

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

Posztbiotikumok antimikrobás hatásának vizsgálata

Liebl Rebeka

Budapest

2022

A probiotikumok élő, -nem patogén mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva jótékony hatásúak a gazdaszervezetre. 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, tárolás, fogyasztás és emésztőrendszeren való áthaladás során életképes formában érjék el a vastagbelet. Posztbiotikumnak nevezünk minden olyan, a humán szervezet számára jótékony hatást kifejtő anyagot, amelyet a mikroorganizmus a metabolikus tevékenysége során bocsát ki vagy termel. Ezek nem életképes bakteriális sejtalkotók, melyek a gazdaszervezetben biológiai aktivitással rendelkező termékeként viselkednek. 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, ez pedig hatalmas előnyt jelent a probiotikumokkal szemben. Az újabb kutatások azt igazolják, hogy a posztbiotikumok alkalmazása fiziológiai előnyökkel jár, melyek a bélát funkciójának fokozásához kapcsolódnak. További megfigyelések szerint alkalmazásuk hozzájárul a nyálkahártya-immunitás javításához, rendelkeznek vastagbélhámra gyakorolt tumorelles és gyulladáscsökkentő hatásokkal, védenek az immunrendszeri rendellenességek kialakulásától is. Mindezek alapján probiotikus baktériumok sejtalkotóinak hatását vizsgáltam kórokozó mikroorganizmusok ellen.

Kutatásom során az alábbi négy tejsavbaktérium törzset alkalmaztam: *Lactobacillus fermentum* HA-179, *Lactobacillus helveticus* R-52, *Lactobacillus salivarius* HA-118 és a *Lactobacillus crispatus* LCR01. A törzsek fenntartására és a mikroorganizmusok felszaporítására MRS (de Man Rogosa Sharpe) tápközeget használtam fel, melyekhez kiegészítésként 1% trehalózt, illetve α -ciklodextrint kevertem. A fermentáció 37°C-on zajlott, mely során 16., 18. és 20. órában mintát vettem. A kiindulási pH beállítása citrát-foszfát pufferrel történt a megfelelő értékre, melyek az alábbiak voltak: 3, 4, 5, 6. A sejtfeltárást mechanikai és nem-mechanikai módszerekkel is elvégeztem, ez utóbbi esetben a lízist kémiai, illetve fizikai úton is megvalósítottam. Mechanikai sejtfeltárási módszerként a Frech Press nagynyomású homogenizátort használtam. A feltárást követően 10 percig 80°C-os hőkezelést alkalmaztam. A kémiai feltáráshoz 0,45 g/l koncentrációjú cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB) oldatot használtam fel. A fizikai módszer a hősokk volt, ahol a sejteket 10 percig 80°C-os vízfürdőbe helyeztem. Az antimikróbás hatás vizsgálata agardiffúziós módszerrel történt. A teszt mikroorganizmusok az alábbiak voltak: *Enterococcus faecalis* NCAIM B01312, *Escherichia coli* 8739, *Escherichia coli* 0157:H7,

Listeria monocytogenes 4ab, illetve az *Enterobacter cloacae* NCAIM B02073, melyekkel lemezöntést végeztem TSB agar felhasználásával. Az idő letelte után a furatok körül megjelent feltisztulási zóna méretéből lehetett következtetni az antimikróbás hatás mértékére.

Kutatómunkám során a tejsavbaktériumok fenntartására szolgáló MRS táplevésben szaporítottam fel a választott mikrobákat. A 16., 18., 20. órás fermentációt követően a három sejtfeltárási módszerrel elvégeztem a sejten belüli összetevők kiszabadítását. Az agardiffúziós módszerrel végzett vizsgálatot követően megállapítottam, hogy a French Press-es sejtfeltárási alkalmazásával csak a *L. salivarius* esetében alakult ki antimikróbás hatás, az *Enterococcus faecalis* kórokozó ellen, míg a többi esetben nem volt feltisztulási zóna. Ezzel szemben a hővel előlt sejtek esetében két törzsnél a *Lactobacillus salivarius* (16. órában) és a *Lactobacillus crispatus* (20. órában) mintáinál is tapasztalható volt a zóna jelentkezése. A legnagyobb hatást a CTAB oldattal való kezelés által értem el, ugyanis ebben az esetben minden vizsgált sejtlizátum gátló hatást fejtett ki valamelyik kórokozó ellen. A legerősebb hatást ennél a módszernél a *Lactobacillus helveticus* mutatta.

A következő kísérletben az MRS táplevés összetevői közül a glükózt lecseréltem trehalózra. Mivel a mechanikai feltárási módszer nem bizonyult hatékonynak, így csak kétfajta módszerrel dolgoztam tovább. A *Lactobacillus fermentum*-on kívül a másik három baktérium mutatott antimikróbás hatást szinte minden esetben a kórokozókkal szemben, ezek közül is a legnagyobb mértékű az *E. coli* O157:H7 ellen valósult meg. Továbbá elmondható, hogy a *L. helveticus* R-52 CTAB oldatos kezelés esetén minden órában a vizsgált kórokozókkal szemben mutatott mikrobagátló hatást, ennek mértéke azonban változó volt. A legerőteljesebb hatást az *E. coli* O157:H7 esetén láttam a 16. órás mintánál, ám a 18. órás minta is kimagaslott a többi közül, viszont a 16. órás mintához képest kisebb zóna keletkezett. A *L. salivarius* HA-118 esetén szintén csak a CTAB oldattal feltárt sejtlizátum volt hatásos, legnagyobb mértékben az *E. coli* törzsekkel szemben. A *L. helveticus* és *L. salivarius* törzsek esetén elmondható, hogy a gátló hatás a 16. és 18. órában erősebb, míg 20. órában kisebb mértékű. Az *E. faecalis* 20. órás mintájánál nem is látszódott feltisztulási zóna. A *L. salivarius* törzs az *E. coli* O157:H7 kórokozóval szemben mutatott jelentős nagyságú antimikróbás hatást minden órában azonos mértékben. Erre a kórokozóra a *L. crispatus* sejttanyagai is jelentős gátló hatást fejtettek ki, a vizsgált időpontokban, szinte azonos mértékben. A *L. crispatus* esetében még jelentős volt az *E. faecalis* elleni zóna nagysága, ez az idő előrehaladtával növekedett. A kísérlet végén megállapítható volt, hogy

a kémiai feltárás bizonyult a leghatékonyabb sejtfeltárási módszernek, ezért a következő kísérlet során már csak ezt a módszert alkalmaztam.

Irodalmi adatok szerint a prebiotikus oligoszacharidok alkalmazása probiotikus baktériumokkal kombinálva nemcsak növelheti a bakteriális növekedést, hanem modulálja antibakteriális aktivitásukat is. Ezért a probiotikumok felszaporítását jelen kísérletben az α -ciklodextrint tartalmazó MRS táplevesben végeztem. Az agardiffúziós módszerrel kapott feltisztulási zónák alapján elmondható, hogy a legtöbb kórokozót a *L. crispatus* törzs sejttanyagai gátolták. Ebben az esetben az *E. faecalis* törzs ellen az idő haladtával nőtt az antimikrobás hatás. Ez szinte az összes többi törzs esetén is elmondható. Az *E. coli* O157:H7 esetén keletkezett a legkevesebb feltisztulási zóna, ugyanis ez ellen csak a *L. crispatus* 20. órás mintája hatott, míg a trehalózban felszaporított tejsavbaktériumok mindegyike gátolta az *E. coli* O157:H7 mikroorganizmust.

A kiindulási pH hatással lehet a probiotikumok metabolikus tevékenységére ezáltal a poszbiotikumok által kifejtett hatásokra is, így 1% trehalózt tartalmazótápközeg kiindulási pH értékét 3, 4, 5, 6-ra állítottam. A kísérletet a két legkedvezőbbnek bizonyult *Lactobacillus* törzssel végeztem el, ez a *Lactobacillus helveticus* és a *Lactobacillus salivarius* volt. A feltárást CTAB oldattal végeztem 18 órás fermentáció után. A vizsgálat elvégzése után megállapítható volt, hogy a *Lactobacillus helveticus* esetén a 6-os kiindulási pH érték mellett alakult ki a legtöbb feltisztulási zóna. Ezen pH mellett a gátló hatás intenzívebb volt a kontroll mintához képest is, szinte mindegyik kórokozó törzssel szemben. Ez alól csak a *Listeria monocytogenes* volt kivétel, itt a feltisztulási zóna mérete megegyezett a kontroll mintánál tapasztalttal. Ezzel szemben a *Lactobacillus salivarius* esetében a 3-as kiindulási pH érték volt a legkedvezőbb a gátló hatás biztosítására. Ennél a törzsnél is a *Listeria monocytogenes* kivételével mindegyik patogén ellen jelentősebb feltisztulási zóna alakult ki a kontroll mintához képest.

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 sejttalkotói is antimikrobás hatást gyakorolnak. A gátló hatás fokozásához javasolt 1%-os trehalózos tápközeget alkalmazni, illetve a CTAB oldatos kezelés a leghatékonyabb a sejtfeltárás során. *L. helveticus* R-52 esetében javasolt a kiindulási tápközeg pH értékét 6-ra állítani, míg *L. salivarius* HA-118 használatánál pH 3-as értékre. Kísérleteim alátámasztják, hogy a poszbiotikum alkalmazása ígéretes kórokozó mikroorganizmusok elleni gátló hatás biztosítására.