

# SZAKDOLGOZAT

Liebl Rebeka

LIEBL REBEKA

2022

*Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet*

**Szak neve:** BSc Biomérnöki

**Modul neve:** Alkalmazott biotechnológiai

**Modul szerinti tanszék:** Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék


**Szakedolgozat készítés helye** Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Hallgató: Liebl Rebeka

A szakedolgozat címe: Posztbiotikumok antimikrobás hatásának vizsgálata


Konzulensek: Dr. Bujna Erika egyetemi docens  
Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi tanár

Beadás dátuma: 2022.11.02.

  
szakedolgozat készítés helyének vezetője  
Dr. Nguyen Duc Quang

  
konzulensek  
Dr. Bujna Erika

  
Dr. Nguyen Duc Quang

  
Dr. Nguyen Duc Quang  
modul szerinti tanszék vezetője

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,  
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és  
Erjedésipari Technológia Tanszék

Posztbiotikumok antimikrobás hatásának vizsgálata

Liebl Rebeka

Budapest

2022

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>2</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>3</b>
3.1. Probiotikumok.....	3
3.1.1. Probiotikumok kritériumai .....	4
3.1.2. Tejsavbaktériumok.....	4
3.1.3. <i>Lactobacillus</i> nemzetség .....	6
3.1.4. Di- és oligoszacharidok alkalmazása és az antimikrobás hatás kapcsolata.....	6
3.2. Posztbiotikumok.....	9
3.2.1. Sejtizátum előállítási lehetőségei.....	10
3.2.2. Posztbiotikumok lehetséges forrásai .....	11
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>14</b>
4.1. Anyagok.....	14
4.1.1. Mikroorganizmus törzsek.....	14
4.1.2. Felhasznált tápközegek .....	15
4.2. Módszerek.....	17
4.2.1. Tenyésztési módszerek.....	17
4.2.2. Fermentáció .....	17
4.2.3. Sejtek összegyűjtése.....	17
4.2.4. Sejtfeltárás .....	17
4.2.5. Agardiffúziós módszer .....	18
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....</b>	<b>19</b>
5.1. MRS tápközegben szaporított tejsavbaktériumok antimikrobás hatása ..	19
5.2. Trehalózos tápközegben felszaporított tejsavbaktériumok antimikrobás hatása .....	23
5.3. $\alpha$ -Ciklodextrint tartalmazó tápközegben felszaporított tejsavbaktériumok antimikrobás hatása .....	26

5.4. Kiindulási pH hatása az antimikrobás hatás mértékére .....	31
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>34</b>
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>36</b>

Liebl Rebecka

# 1. BEVEZETÉS

A probiotikumok élő, nem patogén mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva jótékony hatásúak a gazdaszervezetre (Vallejo-Cordoba és munkatársai, 2020). A hatásukat különböző mechanizmusok által fejtik ki. Ilyen például a bél pH értékének csökkentése, ennek következtében a patogén baktériumok megtapadási esélyének csökkentése (Williams, 2010). Ezenkívül egyfajta versengést is folytatnak a bélben jelen lévő vitaminokért a kórokozókkal szemben, így is csökkentve a túlélési esélyeiket, ezáltal a betegségek kialakulásának lehetőségét (Markowiak és Slizewska, 2017). A jótékony hatással rendelkező törzsek és ezáltal a probiotikumok potenciális forrásai a leggyakrabban a *Bifidobacterium* és a *Lactobacillus* nemzetségbe tartoznak. Alkalmazásuk feltételeként számos kritériumnak meg kell felelniük, hogy a feldolgozás, a tárolás, a fogyasztás és az emésztőrendszeren való áthaladás során életképes formában éri el a bélrendszert. Feldolgozásuk során a tejsavbaktériumok kedvezőtlen hatásnak vannak kitéve, ilyen hatások közé tartozik az alacsony hőmérséklet, savas pH, oxigén, limitált tápanyag. Ezen hatások a rontják a baktérium jótékony hatásait és túlélési képességeit, mivel stresszt indukálnak (Feng és Wang, 2020).

Posztbiotikumnak nevezünk minden olyan, a humán szervezet számára jótékony hatást kifejtő anyagot, amelyet a mikroorganizmus a metabolikus tevékenysége során bocsát ki vagy termel (Żółkiewicz és munkatársai, 2020). Ezek nem életképes bakteriális sejtalkotók, melyek a gazdaszervezetben biológiai aktivitással rendelkező termékeként viselkednek (Vallejo-Cordoba 2020). Mivel nem élő szervezetek, így a bevitelükkel kapcsolatos kockázat mértéke minimális, továbbá a posztbiotikumok esetén nincs szükség hűtésre, ezáltal az ilyen típusú termékek szállítása, tárolása is könnyebb (Żółkiewicz és munkatársai, 2020), ez pedig hatalmas előnyt jelent a probiotikumokkal szemben. Az újabb kutatások azt igazolják, hogy a posztbiotikumok alkalmazása fiziológiai előnyökkel is jár, melyek a bél gát funkciójának fokozásához kapcsolódnak. További megfigyelések szerint alkalmazásuk hozzájárul a nyálkahártya-immunitás javításához, rendelkeznek vastagbélhámra gyakorolt tumorelles és gyulladáscsökkentő hatásokkal, védnek az immunrendszeri rendellenességek kialakulásától is (Peluzio és munkatársai, 2021).

Mindezek ösztönöztek arra, hogy probiotikus baktériumok sejtalkotóinak hatását vizsgáljam kórokozó mikroorganizmusok ellen, különböző paraméterek változtatása mellett.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A probiotikumok alkalmazhatóságának és jótékony élettani hatásuk biztosításának egyik feltétele, hogy életképes formában kerüljenek a vastagbélbe, mely speciális törzseket igényel és technológiai kihívásokkal jár. Ezzel szemben a posztbiotikumok olyan nem életképes bakteriális sejtalkotók, melyet a mikroorganizmus a metabolikus tevékenysége során bocsát ki vagy termel és szintén jótékony hatást fejt ki a szervezet számára. Alkalmazásuk hatalmas előnyt jelenthet a probiotikumokkal szemben.

Mindezek alapján kutatásom céljául tűztem ki probiotikus tulajdonságú tejsavbaktérium törzsek (*Lactobacillus fermentum* HA-179, *Lactobacillus helveticus* R-52, *Lactobacillus salivarius* HA-118 és a *Lactobacillus crispatus* LCR01) posztbiotikus tulajdonságának feltárását, különböző patogén törzsek ellen kifejtett antimikrobás hatás vizsgálatával.

A vizsgálatok kiválasztásánál különböző sejtfeltárási módszerek alkalmazhatóságát céloztam meg annak érdekében, hogy olyan módszert találjak a tejsavbaktériumok előlésére, amellyel a leghatékonyabb antimikrobás hatást érhetem el a leggazdaságosabb módszerekkel.

Vizsgálataim során az alábbi részfeladatokat terveztem megvalósítani a probiotikus tulajdonságú sejtek antimikrobás hatásának bizonyítására:

- Különböző sejtfeltárási módszerek alkalmazása a sejtlyizátum kinyerésére
  - kémiai detergenssel való feltárás
  - French Press homogenizátor
  - hőkezelés
- A fermentációs idő hatásának vizsgálata az antimikrobás anyag termelésére
- A sejtfeltárást megelőző felszaporító tápközeg összetétel hatásának vizsgálata, különös tekintettel a trehalózra és  $\alpha$ -ciklodextrinre
- A felszaporító tápközeg kiindulási pH-jának hatása

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. Probiotikumok

A WHO által meghatározott definíció szerint a probiotikumok, olyan élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva jótékony egészségügyi hatással vannak a gazdaszervezetre (World Health Organization, 2001). Probiotikumokat ma már elterjedten használják az élelmiszeriparban a jótékony élettani hatásai miatt. Napjainkban is sok kutatás folyik (Zhou és munkatársai, 2022), hogy még jobban megismerjük működésüket, a gazdaszervezet immunreakciója, illetve a patogén baktériumokkal szembeni viselkedésüket. A probiotikumok fő hatásmechanizmusai közé tartozik a kórokozókvaló közvetlen antagonizmus, a baktériumok megtapadási és inváziós képességének gátlása a bélhamban, a bélrendszeri immunrendszer és a központi idegrendszer szabályozása. A probiotikumok különböző mechanizmusok által fejtik ki jótékony hatásukat például a bél pH-jának csökkentésével, illetve a patogén törzsek elterjedésének csökkentésével (Williams, 2010). A probiotikumok a bélrendszerben a gazdaszervezet által elfogyasztott nem emészthető élelmiszeralkotók, valamint a szervezet által előállított metabolitokat hasznosítják, így az együttélés mind a gazdaszervezet, mind a tejsavbaktériumok számára pozitív hatással bír. Továbbá a tejsavbaktériumok az élettevékenységükhöz szükséges vitaminokat és aminosavakat is a bélrendszerből veszik fel, versengve az esetleges patogén baktériumokkal. Megfelelő elterjedésük védelmet nyújt a szervezet számára az itt megtelepedő kórokozókvaló szemben, ezért a gazdaszervezet megfelelő egészségügyi állapota érdekében javasolt az ökoszisztéma kedvező egyensúlyának elérése (Markowiak és Śliżewska, 2017). Elfogadott az a megállapítás miszerint kapcsolat van a bélmikrobióta és több létfontosságú szerv között, mint a máj, a központi idegrendszer, valamint a tüdő. Ezek esetében a bélmikrobióta felerősíti a jótényok makrofágok aktivitását, melyek szerepet játszanak a gazdaszervezet betegségekkel szembeni védekezésében (Stavropoulou és Bezirtzoglou, 2020). A probiotikumként használt törzsek száma napjainkban egyre jobban gyarapszik, legnagyobb képviselőjük a *Lactobacillus*, illetve a *Bifidobacterium* törzsek. Ezen baktériumok esetén a jótékony hatás kifejtéséhez elengedhetetlen, hogy élő állapotba jussanak el célhelyükre. Ipari feldolgozás során viszont a tejsavbaktériumok kedvezőtlen hatásnak vannak kitéve, ilyen hatások közé tartozik az alacsony hőmérséklet, alacsony pH, oxigén, limitált tápanyag. Ezen hatások a baktériumban stresszt indukálnak, mely hatására romlik a baktérium túlélési képessége, valamint jótékony hatása (Feng és Wang, 2020).



### 3.1.1. Probiotikumok kritériumai

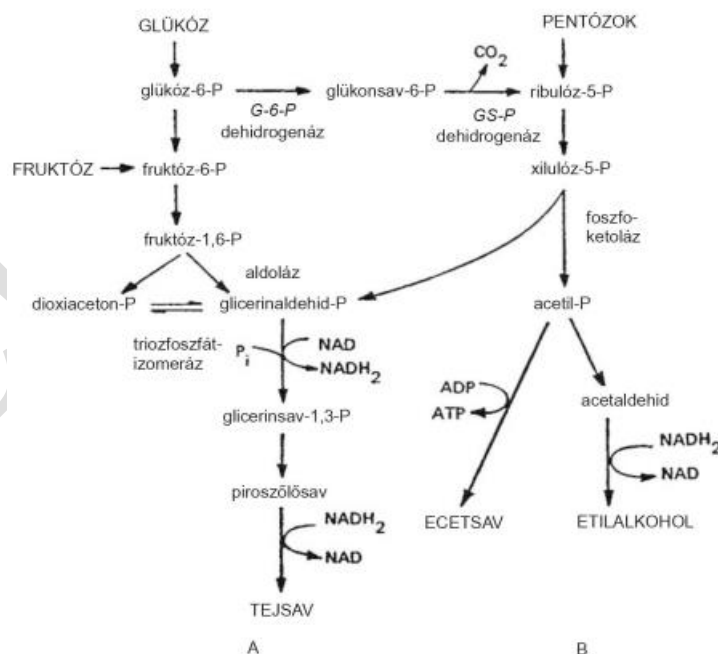
Egy törzs probiotikumként való alkalmazásához számos kritériumnak kell megfelelniük, mind biztonsági, mind funkcionális, valamint technológiai szempontból is. Ezen szervezetek esetében talán a legfontosabb kritérium, hogy az adott törzs ne legyen patogén, valamint, hogy ne hordozzon átadható antibiotikum rezisztencia géneket. A probiotikumokkal szemben elvárás, hogy megőrizték életképességüket és immunmoduláló hatásukat mind a gasztrointesztinális traktuson való áthaladás, mind a szállítás, és forgalmazási folyamatok során. Ezenkívül biztonsági elvárás az emberi vagy állati eredet, a pontos genotípusos és fenotípusos jellemző azonosítása, valamint a káros hatások hiánya. Funkcionális szempontból lényeges, hogy képes legyen a túlélésre, az anyagcserefolyamatainak fenntartására és növekedésre a célhelyen, ellenálljon a gyomor alacsony pH-jának, versenyképes legyen a bélben élő egyéb mikrobafajokkal szemben, antagonista aktivitással bírjon a kórokozókval szemben, ezenkívül legyen rezisztens az endogén bélmikrobióta által termelt bakteriocinokkal és savakkal szemben, valamint a gazdaszervezeten belül meghatározott helyeken megtapadjon és kolonizálódjon, megfelelő legyen a túlélési aránya a gyomorban és a bélrendszerben. Technológiai kritériumok közé tartozik, hogy a probiotikum nagy mennyiségben könnyen előállítható legyen, a baktériumok kívánt pozitív tulajdonságai és életképessége megmaradjon a rögzítés, feldolgozás, valamint a forgalmazás során is. A késztermékekben nagy legyen a túlélési arány a tárolás során, genetikailag stabilak, valamint ellenállóak legyenek a bakteriofágokkal szemben (Markowiak és Slizewska, 2017). Összességében elmondható, hogy a probiotikumokkal szemben támasztott elvárások jelenős része az életképességükhöz kapcsolódik. A probiotikumok esetében nagy hátrálynak számít a tény, hogy életképes formában kell elérniük a bélrendszert, ez arra utal, hogy jótékony hatásuk a metabolikus aktivitásuktól függ (Gibson és munkatársai, 2004). A legújabb kutatások kimutatták, hogy a probiotikus törzsek által várt jótékony hatás elérésére a posztbiotikumok jó alternatívaként szolgálnak, különösen a kónikus gyulladással állapotokban, mint a gyulladással bélbetegség (Tsilingiri és Rescigno, 2013).

### 3.1.2. Tejsavbaktériumok

A posztbiotikumok forrásai többek közt a tejsavbaktériumok, melyek Gram-pozitív pálcák formájában fordulnak elő, mozgásszervük nincs. A tejsavbaktériumok közös tulajdonsága, hogy energiatermelő anyagcseréjük során tejsavas erjedés történik, ezen baktériumoknak nincs működő teljes citromsav ciklusuk. A tejsavbaktériumok szerves savak és oxidáló hatású hidrogén-peroxid termelése mellett, bakteriocinek termelésével (fehérje természetű

antimikrobás anyagok) is képesek gátolni más, főleg Gram-pozitív baktériumokat (Both, 2018). Erjesztési típusuk három csoportba sorolható: obligát homofermentatív, obligát heterofermentatív, valamint fakultatív heterofermentatív (Stiles és Holzapfel, 1997).

Az obligát homofermentatív erjedés esetében a glikolízis során csak tejsav keletkezik, ahol a glükózból a piroszőlősav közvetlenül tejsavvá redukálódik. A tejsav, másnéven 2-hidroxi-propánsav a tejsavbaktériumok fermentációja során végtermékként keletkezik, mely a szénhidrátok anaerob bontásával jön létre. A tejsav hatására a termék savas közegbe kerül, ami élelmiszeripari felhasználás során gyakran gátolja a patogén, Gram-pozitív baktériumok megtelepedését és szaporodását. Továbbá a savas pH (pH <4,5) denaturálja a sejtfelszíni enzimeket, valamint roncsolja a DNS és a fehérjék szerkezetét is. Obligát heterofermentatív erjesztés esetében a glükózból szén-dioxid és egyéb termékek, mint az ecetsav és etanol is képződnek a tejsav mellett. Ebben az esetben a glükóz a pentóz-foszfát cikluson keresztül átalakul xilulóz-5-foszfáttá, mely elhasad glicerinaldehyd-foszfáttá, ebből képződik a piroszőlősavon keresztül a tejsav, valamint acetyl-foszfáttá, mely vagy acetaldehyden keresztül etanollá vagy ecetsavvá alakul. Fakultatív homofermentatív erjesztés esetén a hexózok a glikolízis során bomlanak le, míg a pentózok és a glükonsav a pentóz-foszfát úton kerülnek lebontásra (Deák és munkatársai, 2006).



1. ábra: Homofermentatív (A) és heterofermentatív (B) tejsavas erjedés (Deák és munkatársai, 2006)

A tejsavbaktériumok savtűrő és savtermelő szervezetek, szaporodási pH optimumuk 5,5 pH-n van, de elviselik a pH-3,0 értéket is. Tápanyagigényük összetett, szaporodásukhoz vitaminokra és aminosavakra is szükségük van. Előfordulnak növényi anyagokban, szerves részét képezik az emberi és állati szervezeteknek, a legelterjedtebb felhasználásuk a tejiparban van. Ezen iparágban gyakran alkalmazzák starterkultúráként. A tejsavbaktériumok legjelentősebb nemzetségeként tartják számon a *Lactobacillus* törzseket.

### 3.1.3. *Lactobacillus* nemzetség

A *Lactobacillus* ez egyik legelterjedtebben használt probiotikum, ezen okból érdemes posztbiotikumként is megvizsgálni őket. A laktobacillusok olyan tejsavbaktériumok, melyek a *Firmicutes* törzsbe, *Bacilli* osztályba, *Lactobacillales* rendbe, *Lactobacillaceae* családba, a *Lactobacillus* nemzetségbe tartoznak. A laktobacillusok mikroaerofil baktériumok, aerob oxidatív anyagcseréjük van, katalázt és citokrómot nem tartalmazó fajok. Legnagyobb számban az emberi és állati bélmikrobiótában találhatók, ám a különböző törzsek eltérő helyeken fordulhatnak elő, mint például a bőrön, vastagbélben. A laktobacillusok támogatják a gazdaszervezet immunrendszerét, így számos patogén mikroorganizmussal szemben ellenállóvá teszik a gazdaszervezetet. A gazdaszervezet védekezik a kórokozók ellen specifikus, valamint nem specifikus módon, ilyen a bőr- és légzőszerv, valamint az emésztőrendszer is. Az emésztőrendszerben a burkoló epitélium csillangós hámsejtjei fizikai gátat képeznek, a bélcsatorna emésztőnedvei is védelmet nyújtanak, valamint a gyomorban uralkodó savas pH is ellenállóbbá teszi a gazdaszervezetet. A bélmikrobióta tagjai szelektív gátló anyag termelésével csökkentik le a betegség kialakulásának lehetőségét (Deák és munkatársai, 2006).

### 3.1.4. Di- és oligoszacharidok alkalmazása és az antimikrobás hatás kapcsolata

Chen és munkatársai (2007) kutatásuk eredményeként leírták, hogy az oligoszacharidok, valamint a trehalóz hatékonyan fokozza az általuk vizsgált baktériumok bakteriocin termelését. Kísérletükben négyfajta szénhidrátforrást (dextróz, frukto-oligoszacharidok, raffinóz, trehalóz) alkalmaztak a táplevesben egyedüli szénforrásként. Öt bakteriocin termelő törzset használtak, amelyek között volt nizint, enteriocin és más bakteriocinokat termelő törzs is. A gátló hatást agardiffúziós módszerrel vizsgálták.

Pranckute és munkatársai (2016) bebizonyították, hogy az oligoszacharid asszimiláció hatékonyság törzsspecifikus, valamint, hogy a laktobacillusok esetében a prebiotikus oligoszacharidok alkalmazása növelheti az antibakteriális hatásukat. Kísérleteik során különböző *Lactobacillus* törzseket vizsgáltak, melyeket különböző oligoszacharidokat tartalmazó közegben szaporítottak fel. Igazolták, hogy az *L. lactis subsp. lactis* DSM 20729 törzs esetében az  $\alpha$ -ciklodextrin egyedüli szénforrásként történő alkalmazása fokozta az antibakteriális aktivitást. Ugyanezen törzs jelentős antimikrobás hatást mutatott *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 és *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 törzsekkel szemben mind a glükózzal, mind az alfa-ciklodextrinnel kiegészített tápközeg esetében. Szintén Pranckute és munkatársai (2016) bizonyították be azt is, hogy a prebiotikumok lassú emésztése révén szintén jótékony hatással lehetnek a bakteriocin termelésre, hiszen ez gyakran a növekedéssel arányos mértékben jelentkezik. Mandadzhieva és munkatársai (2011) igazolták, hogy tejsavbaktériumok estében az antimikrobás hatás növelhető oligoszacharidok alkalmazásával. Kimutatták, hogy a heterofermentatív *Lactobacillus sakei* S161 jó antimikrobiális aktivitást mutatott, amikor az MRS tápközeget glükóz helyett frukto-oligoszacharid kiegészítéssel alkalmazták. A frukto-oligoszacharidok a prebiotikumok közé sorolhatók. A prebiotikumok nem életképes élelmiszer összetevők, melyeket a probiotikumok szelektíven metabolizálnak, ezzel is javítva a gazdaszervezetre kifejtett jótékony hatás mértékét (Gibson és munkatársai, 2004). Ide sorolhatók a frukto-oligoszacharidok mellett a galakto-oligoszacharidok, vagy a xilo-oligoszacharidok is, melyek hasznosítása befolyásolta az antimikrobiális anyagok termelését az *Enterobacter aerogenes* felvételének rendszere Ahhoz tehát, hogy a probiotikumok legkedvezőbbben hassanak a gazdaszervezetre, ajánlott felhasználásukkor prebiotikumokat is alkalmazni. Ezek alapján vizsgálatuk poszbiotikumok esetében is evidens lehet.

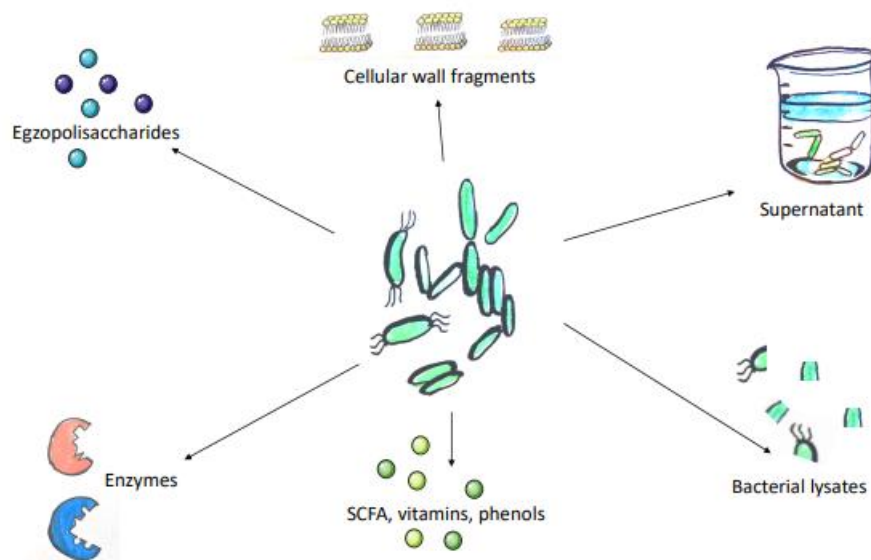
A trehalóz alfa-1,1-glikozidos kötéssel összekapcsolt két glükózegységből kialakult diszacharid. Nem redukáló tulajdonsággal rendelkezik, a szacharózhhoz képest 45%-os relatív édesítő képességgel. A trehalóz egy ozmoprotektáns anyag, amely képes az ozmotikus stresszt korlátozni anélkül, hogy befolyásolná a sejt fiziológiáját, úgy, hogy a citoplazmában felhalmozódik. Ez a poláris tulajdonsága miatt lehetséges (Ding és Wang, 2017). A trehalóz megtalálható a bakteriális sejtfalakban strukturális komponensként.

Az alfa-ciklodextrin egy ciklikus oligoszacharid, amely a keményítő enzimikus lebomlása során keletkezik, a ciklodextrin-glikozil-transzferáz hatására. A molekula hat alfa-1,4 -es

kötésekkel összekapcsolt glükóz alegységből áll, Más anyagok befogadására képes gazdamolekulaként működik. A külső oldalukon hidrofil jellegűek belső felületükön lipofil tulajdonságúak (Scora és munkatársai, 2015). Felhasználása sokszínű, felhasználják a gyógyszeriparban, az élelmiszeriparban kozmetikumok és mosószerek adalékanyagaként is. A ciklodextrineket különböző jótékony élettani hatások jellemzik, mint például antioxidatív hatások, az immunrendszer serkentése (Zhang és munkatársai, 2008), a gyomor-bélrendszer egészségének fenntartása, a patogén vagy a szájüregi plakkbaktériumok mennyiségének csökkentése (Ueno és munkatársai, 2012). Csökkentik a vastagbélrák kialakulásának esélyét, hatásukra a lipid- és glükózanyagcsere szabályozása csökkentett glikémiás reakcióval valósul meg, továbbá elmondható, hogy a koleszterin mennyiségét csökkentik a vérben, és így segítenek a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében, valamint az elhízás és a II. típusú cukorbetegség kialakulásának esélyét is csökkentik. Egyéb jellemzőjük, hogy a gátolják a keményítő retrogradációját, valamint az élelmiszerek érzékszervi tulajdonságait is javítják. Bár ezek az oligoszacharidok is rendelkeznek édesítő képességgel, de emészthetőségük miatt alacsony glikémiás index jellemzi őket. Ez még kedvezőbbé teszi őket a cukorbeteg számára az élelmiszer-adalékanyagoknál való alkalmazásuk során (Pranckute és munkatársai 2016).

### 3.2. Posztbiotikumok

Napjainkban a probiotikumokat széles körben alkalmazzák, mivel jótékonyan hatnak a gazdaszervezet bélmikrobiótájára, ezzel számos betegség kialakulásának kockázatát csökkentik. Alkalmazásuk elengedhetetlen feltétele, hogy a baktériumok életképes állapotba érjék el a cél helyüket (Markowiak és Slizewska, 2017). Ezzel szemben a posztbiotikumok nem életképes, bakteriális termékek, sejtalkotók vagy anyagcsere-termékek, melyek biológiai aktivitással rendelkeznek a gazdaszervezetben, illetve arra pozitív hatással vannak (Aguilar-Toalá és munkatársai, 2018; Patel és Denning, 2013). A posztbiotikumok stabilabbak és ezáltal biztonságosabbak mind gyógyszeripari, mind élelmiszeripari felhasználásra (Barros, és munkatársai, 2020). Ilyen sejtalkotók lehetnek a rövid szénláncú zsírsavak (SCFA), extracelluláris poliszacharidok, sejtízátumok, peptidoglikán származékok, funkcionális fehérjék és enzimek, teikon- és lipoteikonsavak, mikrobiális frakciók (Markowiak és Slizewska, 2017; Wegh és munkatársai, 2017), (2. ábra).



2. ábra: Posztbiotikumok (Zólkiewicz és munkatársai, 2020)

Ezek a sejtalkotók pozitív hatással lehetnek a bélgát funkciójára, ezáltal olyan jótékony hatást fejthetnek ki, mely magába foglalja a vastagbélhámra gyakorolt daganatellenes, illetve gyulladáscsökkentő hatást, valamint ezáltal az immunrendszeri rendellenességek kialakulásának megelőzésében is szerepet játszanak (Gill és munkatársai, 2018; Morrison és Preston, 2016). Ezek tudatában megállapítható, hogy a sejtek életképessége nem szükséges a probiotikum betegségmegelőző tulajdonságainak biztosításához. Ezt igazolják Kamilya és munkatársai (2015) kutatásai, melyben életképes, valamint az elölt *Bacillus subtilis*, illetve

*Bacillus amyloliquefaciens* sejtek (hősokkal, UV fényel, valamint formalinnal feltárt sejtek) esetében, az inaktivált probiotikus sejttermelékek serkentették a sejtes immunválaszt. Ezenkívül Choi és munkatársai (2006), valamint Raman és munkatársai (2016) *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* fajok vizsgálata során arra jutottak, hogy a bennük található nagy mennyiségű szénhidrátot tartalmazó hatóanyagok tumorszuppresszív hatással bírnak.

A posztbiotikumok többféleképpen is képesek antimikrobás hatást kifejteni, például kompetitív módon kötődnek egyes patogén fajok által igényelt receptorhoz, módosítják a gazdaszervezet génextpresszióját. Egy preklinikai modell során igazolták, hogy a posztbiotikumok és probiotikumok kombinációja hatékonyan megakadályozza a rotavírus okozta hasmenést (Rigo-Adrover és munkatársai, 2019). Gyermek egy csoportján végzett randomizált klinikai vizsgálatok során pedig megállapították, hogy a *Lactobacillus paracasei* posztbiotikumot tartalmazó termékek napi bevitele a hasmenés, az akut gasztroenteritisz, a torokgyulladás, a gégegyulladás és a légcsőhurut betegségek kialakulásának csökkenéséhez vezetett (Żółkiewicz és munkatársai, 2020). Továbbá, tanulmányozták a hővel előlt *Lactobacillus reuteri* hatását *Galleria mellonella* fertőzést követően, s megállapították, hogy az élő kontroll csoport, valamint az előlt baktériumot tartalmazó minta hasonló antimikrobás hatással volt a *Porphyromonas gingivalis* kórokozóra (Geraldo és munkatársai, 2019).

### 3.2.1. Sejtlizátum előállítási lehetőségei

A sejtfeltárás módszereit tekintve a szakirodalomban sokfajta megoldás fellelhető. Ezek mindegyike a mikrobák életképességének elvesztésére összpontosít a sejtmembránon okozott sérülés révén (Cuevas-González, 2020). A sejtfeltárási módszerek közül megkülönböztetünk mechanikai (nyíróerő alkalmazása) és nem-mechanikai módszereket (kémiai, fizikai, enzimatis). A mechanikai feltárás könnyen méretezhető és olcsóbb is, így elterjedtebben használják. Ide sorolhatjuk például a nagynyomású homogenizátor, a gyöngymalom, valamint ultraszonikálás használatát. A nem-mechanikai sejtbonthatás sokkal kíméletesebb, valamint szelektív (Dan és munkatársai, 2016). Kamilya és munkatársai (2015) kutatásaik során háromfajta módszert használtak a probiotikus tulajdonságú baktériumok feltárására. Ezek voltak a hősök, az UV fényel való kezelés, valamint a formalin, mint kémiai detergens alkalmazása. A legjobb immunrendszer stimuláló tulajdonságot a hőkezeléssel inaktivált *Bacillus*-ok mutatták. Ezeknek az esetében a hatás még az élő sejtek alkalmazásánál is jobb lett.

Ostad és munkatársai (2009) vizsgálatai kimutatták, hogy a patogén baktériumok bélhámsejtekhez való tapadásának gátlása a *Lactobacillus acidophilus* inaktivált sejtjei által az élő és a hővel inaktivált formák esetében hasonló volt. Egy *in vivo* megközelítés alapján a hőkezelt *Lactobacillus plantarum* b240 törzsének szájon át történő adagolása gátolta a többszervi elégtelenséggel járó szisztémás fertőzést okozó *Salmonella Typhimurium*-mal fertőzött egerekben a kórokozó adhézióját és invázióját a bélsejtekbe (Ishikawa és munkatársai., 2010).

A French Press nagynyomású homogenizátor a sejtek plazmamembránjának megbontására szolgáló készülék, mely azáltal fejt ki hatását, hogy a sejteket egy szűk szelepen keresztül, nagy nyomás alatt vezetik át. Képes a sejtfalak megbontására, miközben a sejtmagot érintetlenül hagyja. A prés egy külső hidraulikus szivattyút használ egy dugattyú meghajtására egy nagyobb hengerben, amelybe a szuszpenziót juttatjuk. A nagy nyomás alatt lévő mintát ezután egy tűszelepen préselik át. Ahogy a minta áthalad a szelepen, a folyadékot nyírófeszültség és dekompresszió éri, hatására a sejtek felbomlanak.

A kémiai sejtfeltárás megvalósítható cetil-trimetil-ammónium-bromiddal (CTAB), mely egy a mindennapi életben gyakran használt felületaktív vegyi anyag, széles körű ipari alkalmazással, például a mosószerekben, gyógyszerekben, kozmetikumokban és textíliákban is elterjedten alkalmazzák (Shachi Tiwari és munkatársai, 2020). Mindezek mellett sejtfeltárássra is kiválóan alkalmazható, többek közt intracelluláris enzim.

### 3.2.2. Posztbiotikumok lehetséges forrásai

#### **Sejtmentes felülűszó**

De Marco és munkatársai (2018) megállapították, hogy a probiotikus metabolitok jó gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatással rendelkeznek. Hatásukat kifejtik a bélhámsejtekben, valamint az immunsejtekben is, azonban eltérő törzsek eltérő mértékben hatnak a gazdaszervezetre. *Lactobacillus casei* és *Lactobacillus rhamnosus* kultúrák sejtmentes felülűszói esetében a szuszpenzió megakadályozza a vastagbélráksejtek elterjedését. A sejtmentes felülűszók tehát hasznosak lehetnek a rákos megbetegedések megelőzésére, mivel *in vivo* módon csökkenteni képesek az oxidatív stresszt és közvetlen tumorelles hatást biztosítanak (Żółkiewicz és munkatársai, 2020).



## **Exopoliszacharidok**

A tejsavbaktériumok növekedésük során különböző tulajdonságú biopolimereket, exopoliszacharidokat választanak ki a tenyészlébe. Ezeket az anyagokat jelenleg is használják az élelmiszeriparban, mint stabilizáló, vízmegkötő, emulgálószeret. Ezen exopoliszacharidok módosíthatják az immunválaszt, mivel képesek kölcsönhatásba lépni a dendritikus sejtekkel és makrofágokkal, ezáltal fokozzák a T- és NK-limfociták proliferációját (Wang és munkatársai, 2018). Tofuból izolált exopoliszacharid, melyet a *Lactobacillus plantarum* termelt, *in vivo* körülmények között nitrogén-oxid szekréciót indukált és fokozta a makrofágok fagocitációs potenciáját. Egy gyümölcsből izolált, *Lactobacillus helveticus* által termelt exopoliszacharid esetében antimikrobás és antioxidáns hatást mutattak ki. Ez a vegyület az uronsav volt, melynek antioxidáns képességét a vasionok megkötése magyarázza (Li és munkatársai, 2014). Továbbá a *Lactobacillus kefiranofaciens* által termelt exopoliszacharid a kefirán, preklinikai vizsgálatok során késleltette a steroszklerózis kialakulását (Uchida és munkatársai, 2010). Állatkísérletek esetén is megállapították, hogy a túl sok koleszterint fogyasztott patkányokban megemelte a vérnyomást és stabilizálta a vércukorszintet (Maeda és munkatársai, 2004). Ezen bizonyítékok által elmondható, hogy az exopoliszacharidok potenciális jelöltek a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésére (Żółkiewicz, 2020). Az exopoliszacharidok egy másik osztályába tartoznak a béta-glükánok, melyek aktiválhatják a makrofágok felszínén lévő Dectin-1 receptorokat, ami által fokozzák az immunválaszt rákos sejtek, baktériumok, vírusok és paraziták esetében is.

## **Rövid szénláncú zsírsavak (SCFA)**

A rövid szénláncú zsírsavak a bélmikrobióta növényi poliszacharidok bontása során keletkező anyagcsere termékei. Ilyen zsírsavak az ecetsav, propionsav vagy a vajsav, melyek részt vesznek a pH csökkentésében, azáltal a kórokozó mikroorganizmusok szaporodásának, valamint karcinogén vegyületek kialakításában szerepet játszó enzimek aktivitásának csökkentésében. Ezen zsírsavak sói fontos energiaforrásként szolgálnak az enterociták számára, amik a bélhám megújításában vesznek részt (Lee és munkatársai, 2017). Az acetátban gazdag étrend segít az enterohemorragiás *E. coli* O157:H7 megelőzésében, ezt egy egerekkel végzett kísérlet során mutatták ki. Ennek magyarázata, hogy az acetát bélgátelzáró tulajdonságának köszönhetően megakadályozza, hogy a toxin a keringésbe juthasson (Fukuda és munkatársai, 2012). Mindezek alapján a rövid szénláncú zsírsavak terápiás alkalmazása jelentős lehet a jövőben.

## **Baktérium lizátumok**

A baktérium lizátumok alkalmazása a bél és immunrendszer funkcionális kapcsolatán alapul. A szájon át elfogyasztott, liofilizált lizátumok eljutnak a vékonybélhez és ott aktiválják a T- és B-limfocitákat, amelyek elkezdik stimulálni az immunrendszert és az IgA termelést (Kearney és munkatársai, 2015). Egy 2018-ban elvégzett metaanalízis kimutatta, hogy azok esetében, akik baktérium lizátum készítményt kaptak szignifikánsan alacsonyabb volt a légúti fertőzések előfordulása, mint a kontrollcsoportban (Yin és munkatársai, 2018). Továbbá, egy két évvel később végzett kutatás azt is megállapította, hogy ezen lizátumok csökkentették a ziháló epizódok és az asztma súlyosbodásának gyakoriságát (de Boer és munkatársai, 2020).

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Anyagok

#### 4.1.1. Mikroorganizmus törzsek

Vizsgálataim során az 1. táblázatban bemutatott *Lactobacillus* törzseket, illetve a 2. táblázatban található kórokozókat alkalmaztam.

**1. táblázat: Probiotikus hatású baktériumok és származásuk**

<b>Probiotikus hatású baktériumok</b>	<b>Származás</b>
<i>Lactobacillus fermentum</i> HA-179	Lallemand Health Solutions
<i>Lactobacillus helveticus</i> R-52	Lallemand Health Solutions
<i>Lactobacillus salivarius</i> HA-118	Lallemand Health Solutions
<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR01	Probiotical S.p.A.

**2. táblázat: Felhasznált patogén tesztörzsek**

<b>Kórokozó baktériumok</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> NCAIM B01312
<i>Escherichia coli</i> 8739
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7
<i>Listeria monocytogenes</i> 4ab
<i>Enterobacter cloacae</i> NCAIM B02073

Ezen törzsek mindegyike az Élelmiszer- mikrobiológia, -higiéncia és -biztonság Tanszék törzsgyűjteményéből származik.

#### 4.1.2. Felhasznált tápközegek

##### MRS táplevesek

A kísérlet elvégzéséhez, valamint a törzsek fenntartásához is MRS tápközeget (De Man Rogosa and Sharpe) használtam (3. táblázat) alapnak, melyet a kísérleti tervnek megfelelően a glükóz szénforrás helyett 1% trehalózzal illetve 1%  $\alpha$ -ciklodextrinnel egészítettem ki.

##### 3. táblázat: MRS tápközeg összeállítása

Összetevők	Mennyiség
Mangán-szulfát	0,05 g
Magnézium-szulfát	0,2 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	2 g
Triammónium-citrát	2 g
Élesztőkivonat	4 g
Húskivonat	8 g
Nátrium-acetát	5 g
Proteóz-pepton	10 g
Dextróz	20 g
Tween 80	1 g
Desztillált víz	1000 ml

Az elkészített táplevest autoklávban steriliztem 121 °C-on 15 percig.

A kórokozó törzsek esetén a törzsfenntartás céljából TSB táplevest készítettem. Ennek összetételét a 4. táblázat tartalmazza.

##### 4. táblázat: TSB tápleves összetétele

Összetevők	Mennyiség
Trypton	15 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Desztillált víz	1000 ml

Az elkészített TSB levest ezt követően autoklávval steriliztem 121 °C-on 15 percig.

## Tápagar

Az antimikrobás hatás vizsgálata TSB agaron történt agardiffúziós módszerrel. A TSB agar összeállítását a 5. táblázat tartalmazza.

**5. táblázat: TSB agar összetétele**

<b>Összetevők</b>	<b>Mennyiség</b>
Tripton	15 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Agar	13 g
Desztillált víz	1000 ml

### **Citrát-foszfát puffer (McIlvaine puffer) pH 3-6**

A pH vizsgálata során a kiindulási pH értékeket citrát-foszfát puffer (McIlvaine puffer) segítségével biztosítottam, mely 0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfát és 0,1 M citromsav oldatok megfelelő arányú összemérésével állítható be a kívánt pH értékre. Az oldatok készítése az alábbiak szerint történt:

A 0,1 M-os citromsav oldat készítéséhez 21,008 g kristályos citromsavat oldottam fel 1 liter desztillált vízben.

A 0,2 M-os dinátrium-hidrogén-foszfát oldat elkészítéséhez pedig 6,302 g vegyszert oldottam fel 1 liter desztillált vízben.

Az értékeket és az előállításukhoz szükséges anyagok mennyiségét a 6. táblázat tartalmazza.

**6. táblázat: pH értékek előállítása**

<b>pH érték</b>	<b>0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfát</b>	<b>0,1 M citromsav</b>
<b>3</b>	20,6%	79,4%
<b>4</b>	38,6%	61,4%
<b>5</b>	51,5%	48,5%
<b>6</b>	63,2%	36,8%

## 4.2. Módszerek

### 4.2.1. Tenyésztési módszerek

A *Lactobacillus* törzseket MRS táplevesben szaporítottam fel 10 ml-es kémcsövekben, 37°C-os termosztálás mellett. A kísérletek lebonyolítása előtt két alkalommal oltottam át a törzseket, a másodikat mindig a vizsgálat tervezett napja előtt 24 órával.

A patogén tesztörzseket TSB táplevesben szaporítottam fel a tejsavbaktériumokkal megegyező körülmények mellett.

### 4.2.2. Fermentáció

A fermentáció a szűkebb értelmezés szerint olyan energia nyerés, mely szerves vegyületek lebontásához kapcsolódik. Tágabb értelmezés szerint a mikroorganizmusok alkalmazása a szerves anyagok lebontására, valamint az enzim katalizálta átalakítása céljából. A fermentáció során a tejsavbaktériumokat 100 ml MRS táplevest tartalmazó lombikokban szaporítottam 37°C-os termosztátban. A fermentáció indítása 1% 24 órás inokulum tenyésztéssel történt. A mintavételezés a fermentációs idő 16., 18., és 20. órájában történt.

### 4.2.3. Sejtek összegyűjtése

A fermentáció során 25 ml mintát vettem, melyből a sejtek kinyerése centrifugával történt. 10 percen keresztül centrifugáltam minden mintát 4 °C-on, 10000 rpm fordulatszám mellett. Ezt követően a felülúszót leöntöttem, majd a sejtörmeléket 3 ml desztillált vízbe szuszpendáltam, majd erős vortexeléssel homogenizáltam. Az így készített sejszuszpenziót alkalmaztam a különböző sejtfeltárási módszerekhez.

### 4.2.4. Sejtfeltárás

Sejtfeltárási módszerek lényege, hogy különböző behatásokkal a sejtek membránját roncsoljuk, ezzel a sejtben található összetevők kiszabadulnak. Ezek közül megkülönböztetünk mechanikai, illetve nem-mechanikai módszereket.

## **Mechanikai módszerek**

*Frech Press nagynyomású homogenizátor:*

A lényege, hogy a sejtszuspenziót egy speciálisan kialakított fojtáson keresztül nyomja át 800 psi nyomáson, ezáltal a folyadékban létrejövő nagy nyomás hatására a sejtek annyira roncsolódnak, hogy a membránjuk szétesik, így kerülnek ki a sejtalkotók a szuspenzióba.

## **Nem-mechanikai módszerek**

*Hő sokk:*

Ezen módszer során a sejtszuspenziót 10 percre 80°C-os vízfürdőbe helyeztem. A hőmérséklet kiválasztásánál figyelembe vettem, hogy a fehérjék 60-100°C között denaturálódnak, a sejtmembrán ezen a hőmérsékleten „megolvad”. Itt a magas hőmérséklet volt a sejtroncsolódás okozója.

*Feltárás kémiai reagenssel:*

Ehhez 0,45 g/l cetil-trimetil-ammónium-bromid oldatot (CTAB) alkalmaztam 1:2 arányban a sejtszuspenzióhoz adva. Ennek hatásmechanizmusának alapja, hogy a CTAB egy amfipatikus vegyület, mely egy apoláris végből és egy poláris fejből áll. Ez teszi lehetővé a vízben oldhatatlan, hidrofób vegyületek, mint például a membránfehérjék vízben való diszpergálását. A reagenst 10 perces hatóidő után 3-szoros desztillált vízzel való átmosás és 10000 rpm-en való centrifugálással távolítottam el.

### **4.2.5. Agardiffúziós módszer**

Az agardiffúziós módszer alapja, hogy TSB agarral történő lemezöntés során a még folyékony, 45°C-ra visszahűtött agarba elkevertem a kórokozó törzseket. Az agar megszilárdulása után egy speciális 8 mm átmérőjű lyukvágóval bemélyedéseket készítettem az agarba, melyekbe 100µl feltárt tejsavbaktérium szuspenziót pipettáztam. A Petri-csészéket a beoltást követően egy órára hűtőszekrénybe helyeztem, majd 24 órán keresztül inkubáltam 37°C-on. Az egy napos inkubálási idő lejárta után a lemezekon az általam vágjt lyukak körül feltisztulási zónákat kerestem, melyek az adott kórokozó elleni antimikrobás hatást mutatták. A feltisztulási zóna mértéke arányos az antimikrobás hatás erősségével, ezek alapján értékeltem az eredményeimet.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Kutatómunkám tárgyául, Csató (2018) probiotikus törzsek antimikrobás anyag termelésére vonatkozó vizsgálatait alapján a legígéretesebbnek bizonyult *Lactobacillus* törzseket - *Lactobacillus fermentum* HA-179, *Lactobacillus helveticus* R-52, *Lactobacillus salivarius* HA-118, *Lactobacillus crispatus* LCR01 - választottam. A bakteriocin termelésének indukálására Nagyfejeő (2018) di- és oligoszacharidokat alkalmazott. Kutatásaiban a tejsavbaktériumokat MRS táplevesben történő felszaporítása során a D-glükózt trehalózra, illetve  $\alpha$ -ciklodextrinre cserélte 1%-os koncentrációban. Mindezek alapján a bakteriocin termelésben ígéretes komponensek jelenlétében felszaporított, majd különböző módszerekkel inaktivált tejsavbaktérium sejtenyészetek antimikrobás hatását vizsgáltam.

### 5.1. MRS tápközegben szaporított tejsavbaktériumok antimikrobás hatása

A kutatás első szakaszában oligoszacharid indukálás nélkül, MRS tápközegben vizsgáltam a 4 probiotikus *Lactobacillus* törzs különböző módszerekkel feltárt sejteinek antimikrobás hatását. A 16., 18., 20. órát követően a három sejteltérési módszerrel – kémiai detergenses kezelés, hőkezelés, French Press homogenizátor- elvégeztem a sejten belüli összetevők kiszabadítását. Ezt követően a mintákat öt fajta kórokozó apatogén törzsével szemben agardiffúziós módszerrel vizsgáltam. A feltisztulási zónák mértékét az 7. táblázat tartalmazza.

**7. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus fermentum* HA-179 antimikrobás hatása

Vizsgált törzsek	Feltárás módja								
	Hővel előlt			Kémiai módszer			French Press		
	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-	+++	++	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	++	++++	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna



A *Lactobacillus fermentum* HA-179 tejsavbaktérium esetében elmondható, hogy a legjobb antimikrobás hatást az *Escherichia coli* O157:H7, illetve a *Listeria monocytogenes* 4ab ellen mutatta, ahol 1-1,5 cm feltisztulási zónák alakultak ki, a CTAB-vel való kezelés hatására, 18 és 20 órás fermentációs idő eltelte után. Az *Escherichia coli* 8739 esetében csak egy esetben alakult ki feltisztulási zóna, mely a kémiai detergenssel való kezelést követően, 18 órás fermentációs idő eltelte után volt látható, viszont ebben az esetben 1 cm feltisztulási zóna képződött az adott agarlyuk körül. Az *Enterococcus faecalis* és az *Enterobacter cloacae* esetében csak 0,5 cm-es feltisztulási zónák képződtek, mindkettő esetében csak a CTAB oldatos kezelés után, 18 órás fermentációs időt követően. A többi esetben, ahogyan azt az 7. táblázat is mutatja, nem alakult ki feltisztulási zóna.

A *Lactobacillus helveticus* R-52 esetében elért eredményeket a 8. táblázatban foglaltam össze. Az egyetlen sejtfeltérési módszer, amelynél antimikrobás hatást értem el, a kémiai vegyülettel való kezelés volt. Ezen tejsavbaktérium törzs esetében mindegyik általam vizsgált kórokozó ellen kirajzolódott feltisztulási zóna, eltérő mértékben. A legjobb gátló hatás az *Escherichia coli* O157:H7 törzs ellen mutatkozott, melyet mindhárom vizsgált fermentációs idő esetében (16, 18, illetve 20 óra) megfigyeltem, ezek közül is a legnagyobb mértékben a 18 órás inkubációs idő után. Az optimális fermentációs időnek a 16 óra látszódott, ugyanis ebben az időben minden általam vizsgált patogénnel szemben kialakult gátló hatás.

**8. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus helveticus* R-52 antimikrobás hatása MRS táplevesben fermentálva

Törzsek	Hővel előlt			Kémiai módszer			French Press		
	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	++	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	-	++	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	++	+++	++	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	++++	-	+	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	++	-	++	-	-	-

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

A kísérletet elvégeztem *Lactobacillus salivarius* HA-118 tejsavbaktériummal is, melynél a kémiai úton megvalósított kezelés volt a leghatásosabb sejtfeltérési módszer az antimikrobás

hatás kimutatására. Ennél a törzsnél a feltisztulási zóna detektálható volt 16 órás fermentáció után a hővel feltárt sejtek esetén az *Enterobacter cloacae* kórokozóval szemben, illetve a 16 és 18 órás fermentáció után a nagynyomású homogenizátorral végzett kezelés eredményeképp az *Enterococcus faecalis* esetében is. Ezek mértéke a CTAB oldattal végzett feltáráshoz képest kisebb volt. A feltisztulási zónák legnagyobb mértékben a 20 órás fermentációt követően jelentek meg, ezek közül is a legkiterjedtebb zóna az *Escherichia coli* O157:H7 törzssel szemben alakult ki. Ezen kórokozó esetében mindhárom fermentációs idő mellett megfigyelhető volt a növekedés gátlása, eltérő mértékben. A kísérlet eredményeit a 9. táblázat tartalmazza.

**9. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus salivarius* HA-118 antimikrobás hatása MRS táplevesben fermentálva

Törzsek	Hővel előlt			Kémiai módszer			French Press		
	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	+	+	+++	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	++	-	++	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

A *Lactobacillus crispatus* inaktivált sejtalkotóinak vizsgálata során, keletkezett a legkisebb számú és mértékű feltisztulási zóna, mely eredményeket a 10. táblázatban foglaltam össze. Megállapítható, hogy ebben az esetben is a kémiai úton történő sejtfeltárás bizonyult a leghatásosabbnak. Ezek mellett a 20 órás minta hővel történő feltárása esetében volt antimikrobás hatás detektálható a *Listeria monocytogenes* patogénnel szemben. A 18, illetve 20 órás fermentációt követően végzett CTAB oldatos feltárással hatására az *Escherichia coli* O157:H7-es törzssel szemben alakult ki feltisztulási zóna.

**10. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus crispatus* LCR01 antimikrobás hatása MRS táplevesben fermentálva

Törzsek	Hővel előlt			Kémiai módszer			French Press		
	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	++	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

Az első kutatási vizsgálatokból megállapítható volt, hogy az általam vizsgált patogén baktériumok közül a legtöbb esetben az *Escherichia coli* O157:H7 apatogén törzssel szemben alakult ki antimikrobás hatás. Ezen kórokozó az egyetlen ismert *Escherichia coli* törzs mely már kis mértékben is humán patogén, így a kapott eredmények, vagyis szaporodásuk gátlása posztbiotikummal ígéretes.

Elmondható, hogy szinte minden esetben a leghatékonyabb sejtfeltárási módszernek a kémiai úton megvalósított kezelés bizonyult. Ezen módszerrel az összes, általam vizsgált tejsavbaktérium gátolta legalább egy kórokozó szaporodását. Második leghatásosabbnak a vizsgált sejtfeltárási módszerek közül a hőkezelés bizonyult. A French Press nagynyomású homogenizátorral feltárt sejtek túlzó többsége nem mutatott antimikrobás hatást, így alkalmazása nem bizonyult megfelelőnek. Használata csak a *Lactobacillus salivarius* HA-118 esetében az *Enterococcus faecalis* kórokozóval szemben volt hatásos.

Fermentációs idő tekintetében vegyes eredményeket kaptam a 16 és 20 óra között megvalósított fermentációk esetén, így ezekből következtetést még nem tudtam levonni.

## 5.2. Trehalózos tápközegben felszaporított tejsavbaktériumok antimikrobás hatása

Chen és munkatársai (2007) négyfajta szénhidrát hatását vizsgálták a bakteriocin termelés megfigyelése végett. Kísérleteik során megfigyelték, hogy trehalóz, mint szénforrás kizárólagos használata mellett megnövekedett mértékben alakult ki gátló hatás, az általuk vizsgált patogén baktériumokkal szemben *Lactobacillus sakei* JMC 1157T törzs esetén. Ezen tapasztalatok birtokában, a következőkben a tejsavbaktériumokat 1% trehalózt tartalmazó tápközegben fermentáltam. A tápközeg összetételének alapja az MRS tápleves, melyben a glükózt trehalózra cseréltem. Mivel az előző kísérlet során a mechanikai feltárás nem bizonyult hatékonynak, így csak kétfajta módszerrel dolgoztam tovább, hővel és kémiai úton inaktiváltam a felszaporított sejteket.

A kísérlet során a *Lactobacillus fermentum* az adott, 1% trehalózt tartalmazó tápközegben nem tudott elszaporodni, így ezzel a baktériummal nem tudtam elvégezni a vizsgálatokat. Ennek az oka lehet, hogy ez a tejsavbaktérium nem tudta szénforrásként hasznosítani a trehalózt, így a nem megfelelő körülmények hatására a sejtek nem voltak képesek elszaporodni a 20 órás fermentáció során.

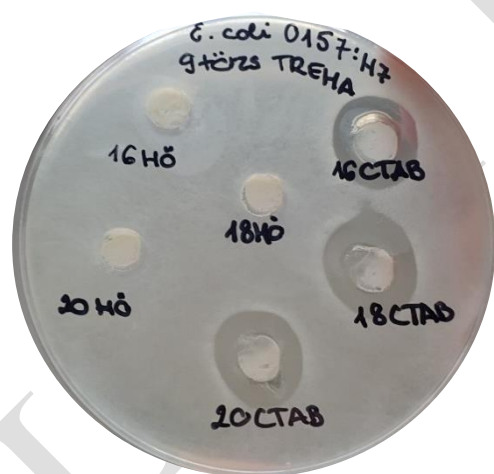
A *Lactobacillus helveticus* R-52 esetében a trehalózos közegben felszaporított sejtek kémiai reagenssel való kezelését követően a feltárt sejtek eltérő mértékben, de minden esetben antimikrobás hatást mutattak az általam vizsgált kórokozókkal szemben. A hőkezeléssel inaktivált tejsavbaktérium nem mutatott detektálható feltisztulási zónát egyik kórokozóval szemben sem. A feltisztulási zónák mértéke az *Escherichia coli* O157:H7 törzs ellen volt a leglátványosabb. Ezen kórokozóval szemben az antimikrobás hatás az idő előrehaladtával lineárisan csökkent, mértéke a 16 órás minta esetében volt a legnagyobb kb. 1,5 cm, míg 20 óránál a legkisebb 0,5 cm körüli. A többi kórokozó esetén a gátló hatás szintén ez utóbbi mértékű és egyenletes a vizsgált 16-20 óra közötti időtartamban. Az eredményeket táblázatba foglalva az 11. táblázat tartalmazza.

**11. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus helveticus* R-52 antimikrobás hatása 1% trehalóz tartalmú MRS táplevesben fermentálva

Törzsek	Hővel előlt			Kémiai módszer		
	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	+++	++	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	+

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

A *Lactobacillus salivarius* HA-118 törzs a trehalózos tápközegben való felszaporítás, majd inaktiválás után hasonló eredményt mutatott, mint a *Lactobacillus helveticus*. Ebben az esetben is a CTAB oldatos sejtfeltérési módszerrel feltárt sejtek egy kivétellel minden esetben antimikrobás hatást mutattak. Az egyetlen kivétel a 20 órás fermentációs idő utáni feltérést követően volt, az *Enterococcus faecalis* ellen, ebben az esetben nem jelent meg feltisztulási zóna.



**3. ábra:** *Lactobacillus salivarius* HA-118 különböző 16, 18, illetve 20 óra fermentáció után az *Escherichia coli* O157:H7 patogénnel szemben.

A legintenzívebb gátlás az *Escherichia coli* O157:H7-es törzssel szemben alakult ki. Ezen kórokozón kívül még jelentős gátló hatást mutattak a sejtlyizátumok az *Escherichia coli* 8739 szemben is, valamint a *Listeria monocytogenes* esetében is. Az *Enterobacter cloacae*-vel szemben egyenlő, kisebb mértékű zónák keletkeztek a vizsgált órákban. A vizsgálat eredményeit a 12. táblázat tartalmazza. A feltisztulási zóna remekül megfigyelhető a 3. ábrán.

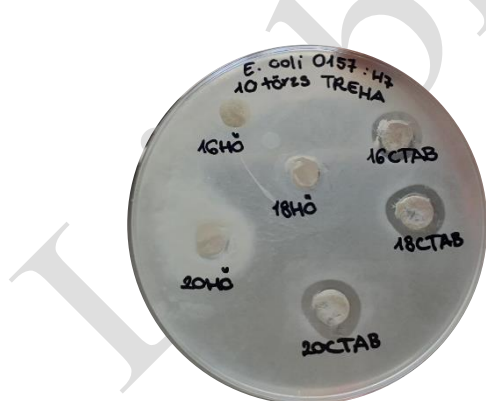
**12. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt

*Lactobacillus salivarius* HA-118 antimikrobás hatása 1% trehalóz tartalmú MRS táplevesben fermentálva

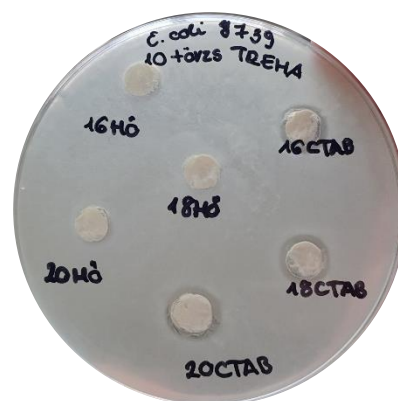
Törzsek	Hővel előlt			Kémiai módszer		
	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	-	++	+++	++
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	++	++	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	+

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

A *Lactobacillus crispatus* tejsavbaktériummal elvégzett vizsgálatok alapján is a kémiai sejtfeltárási módszer a legalkalmasabb trehalózt tartalmazó tápközegben való sejtiszaporítást követően az antimikrobás hatás detektálására. Az eredmények alapján ezen baktérium is az *Escherichia coli* O157:H7 kórokozó törzssel szemben mutatja a legnagyobb mértékben az antimikrobás hatást, ám ebben az esetben az *Enterococcus faecalis* kórokozó ellen is jelentős gátlási zóna volt megfigyelhető. Az *Escherichia coli* O157:H7, valamint az *Escherichia coli* 8739 baktériumokra gyakorolt antimikrobás hatás a 4. és 5. ábrákon került bemutatásra. Az eredményeket a 13. táblázat tartalmazza.



**4. ábra:** *L. crispatus* hővel történő feltárása (bal), illetve CTAB oldatos kezelése (jobb), 16,18,20 óra fermentáció után, *E. coli* O157:H7-es patogénnel szemben, 1%-os trehalóz tartalmú MRS levesben fermentálva



**5. ábra:** *L. crispatus* hővel történő feltárása (bal), illetve CTAB oldatos kezelése (jobb), 16,18,20 óra fermentáció után, *E. coli* 8739-es patogénnel szemben, 1%-os trehalóz tartalmú MRS levesben fermentálva

**13. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus crispatus* LCR01 antimikrobás hatása 1% trehalóz tartalmú MRS táplevesben fermentálva

Törzsek	Hővel előlt			Kémiai módszer		
	16 óra	18 óra	20 óra	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+	+

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

A három tejsavbaktériummal elvégzett vizsgálat után kijelenthető, hogy az 1% trehalózt tartalmazó MRS tápközegben felszaporított tejsavbaktériumok esetében a legjobb antimikrobás hatás elérése érdekében javasolt kémiai módszert alkalmazni. Az általam használt CTAB oldatos sejtfeltárást követően 1% trehalózt tartalmazó MRS tápközegben a minták közel 98%-a mutatott antimikrobás hatást az általam vizsgált kórokozó törzsekkel szemben. Ezzel ellentétben a hővel való előlés egyetlen esetben sem eredményezett detektálható gátló hatást.

A kórokozó törzsek közül a legtöbb feltisztulási zóna az *Escherichia coli* O157:H7-es törzs esetében alakult ki. A második legnagyobb mértékű gátló hatást az *Enterococcus faecalis*, illetve az *Escherichia coli* 8739 törzsek ellen fejtették ki a vizsgált posztbiotikumok. A *Listeria monocytogenes*, valamint az *Enterobacter cloacae* esetében is kialakult az antimikrobás hatás, viszont csak kisebb mértékben.

A fermentációs idő hatásának értékeléseként megállapítható, hogy a 18 és 20 órás felszaporítás után intenzívebb feltisztulási zónák jelentek meg.

### 5.3. $\alpha$ -Ciklodextrint tartalmazó tápközegben felszaporított tejsavbaktériumok antimikrobás hatása

Nagyfejő (2018) szakdolgozata alapján az antimikrobás hatás fokozható különféle szénforrások alkalmazásával, mint az  $\alpha$ -ciklodextrin, ezen okból érdemes lehet ezt a területet is megvizsgálni a posztbiotikumok esetében. Ezért is választottam következő kísérletnek az 1%  $\alpha$ -ciklodextrines MRS tápközéget fermentációs tápközegként a tejsavbaktériumok felszaporításához. Ezen kísérletsorozat alkalmával már csak kémiai kezelést alkalmaztam, a 16, 18, illetve 20 órás felszaporítás során vett minták esetén.

A *Lactobacillus fermentum* sejtjeinek CTAB oldatos feltárását követően megállapítható volt, hogy az általam vizsgált kórokozók közül egy kivételével mindegyik ellen kialakult a gátló hatás. Leghatásosabbnak bizonyult a *Listeria monocytogenes* patogén ellen, amely esetén mindhárom vizsgált órában megfigyelhető a feltisztulási zóna, továbbá az is megállapítható volt, hogy a fermentációs idő növekedésével az antimikrobás hatás is nő ezen kórokozó ellen. Az *Enterococcus faecalis*, valamint az *Escherichia coli* 8739 törzsek ellen hasonló reakció jött létre, mindkét esetben a későbbi órákban kezdett kialakulni gátló hatás, az idő előrehaladtával növekvő mértékben. A fermentációs idő és az antimikrobás hatás növekedése megfigyelhető volt az *Enterobacter cloacae* esetében is, ennél csak 20 óra fermentáció után alakult ki feltisztulási zóna. Az egyetlen kórokozó, mely ellen nem volt gátló hatása a sejtlyázatumnak az az *Escherichia coli* O157:H7 törzs volt. Az eredményeket a 14. táblázat tartalmazza.

**14. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus fermentum* HA-179 antimikrobás hatása 1%  $\alpha$ -ciklodextrin tartalmú MRS táplevesben fermentálva

Törzsek	Feltisztulási zónák		
	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	++
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	+	++
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	++	+++
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

Az  $\alpha$ -ciklodextrint tartalmazó tápközegben felszaporított *Lactobacillus helveticus* tejsavbaktérium esetében elért eredményeket a 15. táblázat tartalmazza. Megállapítható, hogy az *Escherichia coli* O157:H7, valamint az *Enterobacter cloacae* törzsekkel szemben nem alakul ki a gátló hatás a 16, 18, illetve 20 órás fermentációs idő egyikében sem. Továbbá elmondható, hogy az *Enterococcus faecalis* és a *Listeria monocytogenes* esetében megegyező mértékűek a feltisztulási zónák minden vizsgált órában. Az *Escherichia coli* 8739-es törzse esetében a 16 órás fermentációs idő után kisebb, még a 18 és 20 órás fermentáció után megegyezően nagyobb mértékben volt antimikrobás hatás detektálható.



**15. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus helveticus* R-52 antimikrobás hatása 1%  $\alpha$ -ciklodextrin tartalmú MRS táplevesben fermentálva

Törzsek	Feltisztulási zónák		
	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	++
<i>Escherichia coli</i> 8739	+	++	++
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	++	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

A *Lactobacillus salivarius* esetében a legintenzívebben az *Enterococcus faecalis* kórokozó ellen alakult ki gátló hatás, továbbá megfigyelhető volt a fermentációs idő előrehaladtával a növekedő feltisztulási zóna mértéke is. Ezen tejsavbaktérium esetében az *Escherichia coli* 8739-es, valamint az *Enterobacter cloacae* kórokozó ellen megegyezően, csak a 20 órás fermentációt követően alakult ki kisebb mértékű feltisztulási zóna. A *Listeria monocytogenes*, valamint *Escherichia coli* O157:H7 kórokozó ellen nem látható semmilyen mértékű gátló hatás. Az eredményeket a 16. táblázat tartalmazza.

**16. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus salivarius* HA-118 antimikrobás hatása 1%  $\alpha$ -ciklodextrin tartalmú MRS táplevesben fermentálva

	Feltisztulási zónák		
	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

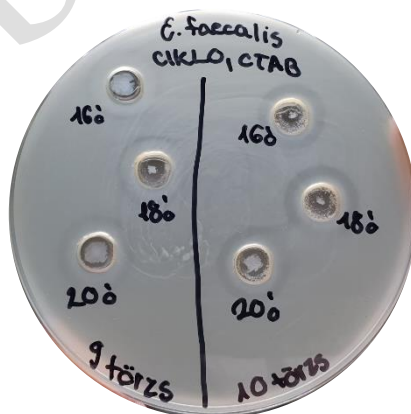
A *Lactobacillus crispatus* sejtfeltárását követően megállapítható volt, hogy ez az a tejsavbaktérium, amely  $\alpha$ -ciklodextrint tartalmazó tápközegben a leghatásosabb a vizsgált kórokozókkal szemben. A legjelentősebb gátló hatás a 20 órás fermentációt követően alakult ki, ekkor mindegyik patogénnel szemben megfigyelhető az antimikrobás hatás. A legintenzívebb feltisztulási zóna az *Enterococcus faecalis* ellen keletkezett, a 16 órás fermentáció után csak közepes mértékben, míg a 18, illetve 20 óra fermentációt követően 1,5 cm-nél nagyobb feltisztulási zóna volt látható. A *Listeria monocytogenes*, illetve az *Enterobacter cloacae* törzsek ellen hasonló hatás mutatkozott. Mindkét patogén esetében a 16 óra eltelte után csak kisebb mértékű, míg a 18 és 20 óra eltelte után pedig közepes méretű zónák keletkeztek. Az *Escherichia coli* 8739-es törzssel szemben 16 óránál még nem alakult ki gátló hatás, viszont a fermentációs idő előrehaladtával megjelentek közepes nagyságú feltisztulási zónák. Az *Escherichia coli* O157:H7-es törzs ellen csak a 20 óra fermentációs időt követően látható gátló hatás. Ezen baktérium eredményeit a 17. táblázat tartalmazza.

**17. táblázat:** MRS táplevesben felszaporított és különböző módszerekkel feltárt *Lactobacillus crispatus* LCR01 antimikrobás hatása 1%  $\alpha$ -ciklodextrin tartalmú MRS táplevesben fermentálva

	Feltisztulási zónák		
	16 óra	18 óra	20 óra
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i> 8739	-	++	++
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	++	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	++	++

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

Összegzésként elmondható, hogy az 1%  $\alpha$ -ciklodextrint tartalmazó MRS táplevesben felszaporított *Lactobacillus* törzsek esetében is megfigyelhető az antimikrobás hatás kialakulása. Az *Enterococcus faecalis* ellen kialakult gátló hatás minden vizsgált tejsavbaktériumnál, minden mintavételi időpontban megfigyelhető volt, egy kivétellel, a *Lactobacillus fermentum* 16 órás fermentációját követően. Továbbá elmondható, hogy az *Escherichia coli* O157:H7 törzs kivételével mindegyik kórokozó törzs esetében jelentős gátlást mutattam ki.. A fermentációs idő tekintetében megállapítható, hogy a 18 és 20 órás fermentációt követően alakultak ki a feltisztulási zónák. Ez látható az 6. ábrán.



**6. ábra:** *Lactobacillus salivarius* (bal oldal), illetve *Lactobacillus crispatus* (jobb oldal) az *Enterococcus faecalis* kórokozóval szemben, 16 (16ó), 18 (18ó), valamint 20 (20ó) óra fermentációs idő elteltével kialakult feltisztulási zónák.

A vizsgálatok elvégzése után megállapítható, hogy a különböző szénforrású tápközegek alkalmazása a törzsek felszaporítása során eltérő mértékű gátló hatást biztosít. A kísérleteim után arra a megállapításra jutottam, hogy az 1% trehalózt tartalmazó MRS táplevesben felszaporított *Lactobacillus* törzsek képesek legjobban a vizsgált kórokozó törzsek elleni antimikrobás hatás biztosítására. A fermentációs idő optimálisan 18 vagy 20 óra. A sejtfeltárási módszerek közül egyértelműen a kémiai kezelés bizonyult a leghatásosabbnak.

Felvetődött a CTAB oldat használhatósága, illetve annak esetlegesen tévesen okozott antimikrobás hatása. Ezen gond kiküszöbölése céljából kísérleteket végeztem, melyekben a felhasználást követő kimoshatóság hatásfokát vizsgáltam. A kísérlethez a MRS tápközegben felszaporított *Lactobacillus fermentum* tejsavbaktériumot használtam, s 18 óra fermentációs időt követően CTAB oldattal tártam fel a sejteket. A kontroll mintákat a sejtfeltárási folyamatának gyakorlata szerint háromszor mostam át desztillált vízzel, míg a vizsgált mintáknál csak kétszeres desztillált vizes atmosférával kezeltem, amik között 10 perces centrifugálással ülepítettem ki a sejtalkotókat. Agardiffúziós módszerrel különböző kórokozókra gyakorolt gátló hatást vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a kétszeres atmosféra követően sem figyelhetők meg nagyobb feltisztulási zónák a vizsgálat során, vagyis nem a feltáráshoz használt CTAB oldat jelenléte gátolja a kórokozók szaporodását.

#### 5.4. Kiindulási pH hatása az antimikrobás hatás mértékére

A továbbiakban az antimikrobás hatás fokozása érdekében, a kiindulási pH változtatásának hatását vizsgáltam a gátló anyag termelődésének mértékére. A pH beállítása Megfelelő pH értékű (pH 3, pH 4, pH 5, pH 6) citrát-foszfát pufferrel készített MRS táplevesben történt meg a sejtek felszaporítása, kontrollként a desztillált vízzel készített minta szolgált. Az előző kísérletek eredményeként megállapított paraméterekkel dolgoztam, ennek értelmében a *Lactobacillus helveticus* és *Lactobacillus salivarius* törzseket 1% trehalózt tartalmazó MRS táplevesben fermentáltam 18 órán keresztül, majd CTAB oldattal tártam fel a sejteket. A *Lactobacillus helveticus* és *Lactobacillus salivarius* tejsavbaktérium sejtlyizátum általi gátlásának eredményeit a 18. táblázat tartalmazza.

**18. táblázat:** Feltisztulási zónák a kiindulási pH változtatásával

	<i>Lactobacillus helveticus</i>					<i>Lactobacillus salivarius</i>				
Sejtfeltárási módszer	CTAB					CTAB				
Tápközeg	1 % TREHALÓZ					1% TREHALÓZ				
Inkubációs idő	18 óra					18 óra				
pH	3	4	5	6	K	3	4	5	6	K
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	++	+	++	++	+++	++	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 8739	++	-	+	+++	++	+++	+	++	+	++
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	++	+	+	++	+++	+++	+	++	+	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 4ab	+	-	+	++	++	+	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	++	++	++	+	+	+	+

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna, „+++” 1,5 cm feltisztulási zóna

A táblázatból kiolvasható, hogy a gátló hatás fokozható a tápközeg kiindulási pH értékének szabályozásával. A kontroll mintákhoz viszonyítva a *Lactobacillus salivarius* esetében a 3-as pH-n történő fermentáció volt a leghatásosabb a gátló anyag termelődésének szempontjából. Ezen a pH-n jelentős gátló hatás alakult ki az *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* 8739, valamint az *Escherichia coli* O157:H7-es törzse ellen is. Továbbá ezen tejsavbaktérium esetében 4-es pH mellett szintén az *Enterococcus faecalis* ellen mutatkozott nagyobb feltisztulás.

A *Lactobacillus helveticus* esetében a pH 6-os kémhatás mellett mutatkozott intenzívebb feltisztulási zóna az *Escherichia coli* 8739-es törzssel szemben. Ugyan ezen kórokozóval szemben pH 3 esetén hasonló eredmény született, míg a többi, pH 4 és pH 5 értékek esetében csökkent a gátló anyag mennyisége a kontroll mintához képest. Az eredményekből látszik, hogy mindkét tejsavbaktérium esetében szinte minden kórokozó ellen pH állítás esetén, a *Lactobacillus helveticus* esetén pH 6, míg a *Lactobacillus salivarius*-nál pH 3 érték mellett jelentősebb gátló hatás alakult ki, mint a kontroll mintáknál. Ez alól mindkét esetben a kivétel a *Listeria monocytogenes* patogén, ugyanis ennél a pH állított és a kontroll minták között nem volt jelentős különbség. A feltisztulási zónák detektálása mellett vizsgáltam a tenyésztések pH értékét is. Az eredmények a 19. táblázatban láthatók. A 18 óra fermentáció elteltével a pH értékek alakulásából látható, hogy az antimikrobás gátlás kialakulásáért nem feltétlen a savas jelleg felelős.

19. táblázat: 18 óra fermentáció utáni pH értékek

Kiindulási pH érték	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
3,00	4,16	4,47
4,00	4,50	4,70
5,00	4,87	4,92
6,00	6,31	5,90
K	4,73	4,69

A *Lactobacillus helveticus* 6 -os kiindulási pH-ja a fermentációs idő végére nem csökkent, mégis ebben az esetben alakult ki a legintenzívebb feltisztulási zóna az *Escherichia coli* 8739-es patogénnel szemben, ami még a kontroll mintánál is nagyobbak bizonyult. Hasonló hatás figyelhető meg a többi esetben is, hiszen a kiindulási pH a 18 órás fermentáció után sehol nem csökkent olyan mértékben (pH 3-4 értékre), hogy önmagában a kórokozó gátlását okozta volna. Az antimikrobás hatást serkentette a 3 körüli pH érték, azonban fermentáció után ebben az esetben is 4 körüli pH volt tapasztalható. Továbbá a *Lactobacillus helveticus* 6-os kiindulási pH-ja fermentációt követően közel semleges lett, gátló hatást mégis kiváltott a patogénekkal szemben. Ezáltal bizonyítható, hogy a gátlás kifejtéséért a posztbiotikumok felelősek.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataim során a probiotikus baktériumok (*L. helveticus* R-52, *L. crispatus* LCR01, *L. salivarius* HA-118, *L. fermentum* HA-179) posztbiotikumként való alkalmazását vizsgáltam eltérő szénforrású közegben, különböző fermentációs idő és sejtfeltárási módszerek, illetve a tápközeg különböző kiindulási pH értékei mellett, kórokozó törzsek (*Enterococcus faecalis* NCAIM B01312, *Escherichia coli* 8739, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4ab, *Enterobacter cloacae* NCAIM B02073) ellen.

A vizsgált sejtfeltárási módszerek közül (kémiai kezelés, hősokk, French Press nagynyomású homogenizátor használata) egyértelműen megállapítható volt, hogy mindegyik szénforrás (dextróz, trehalóz, alfa-ciklodextrin) alkalmazása mellett a leghatásosabb a kémiai feltárási volt. Ezt CTAB oldattal valósítottam meg, és mivel kérdéses volt az anyag kimoshatóságának feltétele, külön vizsgálatot készítettem ebben a témában is. Ebből megállapítottam, hogy az általam is alkalmazott háromszoros átmosás megfelelően eltávolítja a szuszpenzióból a kémiai oldatot. A kémiai oldat alkalmazhatósága gazdaságosabb a French Press homogenizátor használatánál, így ebből a szempontból is megfelelőnek bizonyult a módszer. A hővel való sejtfeltárási esetén nem tapasztaltam minden tápközeg esetében gátló hatást, ezért ez a módszer az általam alkalmazott módon nem alkalmas a posztbiotikumok kinyerésére.

A tápközegben lévő szénforrás esetében arra a megállapításra jutottam, hogy legjobb hatás 1% trehalóz tartalmú glükóz mentes MRS tápleves alkalmazása mellett érhető el. Ezen tápközeg esetében a *L. fermentum* HA-179 nem szaporodott, de a *L. helveticus* R-52, *L. salivarius* HA-118, illetve a *L. crispatus* LCR01 tejsavbaktériumok kiemelkedő gátló hatást mutattak. Ez az tapasztalat megegyezik a Chen és munkatársai (2007) kutatása során tapasztalt eredményekkel.

A fermentációs idő optimális hosszát 18 órában állapítottam meg. Ezen idő leteltekor alakult ki a legnagyobb mértékű gátlási zónák a legtöbb esetben.

Az antimikrobás hatás fokozása érdekében, a kiindulási pH változtatásának hatását is vizsgáltam a gátló anyag termelődésének mértékére *L. helveticus* R-52 és a *L. salivarius* HA-118 esetében 1% trehalózt tartalmazó tápközegben. Ezen értékekből látszott, hogy a pH nem csökkent le olyan szintre, hogy az önmagában gátló hatást váltson ki a patogén mikroorganizmusokból, ezáltal elmondható, hogy nem ez felelős az általam tapasztalt feltisztulási zónákért. A *L. helveticus* R-52 esetében az optimális kiindulási pH érték a 6-os

volt, ebben az esetben volt, hogy a kontroll mintához képest nagyobb kiterjedésű zónák jöttek létre.

Összefoglalva a kísérletek elvégzése és az eredmények kiértékelése során arra a megállapításra jutottam, hogy a választott *Lactobacillus* törzsek közül három - *L. helveticus* R-52, *L. salivarius* HA-118, *L. crispatus* LCR01 - esetében az általam vizsgált kórokozókkal szemben a mikroorganizmus sejtalkotói is antimikrobás hatást gyakorolnak. A gátló hatás fokozásához javasolt 1%-os trehalózos tápközeget alkalmazni, illetve a CTAB oldatos kezelés a leghatékonyabb a sejteltávolítás során. Kísérleteim alátámasztják, hogy a posztbiotikum alkalmazása ígéretes kórokozó mikroorganizmusok elleni gátló hatás biztosítására.



## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Ambalam, P., Raman, M., Purama, R. K., & Doble, M. (2016): Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 30(1), 119-131.
- Barros, C. P., Guimaraes, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., Cruz, A. G. (2020): Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1-8.
- Both E. (2018): Probiotikus tulajdonsággal rendelkező tejsavbaktériumok antibakteriális hatása, *Műszaki Szemle* 72/2018,
- Chen, Y. S., Sriornual, S., Onda, T., & Yanagida, F. (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Letters in applied microbiology*, 45(2), 190-193.
- Cuevas-González P.F., Liceagab A.M., Aguilar-Toaláb J.E., (October 2020): Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications, *Food Research International*, 136 109502
- Csató, B. Z. (2018.): Probiotikus *Lactobacillus* törzsek bakteriocin termelésének és indukálhatóságának vizsgálata. Szakdolgozat, Budapest
- Deák T., Kiskó G., Maráz A., Mohácsiné F. Cs. (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*  
<https://docplayer.hu/3748205-Elelmiszer-mikrobiologia-deak-tibor-kisko-gabriella-maraz-anna-mohacsine-farkas-csilla.html>
- de Boer, G.; Żółkiewicz, J.; Strzelec, K.; Ruszczyński, M.; Hendriks, R.; Braunstahl, G.; Feleszko, W.; Tramper-Stranders, G. (2020): Bacterial lysate add-on therapy for the prevention of wheezing episodes and asthma exacerbations: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. Rev.*, in press
- de Marco S., Sichetti M., Muradyan D., Piccioni M., Traina G., Pagiotti R., Pietrella D., (2018): Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 1756308, 12 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/1756308>

- Escamilla, J.; Lane, M.A.; Maitin, V. (2012): Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutr. Cancer*, 64, 871–878.
- Feng T., Wang J. (2020): Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review, *Gut Microbes*, 12:1, DOI: 10.1080/19490976.2020.1801944
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization [online], [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)
- French Press homogenizátor. <https://www.glenmills.com/product/french-press-g-m-high-pressure-cell-disruption/>
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H., & Hattori, M. (2012). Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut microbes*, 3(5), 449-454.
- Geraldo, B. M. C., Batalha, M. N., Milhan, N. V. M., Rossoni, R. D., Scorzoni, L., Anbinder, A. L. (2019): Heat-killed *Lactobacillus reuteri* and cell-free culture supernatant have similar effects to viable probiotics during interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 55(2), 215–220
- Gill, P. A., Van Zelm, M. C., Muir, J. G., & Gibson, P. R. (2018). Short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 48(1), 15-34.
- Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A.C., (2004): Probiotics, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 2, 299-313
- Kamilya, D., Baruah, A., Sangma, T., Chowdhury S., Pal P., (2015): Inactivated Probiotic Bacteria Stimulate Cellular Immune Responses of Catla, *Catla catla* (Hamilton) In Vitro. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 7, 101–106. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9191-9>
- Kearney, S.C.; Dziekiewicz, M.; Feleszko, W. (2015): Immunoregulatory and immunostimulatory responses of bacterial lysates in respiratory infections and asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol*, 114, 364–369.

- Lee C., Kim B G, Kim J. H., Chun J., Im J. P., Kim J. S., (2017): Sodium butyrate inhibits the NF-kappa B signaling pathway and histone deacetylation, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner, *International Immunopharmacology*, Volume 51, Pages 47-56, ISSN 1567-5769, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.023>.
- Li, W.; Ji, J.; Chen, X.; Jiang, M.; Rui, X.; Dong, M, (2014): Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydr. Polym.*, 102, 351–359.
- Mandadžhieva T., Ignatova-Ivanova T., Kambarev S., Iliev I., Ivanova I., (2011): Utilization of Different Prebiotics by *Lactobacillus* Spp. and *Lactococcus* Spp., *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25:sup1, 117-120,
- Manning T. S., Gibson G. R., (2004): Prebiotics, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Volume 18, Issue 2, Pages 287-298, ISSN 1521-6918, <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.008>.
- Maeda, H.; Zhu, X.; Omura, K.; Suzuki, S. (2004); Kitamura, S. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*, 22, 197–200.
- Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017): Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- Moradi M., Mardani K., Tajik H., (2019): Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models, *LWT*, 111, 457-464
- Moroşan, E., Udeanu, D. (2020): I. NUTRITERRA–NUTRITION, DIET THERAPY & FOOD SAFETY IN THE CONTEXT OF THE COVID-19.
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, 7(3), 189-200.
- Nagyfejeő H., (2018): Oligoszacharidok alkalmazása *Lactobacillus* törzsek bakteriocin termelésének fokozására, Szakdolgozat, Budapest

- Peluzio M.d.C.G., Martinez J.A., Milagro I.F., (2021): Postbiotics: Metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions, *Trends in Food Sci Techn*, 108, 11-26
- Pranckute, R., Kaunietis, A., Kuisien, N., Citavicius, D. J. (2016): Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 89: 669–676.
- Shonna M. McBride, Vincent A. Fischetti, Donald J. LeBlanc, Robert C. Moellering Jr., Michael S. Gilmore, (2007): Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*, *Plos one*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000582>
- Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. (2020): Probiotics in Medicine: A Long Debate, *Front. Immunol, Sec. Nutritional Immunology*
- Stiles M. E., Holzapfel W. H, (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1, 1-29, ISSN 0168-1605
- Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2013): In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4), 637-649.
- Tiwari S., Mall C., Solanki P. P., (2020): CMC studies of CTAB, SLS & tween 80 by spectral and conductivity methodology to explore its potential in photogalvanic cell, *Surfaces and Interfaces*, Volume 18, 100427, ISSN 2468-0230
- Tsilingiri, K., & Rescigno, M. (2013): Postbiotics: what else? *Beneficial Microbes*, 4(1), 101–107.
- Uchida, M.; Ishii, I.; Inoue, C.; Akisato, Y.; Watanabe, K.; Hosoyama, S.; Toida, T.; Ariyoshi, N.; Kitada, M. (2007): Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *J. Atheroscler. Thromb*, 17, 980–988.
- Ueno C., A. Jo, D. Nakata, K. Terao, M. Otani, K. Sano, T. Oshima, N. Naeda, (2012): Enhancement of antibacterial activity of manuka honey on periodontal pathogenic bacteria with  $\alpha$ -cyclodextrin, *Proceedings of 29th Cyclodextrin Symposium*, Hoshi University, Tokyo, Japan

- Vallejo-Cordoba B., Castro-López C., García H.S., González-Córdova A. F., & Hernández-Medzoza A. (2020) Postbiotics and paraprobiotics: A review of current evidence and emerging trends, *Advances in Food and Nutrition Research*, 94:1-34. doi: 10.1016/bs.afnr.2020.06.001.
- Wang, J.; Wu, T.; Fang, X.; Min, W.; Yang, Z., (2018): Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* JLK0142 isolated from fermented dairy tofu. *Int. J. Biol. Macromol*, 115, 985–993.
- Wegh, C. A., Schoterman, M. H., Vaughan, E. E., Belzer, C., & Benninga, M. A. (2017). The effect of fiber and prebiotics on children’s gastrointestinal disorders and microbiome. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11(11), 1031-1045.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449-458.
- Yin, J.; Xu, B.; Zeng, X.; Shen, K. (2018): Broncho-Vaxom in pediatric recurrent respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.*, 54, 198–209.
- Zhang H.-M., Uematsu Z. Li, K., Kobayashi T., Horikoshi K., (2008): Antibacterial activity of cyclodextrins against *Bacillus* strains, *Arch. Microbiol.*, 190, pp. 605-609
- Zhou, J., Li, M., Chen, Q., Li, X., Chen, L., Dong, Z., ... & Chen, Q. (2022). Programmable probiotics modulate inflammation and gut microbiota for inflammatory bowel disease treatment after effective oral delivery. *Nature communications*, 13(1), 1-14.
- Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020): Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189.

## **8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Hálával tartozom konzulenseimnek Dr. Bujna Erikának a szakmai útmutatásért, példamutatásáért, valamint a fáradhatatlan munkájáért és hasznos tanácsaiért!

Köszönettel tartozom Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi tanárnak is, aki lelkesedésével is támogatta munkámat, a hasznos tanácsok mellett!

Köszönetemet szeretném kifejezni a Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék dolgozóinak, akik a munkám során segítő kezet nyújtottak!

Liebl Rebecka

## NYILATKOZAT

### a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Liebl Rebeka  
A Hallgató Neptun kódja: IKWZV  
A dolgozat címe: Posztbiotikumok antimikrobás hatásának vizsgálata  
A megjelenés éve: 2022  
A konzulens tanszék neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.


Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2022. év 11. hó 01. nap

  
Hallgató aláírása

## KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Liebl Rebeka (Neptun azonosítója: IMKWZV) konzulensként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>2</sup>

Kelt: Budapest, 2022. október 28.

  
Belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendő.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendő.