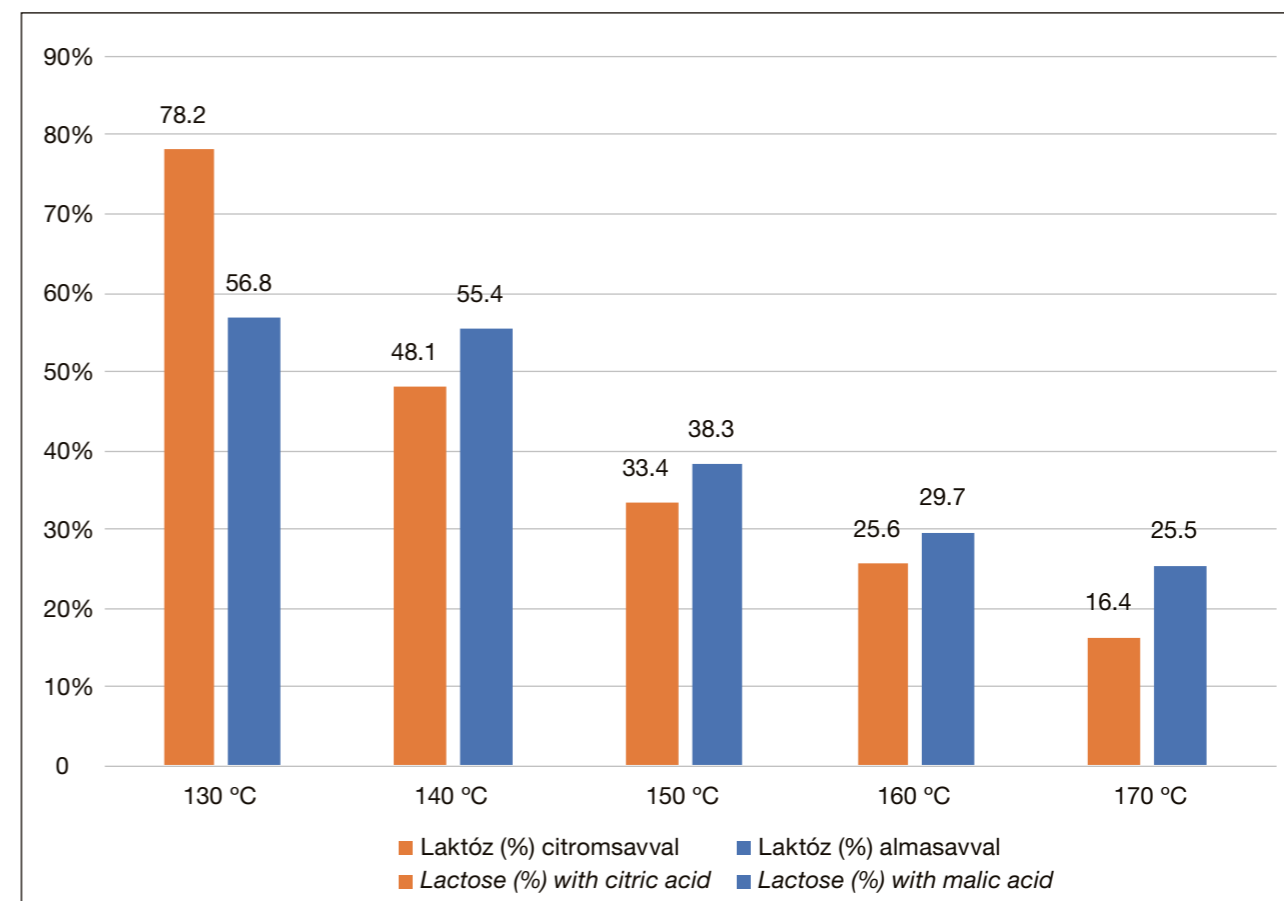
4.5.3. Az előállított prebiotikum amiláz enzimmel történő kezelése

A hőkezeléses reakciók során nyert termékeket egy másik kísérletsorozatban *amilázzal* is hidrolizáltuk, modellezve a bél elülső szakaszában lejátszódó reakciókat. Az *amilázzal* történő hidrolízist követően az összescukor-tartalom gyakorlatilag nem változott. Ebből az következik, hogy az *amiláz* a diszacharid laktózzal nem lépett természetes reakcióba, de a kísérleteinkben előállított oligo- és a poliszacharid származékokat sem volt képes hasítani. Így a kísérleteinkben előállított, egyelőre nem azonosított, feltételezhetően oligomer és/vagy polimer termék rendelkezik azokkal a tulajdonságokkal, amelyek a prebiotikus hatás alapfeltételei. Vagyis az emberi

bélcsatorna elülső szakaszában nem bomlik le, nagy valószínűséggel eljut a vastagbélbe, ahol táplálékul szolgálhat az ott élő probiotikumoknak.

5. Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.3-VE-KOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



2. ábra. A citromsavval és az almasavval különböző hőmérsékleteken végrehajtott reakciókból visszamaradó tejsav mennyisége
Figure 2. Amount of residual lactose after reaction with citric acid and malic acid under different temperatures

Preparation of prebiotics by lactose-malic acid and lactose-citric acid reaction

KEYWORDS: lactose, malic acid, citric acid, prebiotics, sugar determination, enzymatic degradation

1. SUMMARY

Prebiotics are indigestible food components that serve as nutrients for bifidobacteria and lactobacilli in the colon. Dietary fiber and oligosaccharides are typical prebiotics, therefore, prebiotics were prepared in our experiments by reacting lactose with malic acid and citric acid at the right concentration and for the right length of time at the optimal temperature. The ideal parameters of the reaction were determined, as well as the consumption of the starting materials and the increase in the concentration of the final product, and the total sugar content of the hydrolyzed prebiotic after hydrochloric acid hydrolysis. In vitro experiments have shown that the final product prepared by us is resistant to carbohydrate degrading enzymes (which is a basic requirement for a prebiotic) and thus can serve as a nutrient for the probiotic bacteria living in the colon.

2. Introduction

The international nomenclature of probiotics (probiotics, prebiotics and synbiotics) developed in the last two decades of the 20th century, while the formulations of the products have also become uniform in terms of their ingredients.

Probiotics are all intestinal bacteria that have a beneficial effect on the health of the host. Natural nutrients, which are typically the exclusive nutrients of probiotics, and hence promote their proliferation and preponderance, are called *Prebiotics*.

The term *synbiotics* means the sum total of probiotics and prebiotics. In synbiotic foods, the effects of the two aforementioned beneficial factors are added together, and their effects become synergistic. As a result, for example, dairy products that have been prepared using not only probiotics but also one or more prebiotics are synbiotic.

Prebiotics (formerly known as bifidus or bifidogenic factors) are oligosaccharides composed of 2-9 simple sugar units (monosaccharides). They are not metabolized in the stomach and small intestine,

thus they reach the colon undigested as water-soluble dietary fiber. In addition to the dietary fiber function, their real value lies in the fact that they are the exclusive foods of probiotics. Since there is little digestible food residue in the colon, there is a relative lack of food for the microflora. However, the ingestion of prebiotics promotes the proliferation of human-friendly probiotics [1].

In their natural state, prebiotics are found in many foods. Their rich sources include Jerusalem artichoke and chicory roots, but can also be found in onions, garlic, leeks, artichokes, oatmeal, wheat, bananas, milk and ripe cheeses. During the manufacture of formulations with a probiotic effect, pure products prepared by industrial technologies are typically used, which are marketed as liquid concentrates or powders with an active ingredient concentration of 40-95%. Natural industrial concentrates can be, for example, galacto-, fructo-, malto- or xylooligosaccharides, depending on the type of monosaccharide they are composed of. In 1995, more than 80,000 tonnes of prebiotics were produced worldwide, but production has increased to around 200,000 tonnes by now. The increase in world production indicates that interest in probiotic

foods has been increasing steadily. About 40% of the amount produced is galacto-oligosaccharide (e.g. lactulose), the raw material of which is lactose [2, 3, 4].

Thus prebiotics are indigestible polysaccharides and oligosaccharides. Reaching the colon, they inhibit the growth of *Salmonella* and *Escherichia coli*, while at the same time promoting the growth of bifido- and lactic acid bacteria. The name „prebiotic” comes from 1995 [5]. There are several conditions for the prebiotic effect of a nutrient [6], the most important of which are:

- Resistance to gastric acid and the digestive effect of pepsin;
- The ability to serve as a nutrient to the beneficial microflora of the intestinal tract, the metabolic products of which contribute to the improvement of the health and well-being of the person consuming the probiotic.

Many food components met these criteria, such as inulin, fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides (GOS), lactulose and polydextrose. Isomaltol oligosaccharides (IMO), xylooligosaccharides (XOS) and lactitol have been classified as potential prebiotics [7].

Prebiotics are found in a wide variety of foods. For example, chicory root contains fructooligosaccharides of inulin origin, while wheat bran contains arabinoxylooligosaccharides (AOXS) and xylooligosaccharides (XOS). These substances are widely used in the manufacture of probiotic products [8, 9, 10].

Mannitol, maltodextrin, raffinose, lactulose and sorbitol are also prebiotics with health-protective effects [11, 12, 13]. Seeds rich in resistant starch are also considered prebiotics; they are not digested and are therefore not absorbed in the small intestine, but once in the colon, its microflora can utilize them during fermentation while short chain fatty acids (SCFA, such as propionic acid, butyric acid, valeric acid, caproic acid) are produced. These fatty acids inhibit the growth of putrefactive, toxin-producing bacteria in the colon by lowering the pH [14].

Fermentable dietary fibers similar to the β -glucan of rye, as well as the gum-like polysaccharides of flaxseed and fenugreek can also be considered prebiotics and are also raw materials for the production of short chain fatty acids, and so they have a health-protective effect. Mannates present in large amounts in the cell wall of yeast cells can also be considered prebiotics [15].

Today, the number of sick people and deaths due to malnutrition, smoking and alcoholism is significant. Diseases typical of our time include chronic obesity,

gastrointestinal problems, diabetes, cardiovascular diseases, cancer and degenerative lesions, the number of which has increased significantly in recent times. To prevent these diseases or reduce their symptoms, food consumers are increasingly turning to health-protective foods that also contain prebiotics, from which they expect a significant improvement in their quality of life.

A significant proportion of consumers are looking for low-carb, high-fiber and high-protein foods, which has been accompanied by a growing interest in prebiotic foods. Good examples of this are food types containing blackcurrant leaf extract powder, lactoferrin and lutein, which are produced in large quantities all over the world. These products significantly increase the amount of bifidobacteria and lactobacilli, and also significantly reduce the number of Bacteroides and Clostridium species in the colon. In addition, they reduce the activity of β -glucuronidase enzymes and increase the activity of β -galactosidase enzymes in the small intestine, thus promoting, for example, the digestion of lactose in lactase-deficient individuals [16].

Wheat germ supplementation resulted, after 20 days, in a significant lowering of the pH of the colon and the size of the clostridium population, and a significant increase in the number of lactobacilli and bifidobacteria, while also significantly improving the quality of life of the consumers of this type of product [17]. Gum arabic was found to reduce disease-related symptoms in patients with systolic blood pressure or diabetic renal failure [18]. It was also found that consumption of 25 g of gum arabic product per day for 8-12 weeks had a beneficial effect on the condition of diabetic patients and significantly reduced systolic blood pressure [19].

Our group previously performed the structural and quantitative analysis of epoxyoligosaccharides and oligosaccharides produced by lactic acid bacteria [2, 3, 4]. In the present paper, we report the results of our experiments in which prebiotics were prepared by the reaction of lactose with malic acid and citric acid. In the course of our work, the patent description found in sources [20] and [21] was considered as a starting point, in which it was sought to produce surfactants by forming ester bonds between carbohydrates and dicarboxylic acids, and the mechanism of these reactions was studied. The method was successfully tested by the authors in the case of sugar alcohols, sugars, oligosaccharides and polysaccharides as well [20, 21].

3. Objective

Based on the literature and our own previous research, our objective was to produce prebiotics in which bonds were created between lactose and malic acid and between lactose and citric acid that resist the acidic medium and the attack of

¹ University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, Institute of Food Technology

² Sapientia Hungarian University of Transylvania, Miercurea Ciuc Campus

carbohydrate-degrading enzymes in the human stomach and the anterior part of the intestinal tract, reach the colon, where then they serve as nutrients for the probiotic microorganisms. Our aim was to determine the optimal parameters of the reaction, such as temperature, time and the concentration of the reactants, to measure the loss of starting materials and the increase in the concentration of the final product, and to analyze the total sugar content of the hydrolyzed prebiotic after hydrochloric acid hydrolysis. It was demonstrated in *in vitro* experiments that the final product prepared by us is resistant to carbohydrate-degrading enzymes, which is a basic requirement for prebiotics.

4. Materials and methods

4.1. Materials used, analytical methods applied

Our experiments were performed using pharmacopoeia grade lactose, citric acid and malic acid. The purity of the malic acid used by us was 99.5%, containing less than 1% fumaric acid and less than 0.05% malonic acid. The certificate of analysis of malic acid (E number: E296) can be downloaded from the link <http://bbbb.hu/spec/almasav.jpg>. The material used by us meets the quality requirements of the US, European and Hungarian pharmacopoeias, as well as the specifications (no. 1-2-89/107) of the EU and Hungarian Food Codexes.

The citric acid used for our experiments was also of food and pharmacopoeia quality citric acid monohydrate (E330), the certificate of analysis of which and MSDS can be downloaded from the links <http://www.bbbb.hu/spec/Citrom.jpg> and <http://www.bbbb.hu/spec/citrombizt.jpg>, respectively. Its CAS no. is 5949-29-1, EU no. is 201-069-1. According to the certificate of analysis, its citric acid monohydrate content is close to 100%, water content is no more than 8.8%, and the oxalic acid content is less than 100 mg/kg. All of the parameters meet the requirements of the EU and Hungarian Food Codexes.

The lactose used in the experiments was 99.7% purity, food grade, finely powdered D(+)-lactose monohydrate isolated from bovine milk and spray dried. Its quality met the quality requirements of Ph.Eur 8.0.

4.2. Analytical methods applied

To monitor the reaction of lactose with malic acid and citric acid, the measurement of the lactose content was selected. The formation reaction of probiotics can be followed by monitoring the decrease in the amount of lactose. Lactose belongs to the group of reducing disaccharides, therefore, it exhibits the Fehling reaction. However, if the free glycosidic hydroxyl group of lactose forms a bond, then the sugar molecule will no longer participate in the

reaction characteristic of reducing sugars. During the reaction, because of the aldehyde group of the sugar, Cu^+ ions are produced from the Cu^{2+} ions. By determining the amount of Cu^+ ions, the amount of sugar can be determined with analytical accuracy. During the analytical procedure, 2 g of the sample was placed in a 100 cm^3 volumetric flask, 50 cm^3 of water was added, and the mixture was shaken on a shaker for one hour. To remove substances that interfere with the determination of sugar, 20 cm^3 each of Carrez I and II solutions were added to the solution. The volumetric flask was then filled to mark with 80% ethanol, it was shaken and filtered through filter paper. 20 cm^3 of the filtrate was taken, from which the majority of the ethanol was evaporated, the evaporation residue was washed into a 20 cm^3 volumetric flask using distilled water at ca. 50 °C, it was allowed to cool and then filled to mark. This solution was later used to determine the reducing sugar content.

5 cm^3 of the solution thus prepared was placed in a 100 cm^3 Erlenmeyer flask, 5 cm^3 of Luff-Schoorl reagent was added and a few pieces of boiling stone, it was brought to a boil within 2 minutes by shaking over a free flame, boiled for 10 minutes, and then it was cooled down immediately. The precipitated copper(I) oxide was titrated iodometrically with 0.1 M sodium thiosulfate solution. The amount of lactose was calculated from the consumption of the titrant.

4.3. Design of the reactions between malic acid, citric acid and lactose

To the pharmacy grade lactose, 20% citric acid was added in the first step, then 20% malic acid in the second step. After reviewing the available literature and the patents, it was found that most of the reactions were carried out at 130-180 °C. Therefore, a reaction temperature of 170 °C was chosen for our experiments. The samples were mixed in a mortar to ensure adequate homogeneity of the samples. Following this, approximately 10 g each of the sample was placed in glass flasks and heat treated for 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes, and the lactose content of the samples was determined after cooling.

In the next experiment, the effect of the temperature on the reaction between citric acid and lactose and between malic acid and lactose was investigated. The samples containing 20% citric acid or 20% malic acid and 80% lactose were treated for 30 minutes at 130 °C in the first experiment, at 140 °C in the second experiment, at 150 °C in the third experiment, at 160 °C in the fourth experiment and at 170 °C in the fifth experiment. After cooling, the lactose content of the samples was determined in each case. The amount of residual lactose was given relative to 100 g of the reaction product (weight percent).

4.4. Results and their evaluation

4.4.1. Effect of the heat treatment time at 170 °C on the reaction between lactose and carboxylic acids

Table 1 shows the effect of heat treatment time at 170 °C on the reaction between lactose and citric acid.

By adding 20% citric acid to lactose and performing heat treatment at 170 °C for various periods of time it was found that upon heat treatment the starting white mixture turned yellow within 5 minutes, and within 10 minutes it turned brown and exhibited blisters. Following this, only the color of the mixture became deeper, its apparent volume remained virtually unchanged.

Table 2 shows the effect of heat treatment time at 170 °C between lactose and malic acid.

By adding 20% malic acid to lactose and performing heat treatment for various periods of time, similarly to the case with citric acid, it was found that the color of the samples hardly changed at all in the first 5 minutes, they turned slightly yellow within 10 minutes, yellowish brown within 20 minutes, then swelled continuously, and the color of the last sample changed to dark brown.

The residual amounts of lactose in the reactions with citric acid and malic acid are shown graphically in **Figure 1**.

4.4.2. Effect of heat treatment at different temperatures for the same time on the reaction between lactose and carboxylic acids

Table 3 shows the effect of heat treatment at different temperatures for the same period of time (30 minutes) on the reaction between lactose and citric acid and between lactose and malic acid.

After heat treatment at 130 °C for 30 minutes, the samples practically retained their white color, at 140 °C samples containing either citric acid or malic acid turned yellow, at 150 °C the yellowing increased further for both carboxylic acids, at 160 °C both the citric acid and malic acid samples turned strongly brown, while upon heat treatment at 170 °C for 30 minutes, the citric acid sample formed a brown mass. The malic acid sample also turned brown, but the brown discoloration remained lighter compared to the other samples.

The percentages of residual lactose after reactions carried out at different temperatures for 30 minutes are shown in **Figure 2**.

4.5. Conclusions

4.5.1. Time and temperature dependence

By determining the lactose content, it was possible to determine what percentage of the mixture that originally contained 80% lactose was converted to some kind of oligomer or polymer. If the lactose concentration decreased significantly during the heat treatment, the hydroxycarboxylic acids used presumably reacted with lactose to form molecules of different chain lengths.

The lactose contents of the 24 samples were determined to obtain the following results. In the first experiment, 20 g of citric acid was mixed with 80 g of lactose, in the second experiment, 20 g of malic acid was mixed with 80 g of lactose, and then heat treatment was performed at 170 °C for 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes. In a subsequent experiment, the temperature dependence was investigated, and during this the samples listed above (with citric acid or malic acid) were treated for 30 minutes at 130, 140, 150, 160 and 170 °C. In this series of experiments we wanted to find out what the optimal temperature was at which the reaction between lactose and the added carboxylic acid produces the most oligomers and polymers.

For our experiments, a control sample mixture containing 20% erythritol and 80% lactose was prepared in order to determine the thermal decomposition of lactose during heat treatment at 170 °C for 30 minutes, as lactose does not react with erythritol. After the heat treatment, the lactose content of the mixture was found to be 79.1%.

After the heat treatment of lactose with citric acid for 5 minutes, the amount of lactose decreased to 73.6%, and after 60 minutes it decreased to 7.1%. Based on this, it is believed that during the heat treatment with citric acid, approximately 93% of the lactose was converted to some type of oligomeric or polymeric compound.

In the second experiment, the lactose content of the sample with malic acid, treated for 5 minutes, was measured to be 70.6%, and the residual lactose after 60 minutes of treatment was measured to be 16.4%. After 60 minutes, 83-84% of the lactose was converted to a reaction product. Based on our experimental results, it is believed that oligomers and polymers can be prepared by the reaction of lactose with both malic acid and citric acid.

Regarding the temperature dependence of the reaction, the following results were obtained. By the heat treatment of the citric acid sample at 130 °C for 30 minutes, only about 1-2% of the lactose was converted to the desired reaction products. However, only 16.4% of the lactose could be recovered from the same sample after heat treatment at 170 °C, so

that more than 80% of the lactose was converted to oligomers or polymers. Repeating the experiment with malic acid at 130 °C, about 30% of the lactose was converted in 30 minutes. Over the same period of time, 70% of the lactose reacted with malic acid at 170 °C.

From the second experiment, it can be concluded that at higher temperatures, both citric acid and malic acid proved to be suitable partners for the formation of lactose oligomers and polymers. The temperature of 130 °C appears to be too low, so heat treatment at 160-170 °C for 30 minutes, or possibly at 150-160 °C for 1 hour is recommended for ideal oligomer and polymer yields. The control sample experiment with erythritol showed that under the applied temperature conditions and duration, the lactose did not decompose, since almost all of the lactose mixed with the sample was recovered.

4.5.2. Determination of the sugar content of the prepared prebiotic after hydrolysis with hydrochloric acid

From the obtained reaction products, the release of lactose from the chemical bonds was attempted by hydrolysis with hydrochloric acid. Our hypothesis was that the results of sugar determination after hydrolysis would show whether lactose was indeed incorporated in the non-reducing polymers or whether other unexpected chemical transformations took place during the reaction. Following hydrochloric acid hydrolysis, the total sugar content determination yielded favorable results. For the sample heat treated at 170 °C for 60 minutes in the presence of 20% citric acid, the residual lactose content was 7.1%, which increased to 46.3% as measured by total sugar content after hydrochloric acid hydrolysis. After heat treatment with 20% malic acid at 170 °C for 60 minutes, the residual lactose content expressed as total sugars increased from 16.4% to 51.2% after hydrochloric acid hydrolysis. After heat treatment at 170 °C for 30 minutes in the presence of 20% citric acid, the residual lactose content expressed as total sugars increased from 16.4% to 54.9%, while in the case of malic acid it increased from 25.5% to 53.8%.

It follows from our measurement results that during the heat treatment reactions most of the lactose did not decompose but was converted to oligomers and polymers that give the Fehling reaction only to a minimal extent. However, when the oligomers and polymers were converted to mono- or disaccharides by hydrochloric acid hydrolysis, the resulting sugar-like substances (probably mostly glucose and galactose and, to a lesser extent, lactose) gave the Fehling reaction and could be determined as total sugars.

4.5.3. Treatment of the prebiotic produced with amylase

In another series of experiments, the products obtained in the heat treatment reactions were also hydrolyzed with amylase, modeling the reactions that take place in the anterior intestinal tract. Following hydrolysis with amylase, the total sugar content remained virtually unchanged. It follows that a natural reaction did not take place between the amylase and the disaccharide lactose, and it was also unable to cleave the oligo- and polysaccharide derivatives produced in our experiments. Thus, the as-yet-unidentified, presumably oligomeric and/or polymeric product prepared in our experiments possesses the properties that are the basic prerequisites of a probiotic effect. That is, it does not break down in the anterior part of the human intestinal tract, it most likely reaches the colon, where it can serve as a nutrient for the probiotics that live there.

5. Acknowledgement

This publication was supported by the project EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008. The project was supported by the European Union and co-financed by the European Social Fund.

6. References

- [1] Csapó J., Albert Cs., Csapóné Kiss Zs. (2016): *Funkcionális élelmiszerek*. Scientia Kiadó, Kolozsvár. 1-180.
- [2] Csapó J., Salamon R. V., Salamon Sz., Toró Sz., Csapó-Kiss Zs. (2014): Structural and quantitative analysis of exopolysaccharides produced by lactobacillus. I. Basic information, isolation, quantitative determination, molecular mass and monosaccharide composition. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria* 7 5-20.
- [3] Csapó J., Salamon R. V., Salamon Sz., Toró Sz., Csapó-Kiss Zs. (2014): Structural and quantitative analysis of exopolysaccharides produced by lactobacillus. II. The connection status-, configuration-, phosphorous content-, modification-, structure of monosaccharides, exopolysaccharides in yogurt, galactooligosaccharides. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria* 7 21-44.
- [4] Csapó J., Vargáné Visi É., Salamon R. V., Salamon Sz., Csapóné Kiss Zs. (2014): Tejsavbaktériumok által termelt exopoliszacharidok és oligoszacharidok szerkezeti és mennyiségi analízise. (Structural and quantitative analysis of exopolysaccharides and oligosaccharides produced by lactic acid bacteria). *Tejgazdaság* 74 3-17.

- [5] Gibson G. R., Roberfroid M. B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125 1401-1412.
- [6] Gibson G. R., Probert H. M., Loo J. V., Rastall R. A., Roberfroid M. B. (2004): Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 17 259-275.
- [7] Sadler M., Stowell J. D. (2012): Chapter 4. Calorie control and weight management. . 77-90. In: O'Donnell K., Kearsley, M.W. (eds) *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. Blackwell Publishing Ltd, 1-490.
- [8] Sabater-Molina M, Larque E., Torrella F., Zamora S. (2009): Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry* 65 315-328.
- [9] Femia A. P., Salvadori M., Broekaert W. F., Francois I. E. J. A., Delcour J. A. (2010): Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) reduce preneoplastic lesions in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). *European Journal of Nutrition* 49 127-132.
- [10] Xu B., Wang Y., Li J., Lin Q. (2009): Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 35 351-357.
- [11] Yeo S. K., Liong M. T. (2010): Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 267-275.
- [12] Vamanu E., Vamanu A. (2010): The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB16. *African Journal of Microbiology Research* 4 534-537.
- [13] Mandal V., Sen S. K., Mandal N. C. (2009): Effect of prebiotics on bacteriocin production and cholesterol lowering activity of *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25.1837-1841.
- [14] Vaidya R. H., Sheth M. K. (2010): Processing and storage of Indian cereal and cereal products alters its resistant starch content. *Journal of Food Science and Technology* 48 622-627.
- [15] Lin B., Gong J., Wang Q., Cui S., Yu H., Huang B. (2011): In vitro assessment of the effects of dietary fibers on microbial fermentation and communities from large intestinal digesta of pigs. *Food Hydrocolloids* 25 180-188.
- [16] Molan A-L., Liu Z., Kruger M. (2010): The ability of blackcurrant to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 1735-1743.
- [17] Matteuzzi D., Swennen E., Rossi M., Hartman T., Lebet V. (2004): Prebiotic effects of a wheat germ preparation in human healthy subjects. *Food Microbiology* 21 119-124.
- [18] Glover D. A., Ushida K., Phillips A. O., Riley S. G. (2009): Acacia (sen) SUPERGUM™ (Gum arabic): an evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids* 23 2410-2415.
- [19] Phillips A. O., Phillips G. O. (2011): Biofunctional behavior and health benefits of a specific gum arabic. *Food Hydrocolloids* 25 165-169.
- [20] Gaertner V. R., Doerr E. L. (1956): Carbohydrate esters of carboxylic acids and methods of preparing same. United States Patent No. 579,719.
- [21] Antrim R. L., Barresi F. W., McPherson R., Wang J. I. (2003): Dextrinized, saccharide-derivatized oligosaccharides. United States Patent No. 10/601,912.