

SZAKDOLGOZAT

Bán Fanni - Szakdolgozat

Bán Fanni

2023

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



**Tejsavbaktérium törzsek
pH és epesavtűrésének vizsgálata**

Bán Fanni

Budapest

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

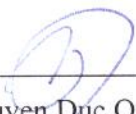
Hallgató: Bán Fanni

A szakedolgozat címe: Tejsavbaktérium törzsek pH és epesav tűrésének vizsgálata


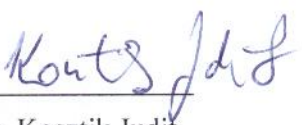
Konzulensek: Dr. Csernus Olívia, egyetemi adjunktus

Dr. Kosztik Judit, tudományos segédmunkatárs

Beadás dátuma: 2023. május 3.



Dr. Nguyen Duc Quang
egyetemi tanár, tanszékvezető

Dr. Csernus Olívia, Dr. Kosztik Judit
konzulensek



Dr. Nguyen Duc Quang
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS.....	1
2.	A MUNKA CÉLJA	2
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
3.1.	A mikrobiom.....	3
3.1.1.	A mikrobiom és a dysbiosis	3
3.1.2.	A mikrobiom élettani hatásai.....	5
3.2.	A probiotikumok.....	8
3.3.	A probiotikumok és az antibiotikumok kapcsolata.....	10
3.4.	A probiotikus tejsavbaktériumok.....	12
3.4.1.	<i>Lactococcus</i> nemzetség	12
3.4.2.	<i>Lactobacillus</i> nemzetség	13
3.5.	A tejsavbaktériumok savtűrése és túlélése az emésztőrendszerben.....	16
3.5.1.	<i>Lactococcus</i> nemzetség savtűrése	16
3.5.2.	<i>Lactobacillus</i> nemzetség savtűrése.....	17
3.5.3.	Epetűrési tesztek.....	18
3.6.	A probiotikus tejsavbaktériumok felhasználási lehetőségei	18
3.6.1.	Takarmánykiegészítőként való alkalmazásuk	18
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	19
4.1.	Felhasznált anyagok és oldatok összetétele	19
4.1.1.	Alkalmazott oldatok	19
4.1.2.	Az emésztőrendszer modellezéséhez alkalmazott oldatok.....	20
4.2.	Alkalmazott módszerek	20
4.2.1.	<i>Lactococcus</i> és <i>Lactocaseibacillus</i> törzsek felélesztése.....	20
4.2.2.	Bürker-kamrás sejtszámlálás	20
4.2.3.	Emésztési vizsgálatok.....	21

4.2.4.	Sejtszám meghatározása	21
4.2.5.	Savtolerancia meghatározása.....	22
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	23
5.1.	Bürker kamrás sejtszámlálás eredményei	23
5.2.	<i>Lactococcus</i> nemzetség emésztési vizsgálatai	23
5.2.1.	<i>Lactococcus garvieae</i> eredményei.....	23
5.2.2.	<i>Lactococcus formosensis</i> eredményei	25
5.2.3.	<i>Lactococcus lactis</i> eredményei.....	26
5.2.4.	<i>Lactococcus</i> törzsek emésztéses vizsgálatainak eredményei.....	30
5.3.	<i>Lactobacillus</i> nemzetség emésztési vizsgálatai	31
5.3.1.	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> gyomorsavas eredményei.....	31
5.3.2.	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> epesavas eredményei.....	34
5.4.	Eredmények összegzése.....	37
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	41
7.	IRODALMI HIVATKOZÁS	43

1. BEVEZETÉS

Az ember és a vele közös szimbiózisban élő baktériumok együttes fejlődése döntő fontosságú az emberi egészség és jólét fenntartásában. A probiotikus baktériumok a belek természetes lakói, minden egészséges ember bélrendszerében megtalálhatóak. Sőt nélkülük nincsen egészséges ember!

Táplálkozástól, stresszes életmódtól, gyógyszerektől, főleg antibiotikumok szedésétől függően a természetes bélflóránk megsérül. Előbb-utóbb az egyensúly helyreáll, de mégsem érdemes a várakozással kockáztatni. Sokkal jobban tesszük, ha felgyorsítjuk ezt a folyamatot, mivel a bélflóra „megbetegedésének” ideje alatt a működése, és az általa végzett folyamatok is zavart szenvednek, így ennek következtében az immunrendszer védőfunkciója sem teljes. A probiotikumok többnyire olyan tejsavbaktériumok, amelyek megfelelő mértékben képesek túlélni a tápcsatorna olyan hatásait, mint amilyen a gyomorsav környezete, illetve a vékonybél enzimejei, így szabadon fejthetik ki pozitív hatásukat a szervezetre. A probiotikumok táplálékkal való bevitele nemcsak a bélflóra felborulásakor, hanem akár az őszi és tavaszi időszakban is kedvező hatással lehet ránk, amikor amúgy is fogékonyabbak vagyunk a fertőzőes eredetű megbetegedésekre. Szedésükkel szervezetünk ellenállóképessége növekszik, és az általános közérzetünkön (fáradtság-, levertségérzet) is sokat javíthat.

Míg a legtöbb probiotikus készítményben alkalmazott törzsek a *Lactobacillus*-ok és a *Bifidobacterium*-ok bizonyos fajainak egyes törzsei, addig nagyon sok baktériumtörzs életképességének vizsgálata felfedezetlenül marad. A dolgozatom fő célja a kevésbé ismert *Lactococcus* tejsavbaktériumok vizsgálata és összehasonlítása egy gyakrabban alkalmazott *Lactobacillus* faj törzseivel. Ennek elérése érdekében a laboratóriumban modelleztem a gyomor-béltraktus egyes körülményeit. Kíváncsi vagyok, vizsgálataim eredménye adhat-e alapot jövőbeni vizsgálatokhoz, amelyekkel újabb baktériumtörzseket vehetünk be a probiotikus hatású készítmények soraiba.

2. A MUNKA CÉLJA

Szakdolgozatmunkám során több különböző tejsavtermelő baktériumtörzs epesav- és gyomorsav tűrő képességét vizsgáltam. Méréseim során arra kerestem a választ, hogy ezek a savak hogyan befolyásolják különböző *Lactobacillus* és *Lactococcus* nemzetségbe tartozó fajok sejtszámát eltérő idejű expozíció esetén. Továbbá szerettem volna meghatározni, hogy a vizsgált törzsek közül melyik lesz életképesebb a gyomor-béltraktust modellező környezetben áthaladva, ezáltal melyiket lehetne probiotikus törzsként alkalmazni, amennyiben megfelel a probiotikumokkal szemben támasztott egyéb kritériumoknak is.

A kísérleteim során az alábbi feladatokat terveztem megvalósítani:

- *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus formosensis*, *Lactococcus lactis* és *Lactobacillus paracasei* törzsek -20°C -on tárolt inokulumjainak MRS tápvelesben 48 órán át 37°C hőmérsékleten történő inkubációval való felszaporítása.
- A felszaporított baktériumtenyészetek sejtszámának meghatározása Bürker-kamrás vizsgálattal.
- 0,3%-os epesav koncentráció beállítása után, 8 órás intervallumban két óránkénti mintavétellel decimális hígítási sor készítése, majd szélesztés és inkubáció után az epesav kitettség sejtszámra gyakorolt hatásának meghatározása az egyes baktériumtörzsek esetében.
- 2-es pH beállítása után, a beoltás pillanatától 30, 60, 90 és 120 percenként mintavétel, majd decimális hígítási sor, szélesztés és inkubáció után az erősen savas pH hatásának vizsgálata a baktériumtörzsek sejtszámára.

Kísérleteimet a Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem Élelmiszertudományi Kar Élelmiszer-biotechnológiai Kutatócsoportjának laboratóriumában végeztem.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A mikrobiom

Az emberi mikrobiom változatos baktériumok egyedülálló tárháza. Az emberi bélrendszer mintegy 1000 különböző mikrobafajnak ad otthont, amelyek nagymértékben befolyásolják a gazdaszervezet belső környezetét, és jelentős szerepet játszik a gazdaszervezet egészségében (Saha és Saroj, 2022). Egyértelműen kimutatható, hogy minél változatosabb a bélflóra, minél többféle baktériumot tartalmaz, annál jobb hatással van az egészségre. A bél bakteriális kolonizációja már a születés közben megkezdődik és évekig tart. Számos baktériumközösség, köztük a tejsavbaktérium törzsek alkotják a bélmikrobiom végső összetételét, amely minden egyénnél egyedi (Garbacz, 2022).

3.1.1. A mikrobiom és a dysbiosis

„Minden betegség a bélből ered.” (Hippokratész)

Bár ezt az idézetet Hippokratésztól sok orvosbiológiai szakfolyóirat idézte, tényleges bizonyítékot, hogy ez a mondat tőle származna, írásaiban nem találtak. Ennek ellenére ez a kijelentés a legújabb kutatások fényében igaznak bizonyult (Perlmutter, 2017).

A mikrobiótát alkotó törzsek többsége a vastagbelet kolonizálja, és érzékenyen reagál a gazdaszervezet életciklusainak változására. Hatással van rá, hogy milyen az életmódunk, milyen gyógyszereket szedünk, hogy hüvelyi úton vagy császármetszéssel születünk, hogyan táplálkozunk és csecsemőként anyatejes vagy tápszeres táplálásban részesülünk (Knight és Buhler, 2015). Ez megnehezíti az egészséges mikrobiom meghatározását. Ezen fenntartások ellenére megállapítható, hogy az optimális mikrobiom jellemzője a fajok magas fokú, stabil diverzitása. Ezt a stabilitást olyan külső tényezők, mint a stressz, helytelen diéta, gyógyszerek (antibiotikumok, szteroidok és nem szteroid hatású gyulladáscsökkentők, protonpumpa-inhibitorok) előnytelenül befolyásolják. Az irodalomban dysbiosisként számontartott állapot a gazdaszervezet és a mikrobióta fajok közötti szimbiotikus kapcsolat megbomlását és a baktériumok abnormális állapotát jelenti.

Az emberi szervezetben a nyelőcsőtől egészen a végbélnyílásig egyrétegű hámsejtek borítják az emésztőtraktust, ami a testünk és a környezetünk közötti határt biztosítja. A bélnyálkahártya segíti a tápanyagok felszívódását, megakadályozza azon molekulák, vegyületek és mikroorganizmusok véráramba kerülését, amelyek károsíthatják a szervezetet, illetve immunglobulinokat tartalmaz, amelyek hozzákötődnek az idegen baktériumokhoz és

fehérjékhez, ezáltal megakadályozzák, hogy azok a bélnyálkahártyához tapadjanak. Szivárgó bél jelenség esetén a bélnyálkahártya második fő funkcióját elveszítve szabadabbá válik a sejtek közötti diffúzió, és a veszélyes mikroorganizmusok a véráramba kerülve gyulladást idéznek elő. Jól dokumentált tény, hogy ha a bélrendszer védőmechanizmusa meggyengül, a gyulladás mértékének növekedése következtében sokféle betegségre fogékonyra válunk (Perlmutter, 2017).

A témát közelebbről tekintve leírható, hogy a bélpermeabilitás integritása kritikus az egészség szempontjából. Az integritás csökkenése lehetővé teszi a lipopoliszacharidok (LPS) transzlokációját a bélből a véráramba. A Gram-negatív baktériumok külső membránjában jelen lévő erős endotoxinok, a lipopoliszacharidok a baktériumok sejtfalából felszabadulva és a vérbe kerülve LPS-asszociált toxicitást és gyulladással járó krónikus immunválaszt indukálnak, mindemellett a vér-agy gáton is átjutva, mint gyulladást keltő vegyületek az agyi funkciókban is zavart okozhatnak (Salguero et al., 2019). Ebből egyértelműen következtethető a gyulladással járó bélbetegség és az LPS közötti kétirányú kapcsolat, mivel az IBD (inflammatory bowel disease) megváltoztatja a bél permeabilitását, így lehetővé teszi a szivárgó bél kialakulását és a kórokozók bejutását a véráramba (Candelli et al., 2021). Ezt a jelenséget még inkább fokozza a magas zsírtartalmú élelmiszerek fogyasztása, vagy akár a vércukorszintet szabályozó metformin gyógyszer szedése is, amelyek növelik az LPS-tartalmú Gram-negatív baktériumok relatív gyakoriságát a bélben a Gram-pozitív baktériumokkal szemben (Salguero et al., 2019).

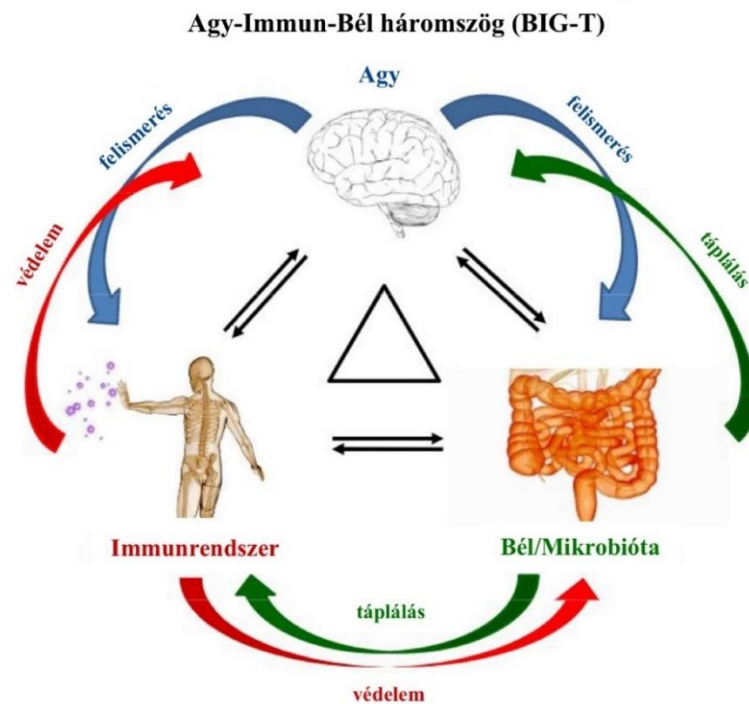
Azért különösen veszélyes probléma a szivárgó bél jelensége, mert a bélfal károsodása következtében fellépő gyulladással járó tünetek szivárgó agyhoz vezethetnek. A nagy áteresztőképességnek köszönhetően Dr. Alessio Fasano feltárta a ma már elfogadott összefüggést a gluténfogyasztás, a bél megnövekedett permeabilitása, valamint a szervezetünk egészében fennálló gyulladással járó állapot között. Ezt a felfedezést még aggasztóbbá teszi az, hogyha a glutén egyik fehérjéje, a gliadin a bélbe kerül, a vér-agy gát is átjárhatóbbá válik. Dr. Armando Ferraro neuropatológus és Dr. Joseph E. Kilman klinikai pszichiáter, a New York-i Pszichiátriai Intézet munkatársai a következőt publikálták a *Psychiatric Quarterly* (1933) folyóiratban: „Távol álljon tőlünk, hogy minden mentális megbetegedést ugyanarra az okra vezessünk vissza, de teljes mértékben indokoltnak érezzük a kijelentést: vannak olyan mentális zavarok, amelyek alapvető kiváltó oka az emésztőrendszerben keletkező toxikus állapot.” (Bested et al., 2013).

Egyik figyelemre méltó felismerés, hogy a mentális egészséggel kapcsolatos rendelleneségek alacsony fokú gyulladással (gyulladásmarkerek pl. citokinek vagy C-reaktív proteinek emelkedésével) és oxidatív stresszel járnak (Bested et al., 2013; Perlmutter, 2017). Ilyen például a depresszió, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, autizmus, sőt az ADHD és néhány szorongásos kórkép sem kivétel ez alól. Ugyanakkor több gastrointestinalis betegség magas komorbiditást mutat mentális és viselkedészavarokkal, például: irritábilis bél szindróma, Crohn-betegség, colitis ulcerosa (Kiss et al., 2018).

A bél permeabilitással összefüggésbe hozható LPS-asszociált toxicitás ellen kiemelkedően fontos szerepet játszhat a helyes táplálkozás, és a probiotikus bélbaktériumok arányának növelése. Míg a nagyon magas (kb. 72%-os) zsír- és szénhidrát-tartalmú étrendek csökkentik ezen mikroorganizmusok szintjét, folyamatosan növelik a szivárgó bél kialakulásának esélyét, és ezzel akár 2,7-szerese fokozódhat a vérben keringő LPS-szintje. *Bifidobacterium*-ok beadását követően a kutatás során az omega-3 szintje megemelkedett a szervezetben, amely a telített zsírokban gazdag olajokkal szemben pozitív hatással van a bélgátra és korlátozza az LPS káros hatásait. *Lactobacillus* törzsek némelyike jelentős antioxidáns hatással rendelkezve megakadályozza a bél permeabilitását, és csökkenti a stressz által kiváltott LPS-terhelést is. A tejsavbaktériumokat tartalmazó természetes fermentált tejtermékekben (pl. kecsketejben) magasabb a laktoferrin fehérje, amely szintúgy elősegíti a *Bifidobacterium*-ok szaporodását a potenciálisan patogén mikrobák rovására (Bested et al., 2013). Így megállapíthatjuk, hogy ennek az egyre veszélyesebb tünetegyüttesnek normalizálása érdekében rendkívül fontos, hogy a megfelelő étrenddel és az egészséges életmóddal támogassuk szervezetünk bélbaktériumait.

3.1.2. A mikrobiom élettani hatásai

A mikrobiom sokféle élettani funkciót tölt be, alapvető tápanyagforrást, vitamint biztosít, a gyomor-bélrendszer integritását segíti, és immunrendszerünk érettségét akár 80%-ban determinálja. Dr. Szabó Attila és Dr. Rajnavölgyi Éva az agy-bél-immunrendszer közötti kölcsönös, oda-vissza irányuló interakció feltételezését a BIG T (brain-immun-gut-triangle) egyenlő szárú háromszöggel írták le (1. ábra). E megközelítés szerint az immunfolyamatok, a viselkedés és a táplálkozás szorosan kapcsolódnak és szabályozzák egymást (Szabó és Rajnavölgyi, 2013).



1. ábra: Az agy-immun-bél háromszög (Brain-Immune-Gut Triangle), mint integrált funkcionális és szabályozó egység. A kétirányú fekete nyilak a visszacsatolós finomhangolást, míg a színes nyilak az egyes rendszerek funkcionális aktivitását jelölik (Szabó és Rajnavölgyi, 2013).

A mikrobiom kémiai közvetítőkkel bele tud szólni a központi idegrendszer működésébe is, ami a fejlődés korai szakaszában különösen meghatározó tényező lehet. Például korai életkorban stressz hatása alá helyezett patkányokban befolyásolta a későbbi életkor stressz-reaktivitását (O'Mahony et al., 2008), míg a steril béltraktusú egyedek stresszérzékenysége fokozottabb volt. Ugyanebben a vizsgálatban megfigyelték, hogy a mikrobiom betelepítése fiatalabb korban a stresszválasz normalizálódásához vezetett (Kiss et al., 2018; Sudo et al., 2004). A bél mikrobái továbbá számos olyan vitamint is termelnek, melyek nélkülözhetetlenek az agy egészsége szempontjából. A B₁₂-vitamin alacsony koncentrációja óriási kockázati tényező nemcsak a demencia, de egyéb idegrendszeri problémát illetően is. Emellett bizonyos ételekben fellelhető összetevőket, a polifenolokat is kisebb méretű, gyulladáscsökkentő molekulákra bontanak, amelyek eljutva az agyhoz, annak védelmét biztosítják (Perlmutter, 2017).

Kihangsúlyozandó az is, hogy egy egyén bélflórája szignifikáns mértékben, akár 25%-ban meghatározza a testsúlyt, ugyanis a bélbaktériumok jelentős mértékben befolyásolják a szervezet energia-egyensúlyát (Kiss et al., 2018; Turnbaugh és Gordon, 2009). A *Firmicutes* és a *Bacteroidetes*, mint az emésztőrendszerben élő baktériumpopuláció két nagy csoportjának egymáshoz viszonyított aránya (F/B) meglepően befolyásolja egészségünk

állapotát, illetve betegségek megjelenésének kockázatát. A vastagbélben található baktériumok 90%-át alkotják, de arányuk meglepően különbözik elhízott és sovány emberek bélflórájában. Míg az előzőleg említett túlsúlyos embereknél jóval több Gram-pozitív *Firmicutes* található, addig a soványabbakéban a Gram-negatív *Bacteroidetes* törzshe tartozó baktérium fajok törzsei domináltak. Sőt a *Firmicutes* magas szintje bekapcsolhat olyan géneket, amelyek növelik az elhízás, a cukorbetegség, és akár a szív- és érrendszeri betegségek kockázatát is. Gondoljunk bele: ha változik ezeknek a baktériumoknak az aránya, az megváltoztathatja a genetikai információnk kifejeződését is (Kumar et al., 2014; Perlmutter, 2017)! Az elhízásról sokan nem gondolják, hogy gyulladáshoz vezet, ahogy a depresszióról és a demenciáról sem, pedig mindegyik az. A zsírszövet által termelt citokinek mennyisége minden gyulladáshoz vezető betegség esetén magas, akár az ízületi gyulladásról, akár a szívbetegségről át az autoimmun rendellenességekről vagy a demenciáról beszélünk. Mivel a zsírfelesleg növeli a gyulladást, a gyulladás szintje pedig előrevetíti a neurológiai rendellenességeket, megállapíthatjuk, hogy az elhízás az agyi rendellenességek kockázati tényezője. Más-más tünetegyüttesekkel rendelkező betegségeket több esetben is az elhízásnak tulajdonítunk. Így például az anyagcsere zavarában szenvedő cukorbeteg, és a szív- és érrendszeri betegségbe kategorizált magasvérnyomás háttérben is bizony a gyulladás áll (Perlmutter, 2017).

A legújabb kutatások szerint a mikrobiom jelentős hatással van az agy és az immunrendszer fejlődésére és általános fiziológiájára. Így a mikrobiom – az agy által kontrollált immunfelügyelet ellenőrzése alatt – könnyen illeszkedik a bél-agy-immun kommunikáció hármas tagozódású funkcionális és szabályozó hálózatába (Szabó és Rajnavölgyi, 2013). Az immunrendszer egyik legfontosabb résztvevői a B-sejtek, amelyek antitestek előállítására termelődnek. Minden ilyen sejt egyedi receptort (BCR) hordoz, amely meghatározza, mely káros részecskét képes megkötni. Ez a rendkívüli változatosság a receptorokat kódoló gének átrendeződéséből származik. Így minden B-sejtben a receptor kissé eltérő, ami a felismerhető káros molekulák milliárdnyi lehetőségét eredményezi. A bélben található mikrobák kiváltják ezeknek a B-sejtpopulációknak a terjeszkedését és az ellenanyagtermelést. A rendelkezésre álló antitestek köre nagyban függ attól, hogy a hasznos mikrobáink hol találhatók meg a szervezetünkben. Dr. Limenitakis olyan speciális vizsgálatot végzett, amelyben genetikai szekvenciák millióinak feldolgozása során összehasonlította a B-sejtek antitest-repertoárját attól függően, hogy a mikrobák a bélben, vagy a véráramba kerülve fejtik ki hatásukat. A bélmikrobák érzékenyítik a központi

immunszöveteket, és antitestképzésre ösztönzik őket, ha egy ismeretlen mikroba kerül a véráramba. Ennek hatására a meglehetősen korlátozott bél-ellenanyag-válasz megváltozik, hogy alkalmazkodni tudjon az új baktériumhoz. Dr. Li a kísérlet adataiból megállapította, hogy nemcsak a mikrobiom összetétele, hanem a kommenzális mikrobióta bizonyos tagjaival való érintkezés időzítése és sorrendje is hatással van a kialakuló B-sejt-receptor-repertoárra és a kórokozókkal szembeni későbbi immunitásra (Li et al., 2020). Perlmutter (2017) Agyépítők könyvéből idézve „Megkerülhetetlen tény, hogy az évmilliók során együtt fejlődünk ezekkel a mikroorganizmusokkal. Pontosan ugyanolyan fontosak az életben maradásuk, mint a saját sejtjeink. Szükségünk van rájuk az életünkhöz és egészségünkhöz. Sajnos, nem adjuk meg a kellő tiszteletet a bélflóránknak. Veszélyes körülmények között végzik létfontosságú munkájukat – eljött az ideje, hogy kellő mértékben figyeljünk rájuk, és úgy gondoskodjunk róluk, ahogy megérdemlik. Csak ilyen hozzáállással leszünk képesek jelentős haladást elérni a modern kori betegségekkel való küzdelemben.”

3.2. A probiotikumok

A probiotikumok mint „életképes, nem patogén, egészséget biztosító mikroorganizmusokat tartalmazó étrend-kiegészítők” fiziológiai funkcióinak javításával előnyöket biztosítanak a gazdaszervezet számára, és potenciális kemopreventív szerként is betöltik funkciójukat (Orlando et al., 2012). A probiotikumokat túlnyomórészt a bélrendszer egészségének javítására használják, de emellett az immunrendszer kiegyensúlyozott működésében is kulcsszerepet játszanak. Növelik a kórokozókkal szembeni rezisztenciát, javítják az emésztőrendszer működését, erősítik a bélfalat, és potenciálisan elősegítik a rákkeltő anyagok megkötését és eltávolítását a bélrendszerből (Papp-Bata és Szakály, 2021). Mindemellett antitumorogén vagy antimutagén vegyületeket termelnek, ezáltal létfontosságúak a rákos megbetegedések prevenciójában, progressziójának megelőzésében, valamint a sejtnövekedési mechanizmusok szabályozásában (Orlando et al., 2012; Tasdemir és Sanlier, 2020).

Kiválasztási kritériumaik közé tartoznak a következő funkcionális tulajdonságok: pozitív hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre, életképesek maradnak a termék teljes szavatossági ideje alatt, ellenállnak a gastrointestinalis traktuson való áthaladás során érkező hatásoknak, megtapadnak a bélhám sejtfalán, és kolonizálják a traktus lumenét, antimikrobiális anyagokat termelnek a kórokozókkal szemben (ilyen anyagcsere-vegyületek pl. zsírsavak, hidrogén-peroxid, diacetil), technológiai szempontból alkalmasak/ellenállóak ipari

folyamatok során és stabilizálják a bélmikrobiótát. A bélnyálkahártyához való tapadásuk megakadályozhatja a probiotikus sejtek kimosását, ezzel lehetővé téve citokin termelés stimulálásával történő enteropatogének immunmodulációját és kompetitív kizárását. Emellett szükséges ahhoz is, hogy enzimeket, természetes antibiotikumokat, tejsavat, vitaminokat állítsanak elő és nyugodt körülmények között szaporodhassanak (Shewale et al., 2014).

A probiotikumok hatásmechanizmusai (Hancz, 2021):

- Patogén-antagonizmus: a táplálékkal szervezetbe juttatott mikroorganizmusok, olyan anyagokat termelnek, amelyek meggátolják a patogén mikrobák szaporodását, és gátolják a kórokozók kolonizációját (Servin, 2004).
- Kompetíció: a patogének korlátozása a tápanyagforrásokhoz és a tapadási helyekhez való hozzájutásban.
- Immunmoduláció és toxin semlegesítés: a probiotikum támogatja a gazdaszervezet immunrendszerét és/vagy inaktíválja a patogének termelte toxinokat (Brandão et al., 1998; Ezendam és Van Loveren, 2006).

A probiotikumok funkcionalitása és egészségügyi szempontjainak megismerése érdekében in vitro és in vivo kísérleteket egymással korrelálva végeznek. Emberi felhasználásuk előtt szükségesek a humán kísérletek is. Eredetük lehet állati, emberi mikrobiomból (vastagbélből, anyatejből), vagy állati eredetű élelmiszerforrásból (nyers tejből vagy fermentált élelmiszerekből) is. Emberi célra történő kiválasztás esetén, ha a probiotikus törzset az emberi mikrobiomból izolálták nagyobb valószínűséggel tapad meg az emberi bélfalon, és nagyobb eséllyel biztonságosabb. A WHO/FAO irányelvei szerint a probiotikumok törzsspecifikusak, ezért nemzetség, faj és törzs szintjén is azonosítani kell őket fenotípusos, és genetikai technikák kombinálásával együtt. Előbbi jellemzésének elsődleges azonosítási kritériumai a sejtmorfológia, a metabolitok meghatározása, az enzimaktivitás és a cukor hasznosító képessége (Shewale et al., 2014).

Probiotikus törzsek jellemzésére elvégzendő tesztek (Shewale et al., 2014):

- A mellékhatások értékelése korábbi humán vizsgálatok során.
- Metabolikus aktivitások felmérése (pl. D-laktáz termelés, epesó konjugáció).
- Az antibiotikum rezisztencia mintázatának meghatározása.
- A fogyasztókat érő nemkívánatos események piaci felügyelete.

A probiotikus termékek, különösen az aktív kultúrákat tartalmazó tejtermékek jelenléte az élelmiszerek piacán belül erőteljesen növekszik. Bár az emberiség felismerte az erjesztett tejtermékeknek fontosságát az egészséges táplálkozásban, a bélmikrobiom bakteriális összetételének megváltoztatására szolgáló, tudományosan megalapozott módszerek csak az elmúlt évtizedekben fejlődtek ki (Papp-Bata és Szakály, 2021).

3.3. A probiotikumok és az antibiotikumok kapcsolata

Napjainkban sajnos egyre elterjedtebb, hogy sokféle tünetre, akár vírusos, akár bakteriális eredetű a megbetegedés, nem a kórokozó baktériumra célzottan ható hatásmechanizmussal rendelkező antibiotikus kezelésben részesül valaki. Ezáltal még nagyobb az esély, hogy antibiotikum rezisztencia alakuljon ki, és a sokáig tartó nem megfelelő gyógyszeres kezelés hosszú távon csökkenti az egészség fenntartásának esélyeit.

Az antibiotikus kezelés megváltoztatja a mikrobiom összetételét, ezzel a megváltozott szénhidrátmetabolizmus és a rövid szénláncú zsírsavak csökkent felszívódása végül ozmotikus hasmenést eredményezhet (Lakatos és Tulassay, 2009). A hasmenést többek között a *Clostridium difficile* baktériumtörzs túlszaporodása okozhatja. Az ilyen jellegű, erős tünetekkel járó halálos fertőzések esetszámai drasztikusan emelkedtek az elmúlt húsz év távlatában. Rendes körülmények között nagyszámú *Clostridium difficile* kolonizál a bélrendszerünkben már csecsemőkortól kezdve mindenféle probléma nélkül, de a hirtelen emésztőrendszeri változások következtében, például túl sok antibiotikum szedésével túlszaporodásukat okozhatjuk. A bélbaktériumok három fontos zsírsavat (ecetsav, propionsav, vajsav) termelnek, amelyek vagy felszívódnak a vastagbélben és energiaforrásként hasznosulnak, vagy a széklettel kiürülnek a szervezetből. A *Clostridium* fajok főként propionsavat (PPA) állítanak elő, ami a mikrobiom egyensúlyi állapotának felborulását követően a sértetlenségét elveszített bélnyálkahártyán keresztül a véráramba kerülve toxikus hatást váltanak ki. Ez egyrészt gyengíti a bélnyálkahártya sejteji közti diffúziós gátat, közvetlenül károsítja a mitokondriumok működését, ezáltal megváltoztatja az agy energiafelhasználó képességét, növeli az oxidatív stresszt, ami pedig károsítja a fehérjéket, a sejtmembránokat és még a DNS-t is. Másrészt kiürít az agyból olyan kulcsfontosságú molekulákat, mint az antioxidánsok, neurotranszmitterek és az omega-3 zsírsavak, amelyek szükségesek az agy megfelelő működéséhez. A PPA egyik legdöbbenetesebb hatása az autizmus kiváltásában mutatkozik meg, aminek a kutatási eredményeivel szembeesülve talán még inkább igyekszünk bélflóránk egészségét fenntartani

(Perlmutter, 2017). Érdekes módon a *Clostridium* fajok különösen nagy hajlamosságot mutattak kolonizációra antibiotikus beavatkozást követően. Ez azért jelentős, mert az általuk okozott fertőzések széles spektrumú antibiotikumok alkalmazásával hozhatók kapcsolatba az akut ellátás során. Az antibiotikumok által kiváltott bélrendszeri dysbiosis minimalizálására irányuló jövőbeli gyógyszerfejlesztéseknek a *Clostridium* spóracsírázási folyamatát kell megcéloznia és a közvetlen kolonizációs rezisztenciával rendelkező hasznos fajok, például a *Bifidobacterium* fajok bőségének növelését (Palleja et al., 2018).

Az állattenyésztésben egyre szélesebb körben alkalmazott antibiotikumok még több aggályt okoznak a gyógyszer hosszútávú hatását és az antibiotikum-rezisztenciát illetően. Állatkísérletekből megtudható, hogy a haszonállatok mikrobiomjában bekövetkező változások során olyan baktériumok veszik át az uralmat, amelyek elősegítik az elhízást, valamint a rezisztencia mértéke is jelentősen emelkedni kezd. Ezt követően a különböző húsokban és tejtermékekben is megjelennek ezek az antibiotikumok, amelyek így már az emberi szervezetre hosszú távon kifejtik negatív hatásukat. Közvetlenül, vagy bélbaktériumainkon keresztül károsan befolyásolhatják hormonjaink működését, és az anyagcserénket is felboríthatják (Perlmutter, 2017).

Az antibiotikumoknak (AB) való kitettség esetén a mikrobiális közösségek nemcsak összetételük megváltoztatásával, hanem fejlődéssel is reagálnak. A minimalizálás érdekében optimalizálják és egymás között kicserélik az antibiotikum-rezisztencia géneket (antibiotic resistance genes, ARG), ezáltal tovább terjesztve az ellenállóképességüket. A mikrobiális AB-rezisztencia terjedése komoly egészségügyi kockázatot jelent, mivel a korábban megbízható antibiotikumok ma már nem olyan hatékonyan működnek. A rezisztenciagén hordozása befolyásolja a bélben élő baktériumok túlélési és kolonizációs potenciálját (Palleja et al., 2018).

A probiotikumok számos hatását igazolták akut fertőzések hasmenéses kórképeknél és irritábilis bél szindrómánál is. Mindkét esetben módosították a bélmikrobiom anyagcseréjét, a rövid szénláncú zsírsavak és gázok termelését, az epesavak dekonjugációját és felszívódását. Adatokkal bizonyítható, hogy a probiotikumok hatással vannak a bélmozgásra, javítják a barrier működést, a zsigeri túlérzékenységet, nem mellesleg csökkentik a bélnedv és a nyák termelését. Gyulladáscsökkentő hatásúak, az endocannabinoid rendszer és a hypothalamus-agyalapi mirigy-mellékvese tengely módosítása révén pedig befolyásolják az érzékelést. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy rendkívül fontos más baktériumtörzsek bevitelével helyreállítani a bélmikrobiom

egyensúlyát. Számos probiotikus törzs vizsgálata mellett, a tanulmányok döntő többségében a *Lactobacillus* törzsek éltek túl a gyomor savas közegét, álltak ellen az epesavaknak, és még kimutathatóan életképesek maradtak a távolabbi bélszakaszokban is (Lakatos és Tulassay, 2009).

3.4. A probiotikus tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumok számos törzsét probiotikumként alkalmazzák, és ezek különféle hatásmechanizmusokkal számos betegséget képesek gyógyítani, megelőzni. Ebben központi szerepet töltenek be, mivel az erjesztés során másodlagos metabolitok, bakteriocinek, etanol, ecetsav, aromavegyületek, exopoliszacharidok, bioaktív peptidek, vitaminok és bizonyos enzimek képződését idézik elő (Tasdemir és Sanlier, 2020).

Az elmúlt évtizedekben a laktózt laktáttá fermentálni képes tejsavbaktériumokat számos egészségügyi előnnyel hozták összefüggésbe, többek között a mutagén és rákkeltő anyagok kockázatának csökkentésével és a vastagbélrák megelőzésével. A probiotikumokhoz kapcsolódó élelmiszerek fogyasztásával érhetőek el a tejsavbaktériumok által nyújtott előnyök (Zhao et al., 2017).

3.4.1. *Lactococcus nemzetség*

A *Lactococcus*ok Gram-pozitív, anaerob baktériumok, amelyek tejsavat termelnek az erjesztett nyers tejben lévő laktózból glükóz fermentálásával. Taxonómiailag *Bacteria* országába, *Firmicutes* törzsbe, *Lactobacillales* rendbe, *Streptococcaceae* családba tartoznak.

▪ *Lactococcus lactis*

Eredetileg a *Streptococcus* nemzetségből származó, de 1985-ben a *Lactococcus* nemzetségbe átsorolt *Lactococcus lactis* fenotípusosan Gram-pozitív baktérium, amelyet széles körben használnak fermentált tejtermékek és sajt gyártásához. Sejtmorfológiát tekintve gömb, vagy tojásdad alakú sejtekkel rendelkeznek, és egyenként vagy láncban fordulnak elő (O’Keeffe és Hill, 1999), homolaktát, nem spórás és fakultatív anaerob bélbaktériumnak minősülnek. Szaporodásuk gyors, nagy sejtsűrűséget eredményez, emellett nem igényel levegőztetést, ami elősegíti a nagymértékű fermentációt. Annak ellenére, hogy a *Lactococcus lactis*-t gyakran tejtermékekkel társítják, a baktériumot eredetileg növényekből izolálták nyugalmi állapotban, és csak a kérődzők gyomrában vált aktívvá és szaporodott el (Song et al., 2017).

- ***Lactococcus formosensis***

A baktériumot egy hagyományos tajvani fermentált élelmiszerből, a yan-tsai-shin-ből, másnéven erjesztett brokkoli szárból izolálták. A génszekvenálási eredmények alapján az új kokkus alakú 516^T jelzésű szervezet 98,9%-os szekvenciahasonlóságot mutat a *Lactococcus garvieae* egyik törzsével. A kísérletek alapján az 516^T törzs a *Lactococcus* nemzetség egy új faját képviseli, mint *Lactococcus formosensis* sp. (Chen et al., 2014).

- ***Lactococcus garvieae***

Korábban a *Streptococcus* nemzetségbe sorolt Gram-pozitív, kataláz-negatív, fakultatív anaerob baktérium, amely rövid láncokba csoportosul. Korábban az ázsiai aqvakultúra-környezet fő kórokozójaként tartották számon, újabban pedig emberi szempontból is figyelmet kapott, mivel zoonózist okozó alacsony virulenciával rendelkező ritka kórokozó (Ortiz et al., 2014). Bár a vízi fajok a *Lactococcus garvieae* leggyakoribb gazdája, a szervezetet kolbászokban, sertésfeldolgozó üzemekben, baromfiban, szubklinikai intramammális fertőzésben szenvedő tehenekben és pasztörözött tejben is megtalálták. Az első emberi fertőzést 1991-ben dokumentálták, és az elmúlt néhány évtizedben számos betegség, mint például endocarditis, májtályog, és osteomyelitis kórokozójaként is azonosították. Az emberi fertőzésekhez vezető pontos mechanizmusa nem megalapozott, de összefüggésbe hozható gyomor-bélrendszeri rendellenességekkel, mint például divertikulózis, vastagbélpolipózis (C. C.-Y. Wang et al., 2007).

3.4.2. *Lactobacillus* nemzetség

A tejsavbaktériumok körébe tartozó *Lactobacillusok* Gram-pozitív, kataláz-negatív, pálcá alakú, spórát nem képző fakultatív anaerob vagy aerotoleráns mikroorganizmusok. 2021-ben a nemzetséghez már 261 fajt soroltak, amelyek rendkívül változatosak fenotípusos, ökológiai és genotípusos szinten is.

A *Lactobacillus* fajok számos módszerrel, többek között a kórokozók elnyomásával, a mikrobiális egyensúly fenntartásával, immunmodulációval és a hámgát funkciójának fokozásával egészségjavító hatást fejtenek ki a gasztrointesztinális traktusban. Egy adott *Lactobacillus* fajon belül nem mindegyik törzs tekinthető jótékony hatásúnak, mivel a különböző fajok különböző válaszokat válthatnak ki a gazdaszervezetben. A törzsek eltérései a lactobacillusok sejtfelszíni struktúrájának változatosságával és a baktériumok azon képességével hozhatóak összefüggésbe, hogy a gazdaszervezet környezetére adott válaszként bizonyos felszíni komponenseket expresszálnak vagy specifikus vegyületeket

választanak ki. Tekintettel a gastrointestinális térben található nehéz körülményekre, a *Lactobacillus*-okról ismert, hogy stresszfaktorok hatására, például az epére, alacsony pH-ra, oxidatív- vagy ozmotikus stresszre reagálva megváltoztatják sejt felszíni struktúrájukat, amely adaptációk segítik túlélésüket. Az elmúlt évek kutatásai számos sejt felszínhez kapcsolódó kémiai anyagot hoztak összefüggésbe az immunmodulációval, és a bélhám barrier funkciójára gyakorolt védő mechanizmussal. A proximális vékonybélben, mint tápanyagokban gazdag környezetben dominálnak, de a széklet mikrobiótájában is minimálisan előfordulnak 0,01-0,6 közötti %-ban, viszont arányuk így is egyénekenként nagymértékben változik. Képesek megtapadni és kölcsönhatásba lépni a bélhámval és a nyálkahártya rétegeivel, a konkurens baktériumok ellenére is. A kórokozók számos asszociációs mechanizmust fejlesztettek ki, hogy a bélnyálkahártyához kapcsolódhassanak, és ellenálljanak annak áramlásának. Különösen a patogén baktériumok alakítanak ki szoros kapcsolatokat, amelyekhez a baktériumok által kódolt speciális faktorokra van szükség, mivel ezek hiányában gyorsan kiürülnének a bélből. Kimutatható, hogy a bél eredetű *Lactobacillus*-ok és *Bifidobacterium*-ok képesek megzavarni a patogének bélszejtekhez való tapadását. A bélhámhoz való tapadási képességük kulcsfontosságú tulajdonság, mivel mindemellett elősegíti a kolonizáció és a perzisztencia idejét, és serkenti az immunrendszer által közvetített mikroba-gazda interakciókat (Servin, 2004). Ezek a tulajdonságaik növelik probiotikumként való felhasználhatóságuk lehetőségét, amelyek megfelelnek a 2002-ben operatív szabványok által meghatározott paramétereknek (Sengupta et al., 2013).

▪ ***Lacticaseibacillus paracasei***

Taxonómiaiilag *Bacteria* országába, *Bacillota* törzsbe, *Lactobacillales* rendbe, *Lactobacilaceae* családba tartoznak. A *Lactobacillus*-okat 2020-ban 25 különböző nemzetségre osztották, így az előzőleg *Lactobacillus paracasei* néven ismert baktérium az új, *Lacticaseibacillus* elnevezésű nemzetségbe került. A tejsavbaktériumok Gram-pozitív, homofermentatív, nem spóráképző fajtája, amelyet általában fermentálásra és probiotikus kultúráként alkalmaznak (Orlando et al., 2012). Morfológiáját tekintve pálcika alakúak, egyenként vagy láncban előfordulva. Növekedése 10-37°C közötti hőtartományban optimális, 40°C felett pedig gátolt. Körülbelül 40 másodpercig marad életképes 72°C-os maximális hőmérsékleten. Megtalálható az emberi szájüregben, bélrendszerben, valamint szennyvizekben is (Collins et al., 1989; Rogan et al., 1988).

Lactocaseibacillus paracasei előnyeit többféle kutatás eredménye alátámasztja:

- Kimutatták, hogy a törzssel dúsított fermentált tej 30 napon át tartó folyamatos fogyasztása hatékonyan javította az allergiás rhinitisben szenvedő betegek életminőségét, és alternatív kezelésként szolgálhat az allergiás nátha kezelésére is.
- Az *L. paracasei* KBL382 törzs szignifikánsan csökkentette az atópiás dermatitisz okozta bőrelváltozásokat, az epidermális megvastagodást, az immunglobulin E szérum szintjét és az immunsejtek infiltrációját is. Így az immunválasz szabályozásával és a bél mikrobióta összetételének megváltoztatásával a tünetek csökkenéséhez segíti hozzá a gazdaszervezetet (Kim et al., 2020).
- *L. paracasei* DG törzs jelentősen indukálta a protektív antivirális immunitásban szerepet játszó gének expresszióját, és megakadályozta a SARS-COV-2 fertőzés által kiváltott proinflammatorikus gének expresszióját, ezáltal mint probiotikus törzs ígéretes jelöltnek bizonyul, amely profilaktikus potenciált mutat a vírushalmozással szemben (Salaris et al., 2021).
- A vizsgált tejsavbaktériumok közül a hővel előlt *L. paracasei* MoLac-1 indukálta legerősebben az interleukin-12 (IL-12) receptort (dendritikus sejtek antigén stimulációra termelt válaszuk). Orális adagolás során megfigyelhető volt az NK-sejtek (természetes ölü sejtek) növekedése a lépben, amely során enyhültek az influenzavírus (IFV) fertőzés tünetei a kísérleti egerekben. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a hővel előlt MoLac-1 törzsek képesek modulálni a veleszületett immunitást, és hasznosak az IFV kezelésében (Iwabuchi et al., 2012).
- Hagyományos terápiákkal kombinálva alkalmazható a fekélyes vastagbélgyulladás kezelésére, mivel a hővel előlt D3-5 törzs sejtfalából származó lipoteichoinsav enyhíti az öregedéssel járó szivárgó bélrendszer gyulladását, és megakadályozza a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott anyagcserezavarokat. A probiotikus törzssel való táplálás elősegítette a mucin termelést, aminek a nyálkahártya védelmében rendkívül fontos szerepe van (S. Wang et al., 2020). Emellett gátolja az *Escherichia coli* baktériumok gyakori törzsének bakteriális aktivitását, így hasmenés kezelésére is javasolják (Caridi, 2002).
- *L. paracasei* 8700:2 törzsét egészséges emberi gyomor-bélrendszeri nyálkahártyából és emberi ürülékből izolálták. Kutatások során igazolták, hogy gátolta a *Salmonella enterica* és a *Helicobacter pylori* kórokozó baktériumokat is. Az *L. paracasei*

vizsgált törzse lebontja az oligofruktózt és az inulint is, miközben végtermékként tejsavat termel (Makras et al., 2005).

3.5. A tejsavbaktériumok savtűrése és túlélése az emésztőrendszerben

Ahhoz, hogy a probiotikumok jótékony hatásai valóban megvalósulhassanak, át kell jutniuk a gyomor-bélrendszer felső szakaszán, képesnek kell lenniük elviselniük a gyomor rendkívül savas környezetét és a vékonybél detergensszerű epesavát (Whitehead et al., 2008), meg kell tapadniuk a bélnyárkahártyán, és kolonizációs képességgel kell rendelkezniük. Ezekben a tulajdonságokban és hatásukat is tekintve a különböző törzsek jelentősen különbözhetnek egymástól (Lakatos és Tulassay, 2009).

Ezeknek a Gram-pozitív mikroorganizmusoknak nemcsak a gyomor-béltraktusban előforduló savas környezet jelent igazán nagy kihívást, hanem a probiotikus kultúrák előnyben részesített szállítóeszközei, a joghurtok és a fermentált tejek savassága is. Ennélfogva a savtoleranciát a potenciálisan probiotikus törzsek kiválasztásának egyik kívánatos tulajdonságaként fogadják el (Cotter és Hill, 2003).

A tejsavbaktériumok stresszválaszainak feltárása még nagyon kezdetleges. Számos stresszválasz gént fedeztek fel a más organizmusok ismert génjeivel való homológiák révén. Míg a stresszválasz gének nagymértékben konzerváltak tűnnek, szabályozásuk azonban nem biztos, hogy az. Így a stresszválasz szabályozásának kutatása tejsavbaktériumokban új szabályozási köröket tárhat fel (Rallu et al., 1996). A savtűrési válasz (ART) néven ismert mechanizmus segítségével a *Lactobacillus* törzsek túlélésük érdekében képesek alkalmazkodni az alacsony pH értékekhez. A „de novo” fehérjeszintézis folyamat és egy indukálható rendszer együttesen védekezik a savas-stressz hatás ellen (Lorca et al., 1998).

3.5.1. *Lactococcus nemzetség savtűrése*

A franciaországi Nemzeti Agronómiai Kutatóintézet kísérletében *Lactococcus lactis* túlélését és fiziológiáját vizsgálták patkányok gyomor-béltraktusában. Erre a célra riporter génekkel jelölt törzseket, a *Vibrio harveyi* biolumineszcens tengeri baktérium luciferázát (*luxA-luxB* génjét) és az *Aequora victoria* csendes óceáni medúzából 1961-ben először izolált zöld fluoreszcens fehérjének (GFP) génjét használták, amelyekkel sikeresen megkülönböztették a beoltott mikroorganizmust az élelmiszerektől és a többi bélbaktériumtól. A luciferázzal mérték a *Lactococcus lactis* metabolikus aktivitását az emésztőrendszerben, mert NADH-t igényel, ami csak a metabolikusan aktív sejtekben érhető el. Nemcsak arról számoltak be, hogy bizonyos tényezők hogyan befolyásolják a sejtek

életképességét és integritását egyes emésztőrendszeri szakaszokban, hanem arról is, hogy a baktériumok beadásának módja drámai hatással lehet azok túlélésére is. Az étrenddel együtt áthaladó *Lactococcus lactis*-ok meglehetősen ellenállónak bizonyultak a gyomorsavas közegben (90-98%-os túlélés), ellenben a nyombéllel, ahol csak 10-30%-a maradt életben. Az életképes sejtek metabolikusan aktívak az emésztőrendszer minden traktusában, míg a legtöbb elhalt sejt gyors lízisnek van kitéve. Ez a sajátosság arra enged következtetni, hogy a *Lactococcus*-ok mint vektorok használhatók a citoplazmában termelt fehérjék célirányos elszállítására a nyombélbe. Ilyen módon például a hasnyálmirigy hiányosságának kezelésére különösen alkalmas lenne, olyan emésztőenzim speciális szállításával, mint a lipáz (Drouault et al., 1999).

3.5.2. *Lactobacillus* nemzetség savtűrése

A *Lactobacillus* fajokat belsőleg rezisztensnek tekintik savakkal szemben. Bár vannak különbségek a fajok és törzsek között, a mikroorganizmusok általában fokozott érzékenységet mutatnak 3,0 alatti pH-értékeken. A *Lactobacillus*-ok savtoleranciája az extracelluláris és a citoplazmatikus pH közötti állandó gradiens jelenlétének tulajdonítható. Amikor a belső pH eléri egy küszöbértéket, a sejtfunkciók gátlódnak, és a sejtek elpusztulnak. A Gram-pozitív szervezetek a savas körülmények ellen alkalmazott mechanizmusa a F_0F_1 -ATP-áz működésével valósul meg. A F_0F_1 -ATP-áz több alegységből álló enzim-komplex, amelynek a katalitikus része (F_1) magába foglalja az α , β , γ , δ és ϵ alegységeket az ATP hidrolíziséhez, míg az integrált membrán (F_0) részében foglalt a, b, és c alegységek, mint membrán csatornaként funkcionálnak a proton transzlokációhoz. A kutatások alapján olyan következtetést vontak le, hogy az enzim alacsony extracelluláris pH-n növelheti az intracelluláris pH-t, és az enzim alacsony pH-n való indukálásának szabályozása transzkripció szintjén történik. A kísérletben összekapcsolták a F_0F_1 -ATP-áz komplex fontosságát a glükóz jelenlétében megfigyelt túlélési hatással. Mivel a F_0F_1 -ATP-áz ATP-t igényel H^+ sejtől történő kilökődéséhez, ezáltal fenntartja a pH-homeosztázist és a sejt életképességét. A glükóz savas körülmények között ezért növelheti a probiotikumok túlélését azáltal, hogy biztosítja a szükséges ATP-készletet, lehetővé téve az optimális H^+ extrudálást az enzim-komplex segítségével (Corcoran et al., 2005).

3.5.3. Epetűrési tesztek

Az epesavak amfipatikus molekulák, amelyek koleszterinből szintetizálódnak a májban, és fontos szerepet játszanak a zsírok emésztésében és a zsírban oldódó vitaminok felszívódásában. Az epesavak koncentrációja az emberi vékonybélben 0,2 és 2% között mozog, és a táplálékkal bevitt zsír mennyiségétől függően ingadozik. Az epesavak erős antimikrobiális hatással rendelkeznek számos mikrobával szemben, és ismert, hogy károsítják az epeellenállónak tartott sejteket, valószínűleg a membrán és a sejtfal megbontása révén. Bár az epesavak sejthalált okozó pontos mechanizmusai nem ismertek, kémiai természetük arra utal, hogy képesek szolubilizálni a membránokat és jelentős membránkárosodást okozni (Whitehead et al., 2008). Emiatt a baktériumok epestressznek kitett ellenálló képessége az egyik gyakran használt kritérium a potenciális probiotikum kiválasztásánál.

3.6. A probiotikus tejsavbaktériumok felhasználási lehetőségei

3.6.1. Takarmánykiegészítőként való alkalmazásuk

Bár az állattenyésztés elsődleges célja az emberi fogyasztásra szánt biztonságos élelmiszerek előállítása, a környezetet és az állatok jólétét is figyelembe kell venni. Mikrobiológiai szempontból az állatokból származó egészséges élelmiszerek előállítása egyrészt az élelmiszerekkel terjedő kórokozók, másrészt a tenyésztés során a kórokozók elleni küzdelemre alkalmazott módszerek figyelembevételével történik. A „Probiotikumok és az antibiotikumok kapcsolata” fejezetben kifejtettem, hogy sajnos ezen szerek túlzott és visszaélészerű használata kettős problémához vezethet, amely káros következményekkel járhat a fogyasztók egészségére nézve: az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia és az antibiotikum-maradványok jelenléte az élelmiszerekben. A probiotikumok használata sok esetben megfelelő alternatíva lehet e problémák leküzdésére, mivel képesek az immunrendszer és a mikrobiom modulálására, továbbá bizonyos patogén baktériumokkal szemben antagonista szerepet töltenek be, valamint takarmány-adalékanyagként alkalmazva képesek növekedési faktorként működni (Arsène et al., 2021).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált anyagok és oldatok összetétele

4.1.1. Alkalmazott oldatok

MRS (Man, Rogosa és Sharpe) tápleves/tápagar

10 db tejsavbaktérium törzssel dolgoztam, amelyeket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Élelmiszerbiotechnológia Kutatócsoportja izolált és azonosított. Az alkalmazott tejsavbaktérium törzsek felszaporításához MRS táplevest és tápagart használtam, mivel szelektivitása miatt tejsavbaktériumok izolálására használják.

55,2 g MRS-t mértem be táramérlegemmel és 1000 ml desztillált vízhez adtam, majd túlnyomásos gőzzel történő sterilizálás érdekében 121 °C-on 108 kPa nyomáson autoklávoztam az elkészített táplevest és tápközeget.

1. táblázat: MRS táptalaj és tápleves összetétele

ÖSSZETEVŐK	MENNYISÉG
Enzimatikusan emésztett kazein	10,00 g
Húskivonat	10,00 g
Élesztőkivonat	5,00 g
Glükóz	20,00 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	2,00 g
Nátrium-acetát	5,00 g
Triammónium-citrát	2,00 g
MgSO ₄	0,20 g
MnSO ₄	0,05 g
Tween80	1,08 g
Desztillált víz	1000 ml

Pepton víz

A folyékony, nem szelektív közeget főleg hígításra alkalmazzák, így a kísérleteimhez kimértem 1 g pepton (emésztett húskivonatot) és 9 g NaCl-t 1 liter desztillált vízhez. Az elkészített oldatot autoklávban sterilizáltam.

2. táblázat: A peptonvíz összetétele

ÖSSZETEVŐK	KIMÉRT MENNYISÉG
Pepton	1 g
NaCl	9 g
Desztillált víz	1000 ml

4.1.2. Az emésztőrendszer modellezéséhez alkalmazott oldatok

Epesav oldat

Gallmet-Mix epesavas kapszula alkalmazásával 0,3%-os pH = 6,4-es oldatot hoztam létre, amely reprezentálja az emberi vékonybél környezeti körülményeit. Az elkészített oldatot autoklávban sterilizáltam.

Gyomorsav oldat

Az emberi gyomor körülményeit modellező oldathoz MRS tápleves pH értékét 2-re állítottam 5 M-os HCl (hidrogén-klorid) segítségével. Az elkészített oldatot autoklávban sterilizáltam, majd ellenőriztem a pH-t.

4.2. Alkalmazott módszerek

4.2.1. *Lactococcus* és *Lactocaseibacillus* törzsek felélesztése

A -20°C-on tárolt tejsavbaktérium törzseket a kísérletek előtt 48 órán át 37°C-on inkubáltam, amihez előzőleg autoklávban sterilizált MRS táplevest használtam. Gyomor- és epesavas minták beoltása előtt a felszaporodott sejteket tartalmazó kémcsövet vortexeltem a sejtek egyenletesebb eloszlása érdekében.

4.2.2. Bürker-kamrás sejtszámlálás

A különböző törzsek friss folyadéktenyészetéből a Bürker kamra üveglapjára pipettáztam, majd 40x-es nagyításon fénymikroszkópban 10 db kisalakú négyzetben leszámláltam a

sejtszámokat, amelyeket átlagoltam. Ezt követően megszoroztam az átlagokat $4 \cdot 10^6$ -nal, így megkapva 1 ml szuszpenzió sejtszámát.

4.2.3. Emésztési vizsgálatok

A tejsavbaktérium sejtek túlélő képességét in vitro körülmények között vizsgáltam. Ehhez a gyomor-béltraktus közegét modelleztem. A gyomorsavas vizsgálat pH 2-es értéken 2 óráig, míg az epesavas kísérlet 8 óráig tartott.

Epesav túrési teszt

Az epesavas kezeléshez a törzsek friss folyadéktenyészeit vortexeltem, majd a 0. időpillanatban 1 ml-t adtam a megfelelő epesav koncentrációra beállított MRS táplevest tartalmazó kémcsövekhez belőlük. A beoltás pillanatát követően közvetlenül, majd pedig két óránként 8 órán keresztül 1-1 ml mintát vettem ki (összesen 5 alkalommal), amikből decimális hígítási sort készítettem. Az egyes tagokból 3-3 db MRS lemez felületére szélesztettem 100-100 μ l-t. 48 órás 37°C-on történő inkubációt követően megszámloltam a telepeket a lemezeken, és ebből következtetést tudtam levonni, hogy az epesav kitétség milyen hatással volt a baktériumtörzsek sejtszámára az időtartam függvényében.

Gyomorsav túrési teszt

Gyomorsavas közegben való vizsgálathoz az előre hidrogén-kloriddal pH 2 értékre beállított MRS táplevesbe beoltottam a vizsgálandó baktériumtörzset. A beoltás pillanata után közvetlenül, majd pedig 30, 60, 90 és 120 percnél 1-1 ml mintát vettem (összesen 5 alkalommal), amikből decimális hígítási sort készítettem. Az egyes tagokból ismét 3-3 db MRS lemez felületére szélesztettem 100-100 μ l-t. 48 órás 37°C-os inkubációt követően megszámloltam a lemezen kinőtt telepeket, és ebből megtudtam, hogy a 2-es pH milyen hatással volt a baktériumtörzsek sejtszámára a kitétség időtartamának függvényében.

4.2.4. Sejtszám meghatározása

A baktérium szuszpenziókból decimális hígítási sort készítettem. A megfelelő hígítási tagokból MRS lemez felületére szélesztettem 100-100 μ l-t. A Petri-csészéken kinőtt baktériumtelepeket az inkubációt követően megszámloltam.

$$\text{Sejtszám} \left[\frac{TKE}{ml} \right] = \text{telepszám} * \text{hígítási tag} * \text{szélesztés}$$

4.2.5. Savtolerancia meghatározása

A törzsek túlélési képességét savas körülmények között vizsgáltam pH 6,4 és pH 2 értékek mellett. Az inkubálás utáni életképes telepek számát a kiindulási sejtszámhoz képest az alábbi képlet szerint fejeztem ki:

$$\text{Túlélési arány \%} = \frac{\text{Túlélt sejtszám } [\log\left(\frac{TKE}{ml}\right)]}{\text{Kiindulási sejtszám } [\log\left(\frac{TKE}{ml}\right)]} * 100$$

Bán Fanni - Szakdolgozat

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Bürker kamrás sejtszámlálás eredményei

3. táblázat: Vizsgált törzsek kiindulási sejtszámai Bürker kamrás számolással

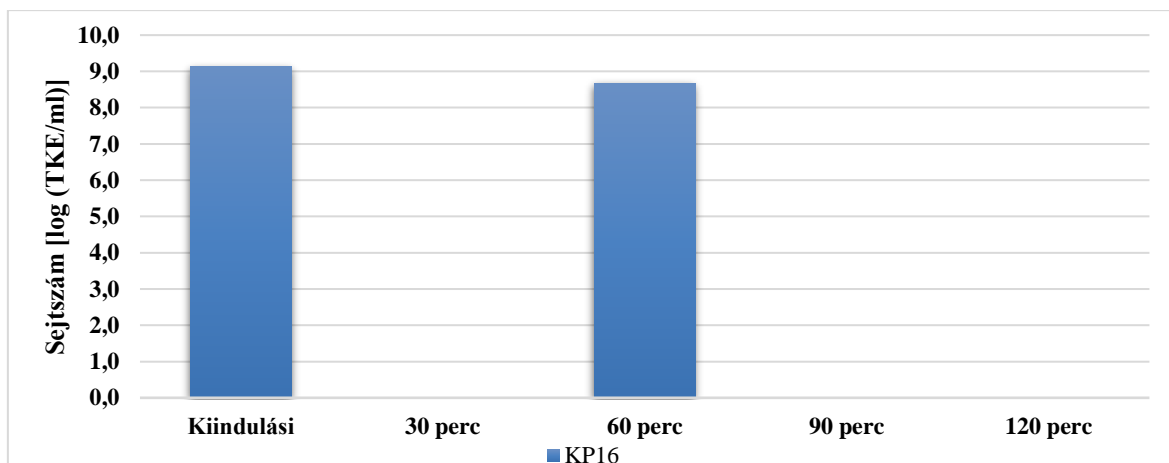
Baktériumtörzsek	Vizsgált törzsek	Kiindulási sejtszám (TKE/ml)
<i>Lactococcus garvieae</i>	KP16	$1,36 \cdot 10^8$
<i>Lactococcus</i>	KP28	$8,56 \cdot 10^7$
<i>Lactococcus garvieae</i>	KP66	$5,24 \cdot 10^7$
<i>Lactococcus lactis</i>	MA11	$1,03 \cdot 10^8$
	MA75	$1,11 \cdot 10^8$
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	MA27	$1,37 \cdot 10^8$
	MA32	$8,56 \cdot 10^7$
	MA33	$5,27 \cdot 10^7$
	MA34	$1,03 \cdot 10^8$
	MA35	$1,11 \cdot 10^8$

5.2. *Lactococcus* nemzetség emésztési vizsgálatai

5.2.1. *Lactococcus garvieae* eredményei

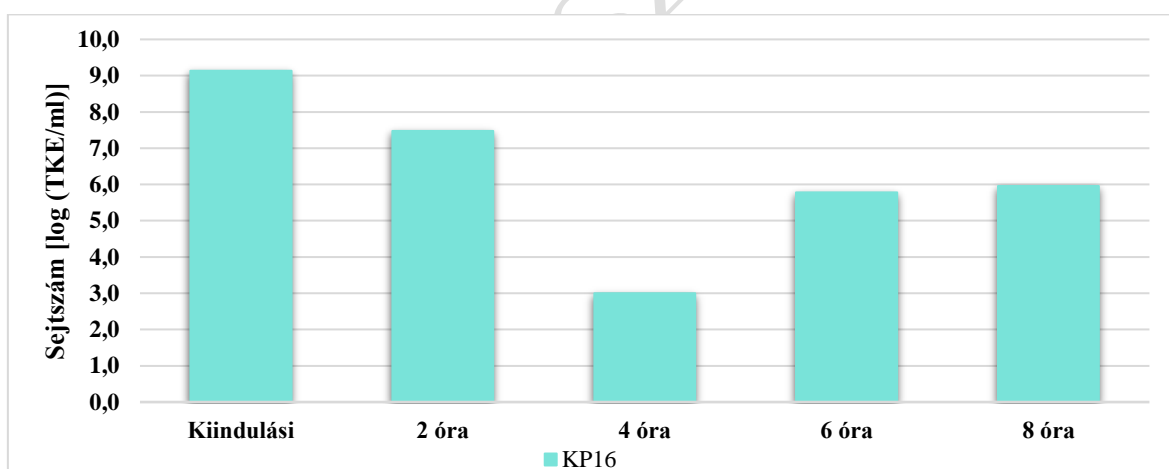
▪ KP16 törzs vizsgálata

A gyomorsavas vizsgálat során csak a kiindulási mintában voltak életképes sejtek, illetve a 60. percben vett mintában (2. ábra). Az, hogy a 30. percben vett mintában egyáltalán nem voltak osztódásra képes sejtek, míg a 60. percben vettben igen, arra enged következtetni, hogy a kísérlet során valami hiba történt. Lehetséges, hogy e törzs esetében véletlenül elmaradt a vortexelés vagy esetleg a mintából mégsem sikerült a tápagar felszínére széleszteni. A 90. illetve a 120. percben vett minták esetében viszont már lehetséges, hogy a gyomorsavnak való ilyen hosszú kitettség okozta a sejtek pusztulását. Egyetlen egy mintában számoltam túlélő sejteket, viszont mivel ez a Petri-csésze befertőződött, emiatt az adatok nem használhatóak.



2. ábra: KP16 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

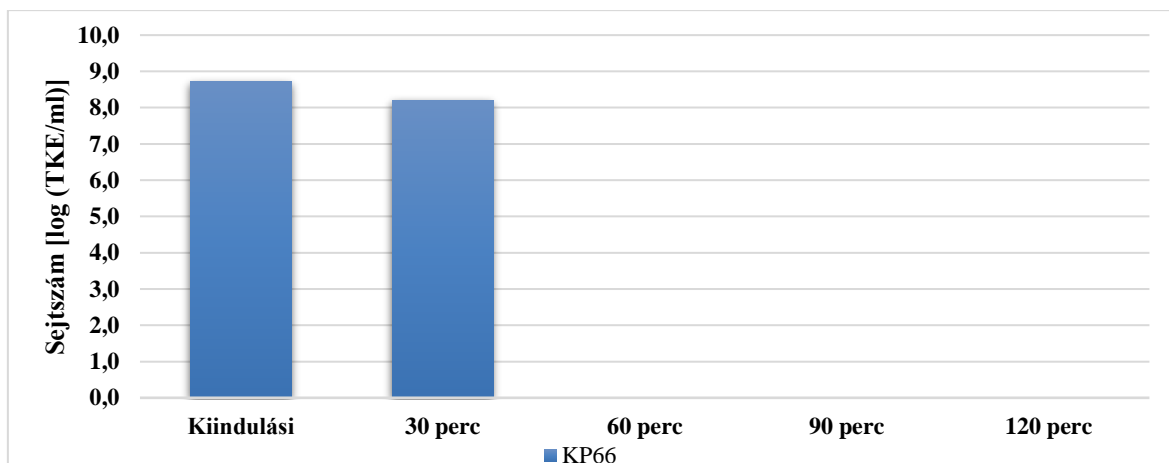
A 3. ábrán látható, hogy az epesavas vizsgálat során az osztódóképes sejtek száma 2 óra elteltével is alig, majd a 4 órás mintavételt követően számuk már észrevehetően csökkent, viszont összességében megállapítható, hogy a 8 órás kísérlet végén is még $3,0 \cdot 10^7$ TKE/ml sejtszámot kaptam. A kiindulási $1,39 \cdot 10^9$ TKE/ml sejtszámhoz képest a sejtek 81,88 %-a így is életképes maradt (3. és 30. ábra). A kiugróan alacsony sejtszámú 4. órás minta valószínűleg a nem elég alapos vortexelésnek tudható be.



3. ábra: KP16 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ KP66 törzs vizsgálata

A gyomorsavas vizsgálat során az első mintavételig a baktériumsejtek kifejezetten nagy része maradt életképes, mivel a 30. percen vett minta $1,60 \cdot 10^8$ TKE/ml-es sejtszáma, kevesebb, mint 10%-kal csökkent a kiindulási minta $5,27 \cdot 10^8$ TKE/ml sejtszámához képest (4. ábra). A sejtek túlélési aránya 91,82 % volt. Sajnos a sejtek az erős savas közegnek már nem tudtak ellenállni hosszabb ideig és a 60. percen vett mintából már nem lehetett osztódó sejteket kimutatni (29. ábra).



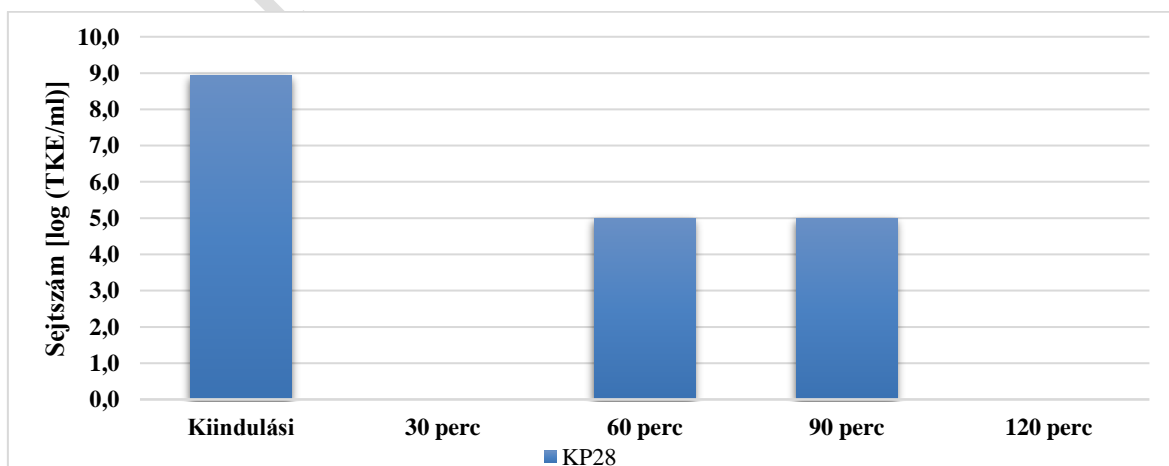
4. ábra: KP66 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

Az epesavas vizsgálat nem egy időben zajlott a gyomorsavassal, előbbinél a törzs nem élelt fel a vizsgálat előtt, így a kísérletet nem tudtam elvégezni.

5.2.2. *Lactococcus formosensis* eredményei

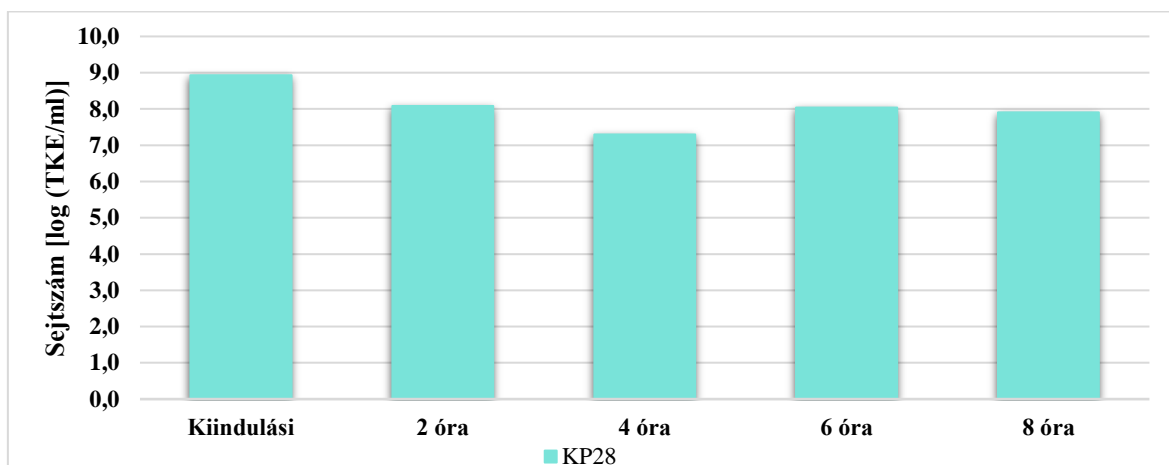
▪ KP28 törzs vizsgálata

A gyomorsavas vizsgálat során csak a 60. ($1,00 \cdot 10^5$ TKE/ml) és a 90. percben ($1,00 \cdot 10^5$ TKE/ml) vett minta esetében tudtam baktériumtelepeket számolni közel 56%-os (55,99%) túlélési aránnyal (5. és 29. ábra). Viszont a 30. percben vett minta befertőződött, ezért nem voltak számolhatóak a telepek. Az eredmények alapján látható, hogy az életképes sejtek száma a savas közegnek való kitettség hosszának növekedésével csökkent és a 120. percben már nem is voltak kimutathatóak.



5. ábra: KP28 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

Az epesavas vizsgálat során, ahogy a 6. ábrán is jól látszik, a *Lactococcus formosensis* törzs rendkívül jól teljesített. Az összes mintavételi időpontban bőven szaporodóképesnek bizonyult, és alig csökkent a sejtszáma a kiindulási értékhez képest, hozzávetőleg egy nagyságrendet csökkent a sejtszám a kísérlet végére. A baktériumsejtek jelentős része túlélte a vékonybelet reprezentáló közeget. 8 órás mintánál 88,44 %-a maradt osztódó képes a sejteknek ($8,00 \cdot 10^7$ TKE/ml) a kiindulási értékhez ($8,56 \cdot 10^8$ TKE/ml) képest (30. ábra).

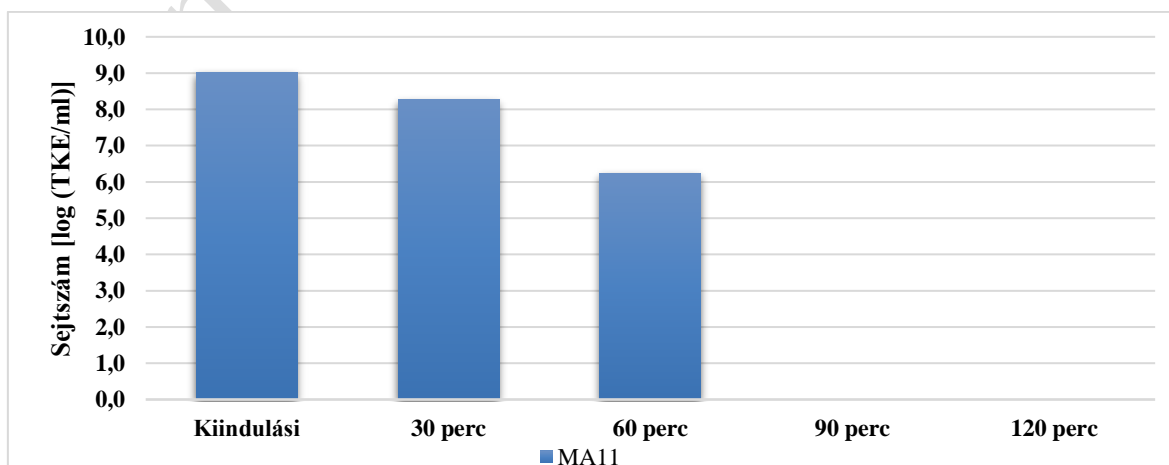


6. ábra: KP28 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

5.2.3. *Lactococcus lactis* eredményei

▪ MA11 törzs vizsgálata

A gyomorsavas vizsgálat során csak a 30. ($1,82 \cdot 10^8$ TKE/ml) és a 60. percben ($1,70 \cdot 10^6$ TKE/ml) vett mintából nőttek ki baktériumsejtek a tápagar felszínén (7., 8. és 9 ábra). 69,15%-a maradt életképes a kiinduláskor számolt baktériumsejteknek a 60. percnél vett minta eredményei alapján (29. ábra). Folyamatosan csökkenő tendenciát figyelhettem meg, mert a sejtek pusztulni kezdtek. Az eredmények a 7., 10. és 11. ábrán láthatóak.

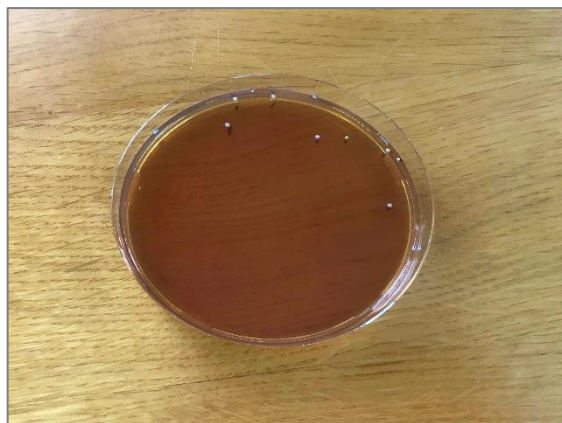


7. ábra: MA11 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

A 8., 9., 10. és 11. ábrán a *Lactococcus lactis* MA11 törzs esetében mind a 4 időpontban vett minták inkubációt követő eredményei láthatók. A 30. és a 60. percben vett mintavételt követően az életképes sejtek telepeket képeztek, amelyek révén meghatározható volt a sejtszám (7. ábra).



8. ábra: MA11 törzs 30 perc utáni mintavétele gyomorsavas közegben



9. ábra: MA11 törzs 60 perc utáni mintavétele gyomorsavas közegben

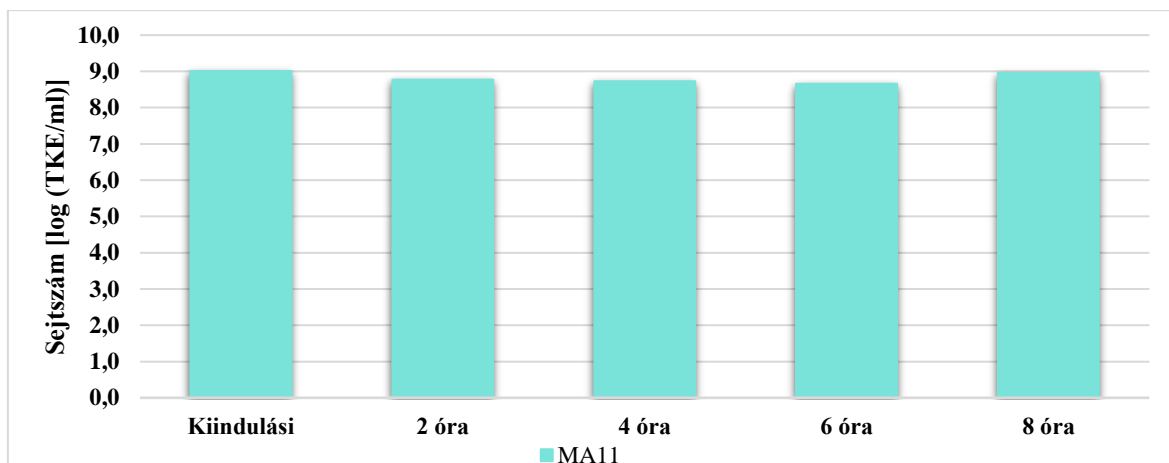


10. ábra: MA11 törzs 90 perc utáni mintavétele gyomorsavas közegben



11. ábra: MA11 törzs 120 perc utáni mintavétele gyomorsavas közegben

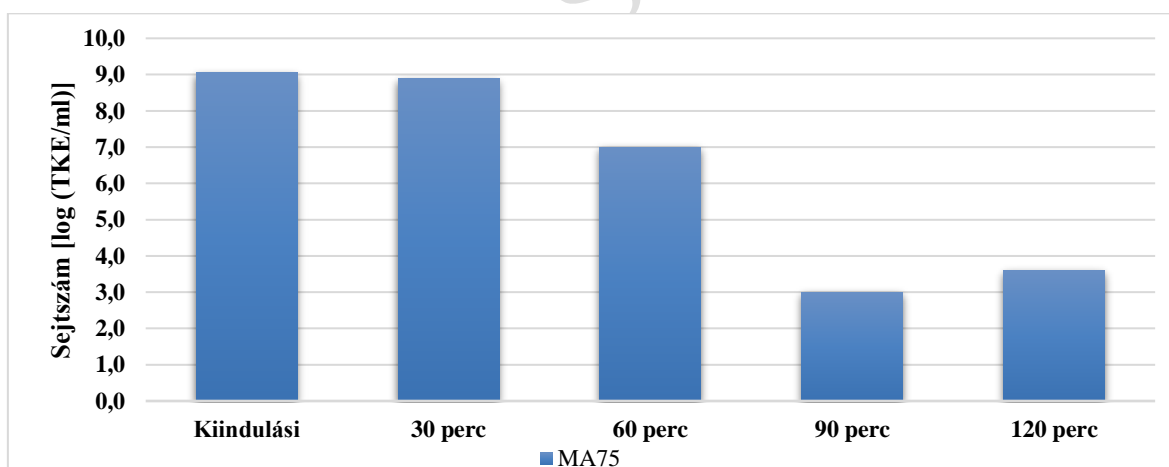
Az epesavas vizsgálat során, ahogy a 12. ábrán látható a *Lactococcus lactis* törzs sejtszáma számottevően nem változott, és alig csökkent a sejtszám a kiindulási $1,03 \cdot 10^9$ TKE/ml sejtszám értékhez képest. A baktériumsejtek jelentős része túlélte a vékonybelet reprezentáló közeget, a sejtek 99,3%-a továbbra is életképes maradt (30. ábra). Az utolsó mintavételezésnél $9,00 \cdot 10^8$ TKE/ml volt a sejtszám.



12. ábra: MA11 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

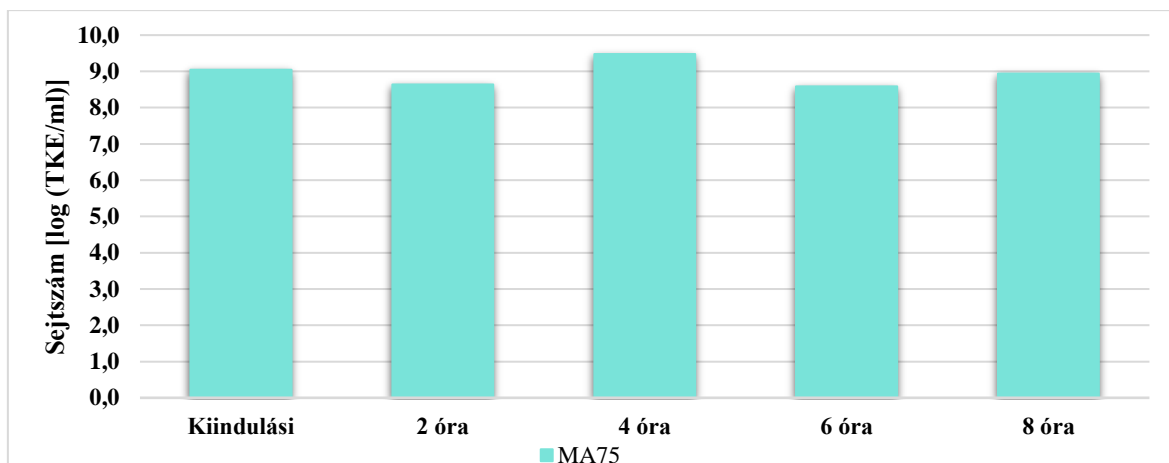
▪ MA75 törzs vizsgálata

A gyomorsavas vizsgálat során egészen a 60. percig egészen magas, $1,00 \cdot 10^7$ TKE/ml-es sejtszám mutatkozott, ami hirtelen $1,00 \cdot 10^3$ TKE/ml-re esett vissza a 90. percnél (13. ábra). A 120. percen vett mintánál már $4,00 \cdot 10^3$ TKE/ml volt, vagyis számottevő mértékben, 4 nagyságrenddel csökkent a számuk az erős gyomorsav hatására, a 60. percnél mérthez képest. Így végül 39,82%-os aránnyal élték túl a kísérletet (29. ábra).



13. ábra: MA75 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

A *Lactococcus lactis* törzs kiindulási $1,11 \cdot 10^9$ TKE/ml-es sejtszámához képest 8 óra elteltével is 98,84%-os aránnyal $8,70 \cdot 10^8$ TKE/ml sejt élte túl az epesavas közeget (14. és 30. ábra). Az eredmények alapján elmondható, hogy az epesav számottevően nem volt hatással az osztódó sejtek számára. Ezért kijelenthetjük, hogy a gyomorsav hatásával összehasonlítva a *Lactococcus lactis* törzsek sejtjei ellenállóbbnak bizonyultak az epesavval szemben.



14. ábra: MA75 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

Drouault és munkatársai (1999) kísérleteiben *Lactococcus lactis*-t in vitro vizsgálat során gyomor- és nyombéltiszta kivonatokban inkubálták 30 percig, 60 percig, 90 percig és 120 percig a mintákat. A vizsgált *Lactococcus lactis* életképessége 90%-nál magasabb arányt ért el a gyomor-, míg csak 3%-ot a nyombélkivonatokban, függetlenül az inkubáció idejétől. 60 perc elteltével a mikroszkóppal elemzett gyomorkivonatban talált ép sejtek aránya 89% volt, a nyombél 9%-ával szemben. Ezeken felül megvizsgálták, hogy a *Lactococcus lactis* szervezetbe kerülésének módja jelentős hatással bír a baktériumok túlélési arányára. Míg a tiszta baktérium tenyészet kényszertáplálással történő bevitele esetén az emésztőrendszer minden szakaszában tömeges lízishez vezetett, addig az emberi emésztést stimuláló eljárás során a táplálékkal kevert *Lactococcus lactis* kiválóan életben maradt a gyomorban, és életképessége a nyombélben jelentősen megnövekedett. Ez az eredmény arra világított rá, hogy az élelmiszerek fontos védőhatást gyakorolnak az étrendben jelenlévő baktériumokra, azáltal, hogy egy olyan pufferhatást fejtenek ki, amely megvédi a baktériumokat a gyomorváladék okozta savasságtól (Drouault et al., 1999).

5.2.4. *Lactococcus* törzsek emésztéses vizsgálatainak eredményei

Gyomorsavas közeg

Drouault és munkatársai (1999) kísérleteinek eredményei épp azt tükrözték, hogy a *Lactococcus* törzsek sejtjei az erős gyomorsavas közeget feltűnően jobban bírták, mint a nyombélben lévő körülményeket, ahová az epesavak kiválasztódnak. 60 perc elteltével 89%-os volt a túlélő sejtek száma, míg ez az én kísérletemben *Lactococcus lactis* MA11 törzs esetében 69,15% (7. és 29. ábra), MA75 törzs esetében pedig 77,43% volt (13. és 29. ábra). A többi általam vizsgált *Lactococcus* törzsnél eltérő eredményeket kaptam: *Lactococcus formosensis* KP28 törzsnél bár a 30. perc után egyetlen egy élő sejtet sem tudtam megszámolni (valószínűleg mintavételezési hiba miatt), a 60. percnél 56%-os túlélési aránnyal kaptam eredményt (5. ábra). *Lactococcus garvieae* esetében, a KP66 törzsnél 30 perc elteltével a sejtek túlélési aránya 91,82 % volt, viszont a 60. percen vett mintából már nem lehetett életképes sejteket kimutatni (4. ábra). A KP16-os törzs esetében a mintavételezési hiba miatt a 30. percnél nem tudtam élő sejteket számolni, viszont a 60. percen 94,85%-os volt a túlélő sejtek száma (2. ábra).

A *Lactococcus*-ok közül a *Lactococcus lactis* bizonyult a legellenállóbb baktériumtörzsnek. Legjobb eredményeket a MA75 törzs vizsgálata során kaptam, mivel ez volt az egyetlen minta, amelynél még 2 óra múlva is 39,82%-os volt a túlélő sejtek aránya a kiindulási sejttséghez képest (13. ábra). Drouault és munkatársai (1999) további kísérlete során már nem injektálva, hanem táplálékkal juttatták be a baktériumkoncentrációt, és így megállapították, hogy a táplálék döntő szerepet játszik a pufferhatás kialakulása miatt a sejtek túlélésében. Ezért probiotikumként alkalmazva mindenképp étkezéssel történő fogyasztással javasolnám, hogy a sejteket minél jobban megóvhassuk a gyomorváladék savasságától. A túlélő sejtek százalékos arányát gyomorsavas közegben a 29. ábra eredményei szemléltetik.

Epesavas közeg

A nyombél kezdetén már a 8 órás intervallum utáni *Lactococcus lactis* eredményeim MA11 törzsnél 99,3% (12. ábra); MA75 törzsnél 98,85% (14. ábra) is figyelemreméltóan jobbak voltak, mint Drouault és munkatársai (1999) drasztikusan alacsonyabbnak bizonyult (9%-os) 60 perc után kapott eredménye. A többi törzs eredményével összehasonlítva, a *Lactococcus garvieae* KP16-nál 65,17%-os (3. ábra), a *Lactococcus formosensis* KP28-nál

pedig 88,44%-os (6. ábra) túléltséget kaptam. A kiindulási sejtszámokhoz mérve a 8 órás epesavas kitérés után túlélő sejtszámokat a 4. táblázat, míg az epesavas közeg hatására a túléltséget a 30. ábra szemlélteti.

4. táblázat: *Lactococcus* törzsek kiindulási és kísérlet utáni túléltségi sejtszámai epesavas közegben

<i>Lactococcus</i> törzsek	Kiindulási sejtszámok (TKE/ml)	Túléltségi sejtszámok (TKE/ml)
KP16	$1,36 \cdot 10^9$	$3,00 \cdot 10^7$
KP66	$5,24 \cdot 10^8$	-
KP28	$8,56 \cdot 10^8$	$8,00 \cdot 10^7$
MA11	$1,03 \cdot 10^9$	$9,00 \cdot 10^8$
MA75	$1,11 \cdot 10^9$	$8,70 \cdot 10^8$

5.3. *Lactobacillus* nemzetség emésztési vizsgálatai

5.3.1. *Lactocaseibacillus paracasei* gyomorsavas eredményei

A gyomorsavas vizsgálat során a *Lactococcus* törzsekhez képest sokkal jobb eredményeket kaptam. Hozzávetőlegesen mindegyik törzs sejtszáma a 90. és a 120. percnél kezdett el alig észrevehetően csökkenni. De a túlélő sejtszámok alapján még mindig rendkívül jó eredményeket mutattak. Legjobb eredményt a MA34 törzsnél tapasztaltam, 87,68%-os túlélési aránnyal (18. ábra). Nem sokkal volt kevesebb túlélő sejtszám a MA35-nél (71,0%) és a MA27-nél (70,12%) sem, ezeket az eredményeket a 19. és a 15. ábra szemlélteti. Legkevesebb életképes baktériumsejtet a MA32 törzs esetében számoltam, 59,35%-os túlélési aránnyal, a kiindulási $8,56 \cdot 10^8$ TKE/ml sejthez képest 120 perc elteltével a túléltséget $2,00 \cdot 10^5$ TKE/ml sejtszámmal (16. ábra). A legnagyobb csökkenés is maximum három nagyságrend volt a kiindulási sejtszámhoz képest, ezt az 5. táblázat eredményein láthatjuk.

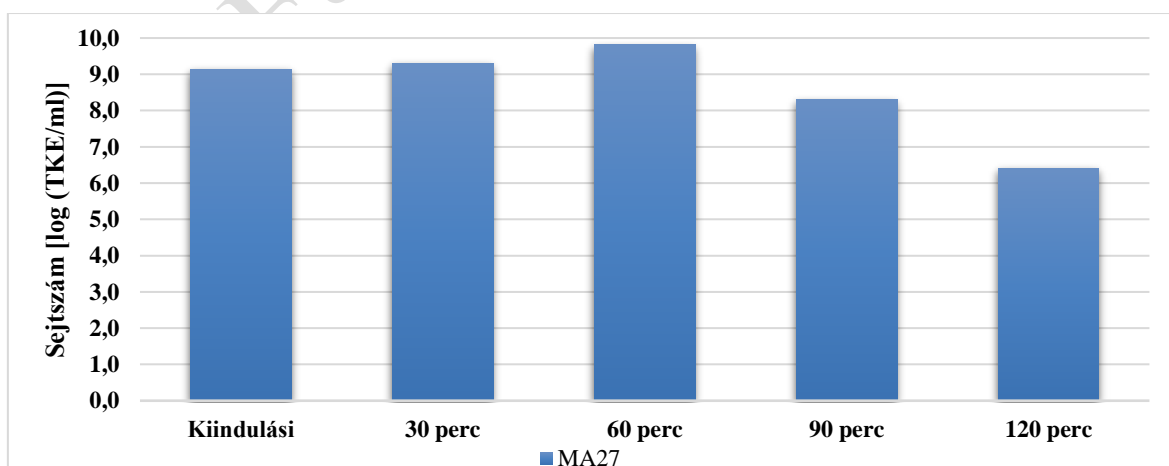
Corcoran és munkatársai (2005) kísérletében öt különböző *Lactobacillus* törzs túlélését hasonlították össze szimulált gyomornedvben, pH 2,0 értéken 90 percig. A *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 törzs esetében azt figyelték meg, hogy a 30 perces expozíció után

kimutathatatlan szintre csökkent a sejtszám. Összeségében az adatok azt mutatták, hogy a *Lactobacillus* fajok túlélési aránya különbözik, és a különbségek törzs szintjén mutatkoznak meg. Bár a *Lactobacillus*-okat savellenálló mikroorganizmusoknak tekintik, erős savas 3,0 alatti pH érték alatt már érzékenységet mutathatnak. Ezt kutatásuk igazolta a *Lactocaseibacillus paracasei* törzsnél, viszont vizsgálataim során én nem tapasztaltam ilyen mértékű sejtszám csökkenést egyik általam vizsgált törzs esetében sem (Corcoran et al., 2005).

5. táblázat: *Lactocaseibacillus paracasei* törzsek 0. perces és 120. perces sejtszámai gyomorsavas közegben

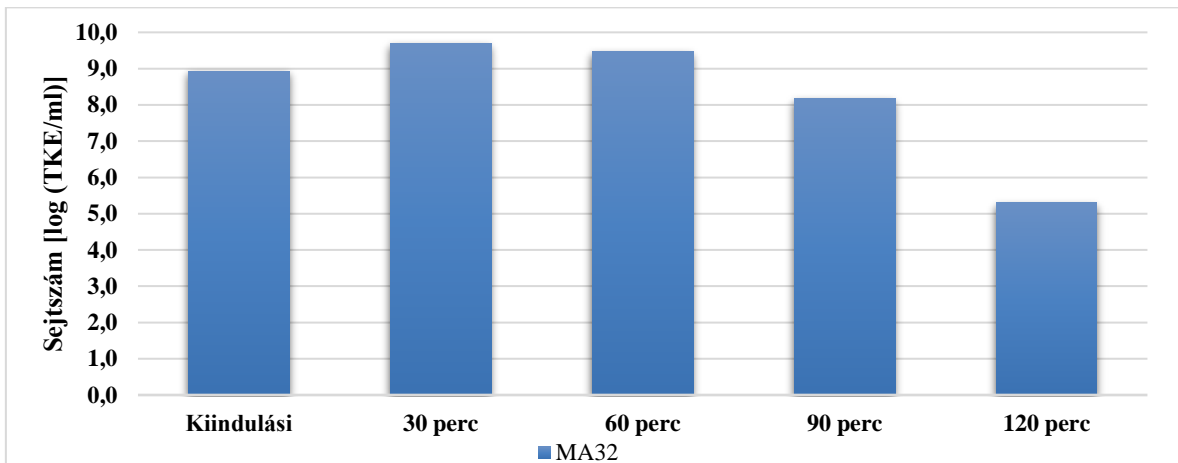
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> törzsek	Kiindulási sejtszámok (TKE/ml)	Túlélt sejtszámok (TKE/ml)
MA27	$1,37 \cdot 10^9$	$2,60 \cdot 10^6$
MA32	$8,56 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^5$
MA33	$5,27 \cdot 10^8$	$2,42 \cdot 10^5$
MA34	$1,03 \cdot 10^9$	$8,00 \cdot 10^7$
MA35	$1,11 \cdot 10^9$	$2,60 \cdot 10^6$

▪ MA27 törzs vizsgálata



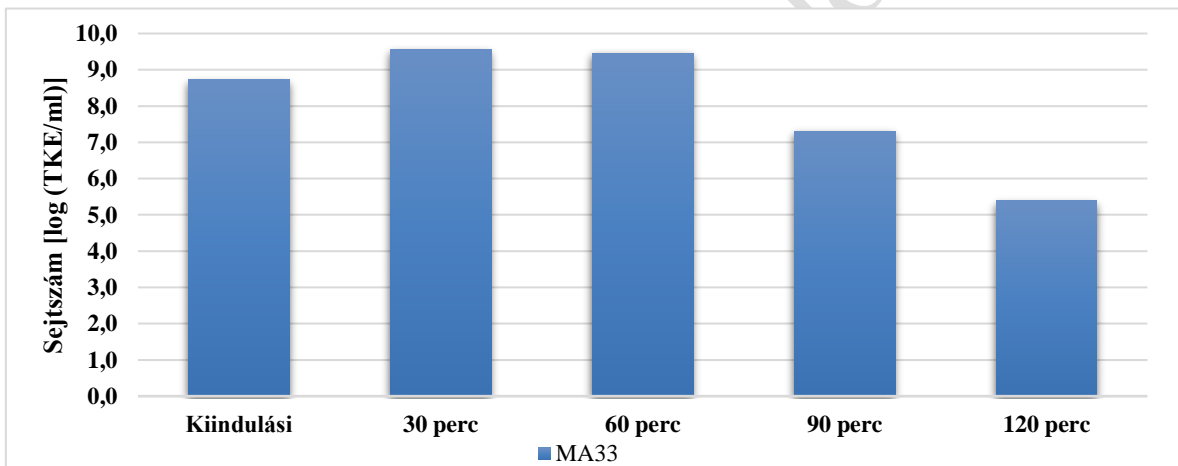
15. ábra: MA27 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ **MA32 minta vizsgálata**



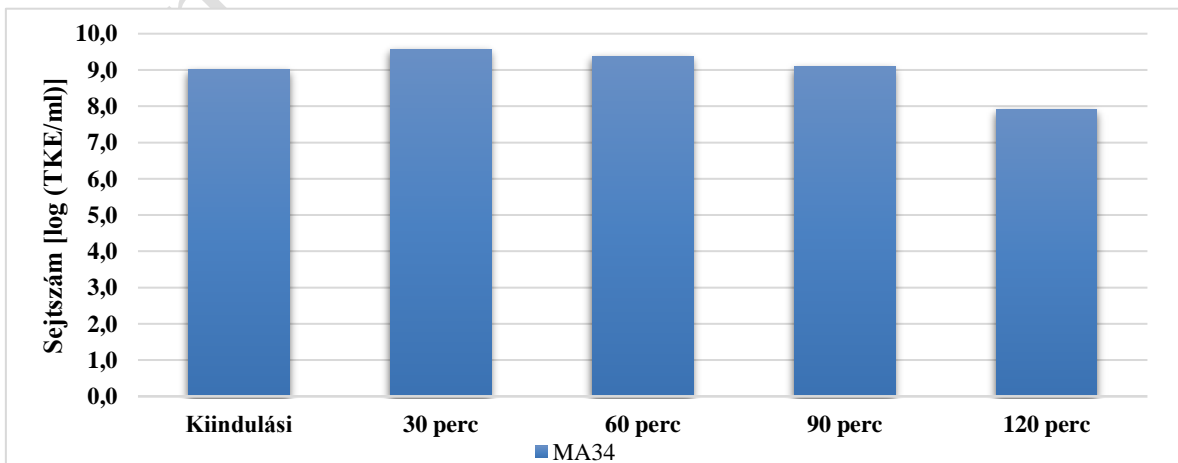
16. ábra: MA32 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ **MA33 törzs vizsgálata**



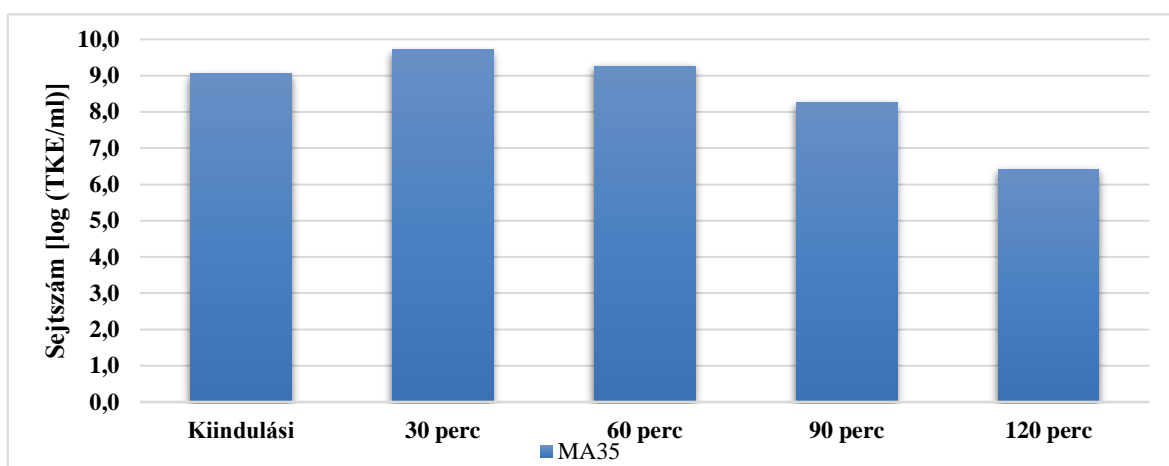
17. ábra: MA33 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ **MA34 törzs vizsgálata**



18. ábra: MA34 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ MA35 törzs vizsgálata



19. ábra: MA35 gyomorsavas kezelés során vett mintavételek eredményei

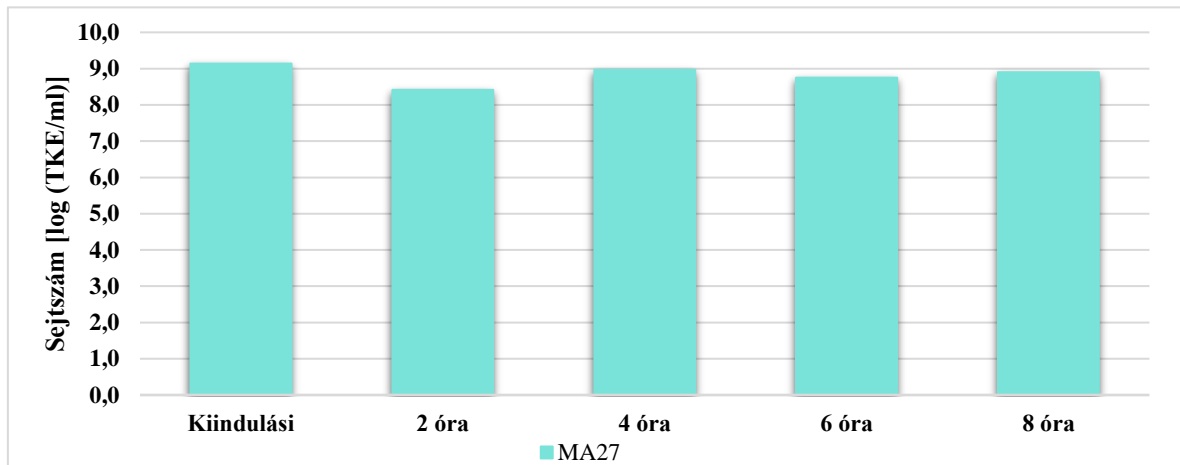
5.3.2. *Lactocaseibacillus paracasei* epesavas eredményei

Az epesavas vizsgálat során konstansnak mondhatók a sejtszámok, és a kísérletek végén, kifejezetten kitűnő túlélési arányokat számolhattam. A MA32 és MA33 törzseknél a kiindulási sejtszámokat is felülmúló (MA32 – $8,56 \cdot 10^8$ TKE/ml; MA33 – $5,27 \cdot 10^8$ TKE/ml) eredményeket kaptam. 8 óra elteltével a túlélési arány a MA32 törzs esetében 101,98%-os volt, $1,28 \cdot 10^9$ TKE/ml sejtszámmal, míg a MA33 törzsnél 105,0%-os $1,42 \cdot 10^9$ TKE/ml sejtszámmal (21. és 22. ábra eredményei). A másik három törzs (MA27, MA34, MA35) szintűgy eredményesnek bizonyult, majdnem 100%-os (97,42%; 97,29%; 99,84%) túlélési aránnyal (20., 23., 24. és 30. ábra adatai). A kiindulási sejtszámokhoz mérve a 8 órás epesavas kitettséget túlélő sejtszámokat a 6. táblázat szemlélteti.

6. táblázat: *Lactocaseibacillus paracasei* törzsek 0. perces és 8 órás sejtszámai epesavas közegben

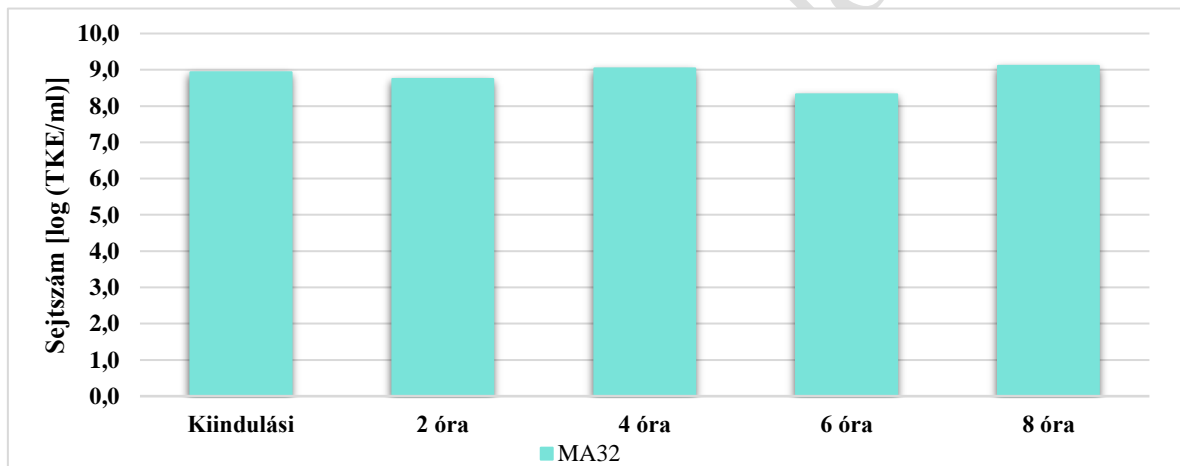
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> törzsek	Kiindulási sejtszámok (TKE/ml)	Túlélt sejtszámok (TKE/ml)
MA27	$1,37 \cdot 10^9$	$7,90 \cdot 10^8$
MA32	$8,56 \cdot 10^8$	$1,28 \cdot 10^9$
MA33	$5,27 \cdot 10^8$	$1,42 \cdot 10^9$
MA34	$1,03 \cdot 10^9$	$5,90 \cdot 10^8$
MA35	$1,11 \cdot 10^9$	$1,07 \cdot 10^9$

▪ **MA27 törzs vizsgálata**



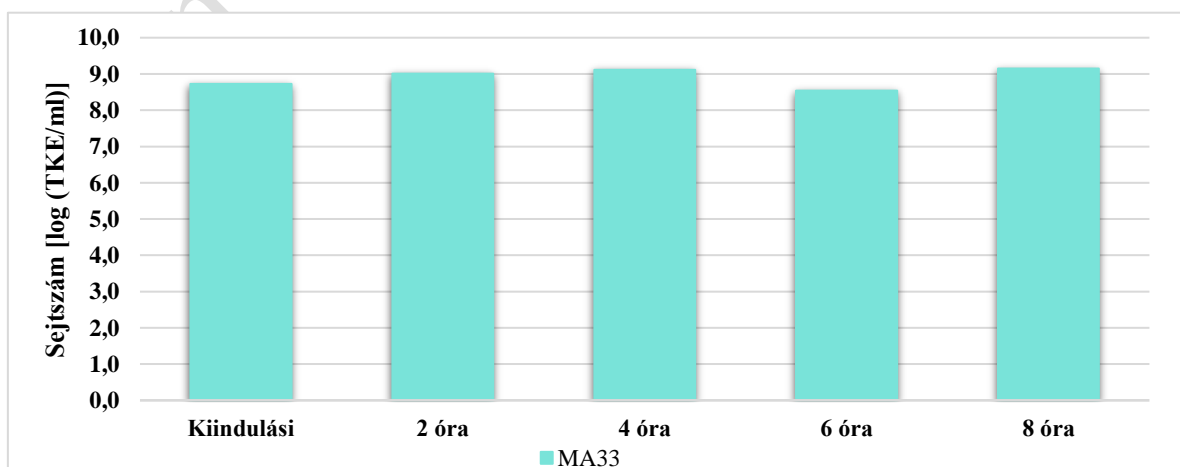
20. ábra: MA27 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ **MA32 törzs vizsgálata**



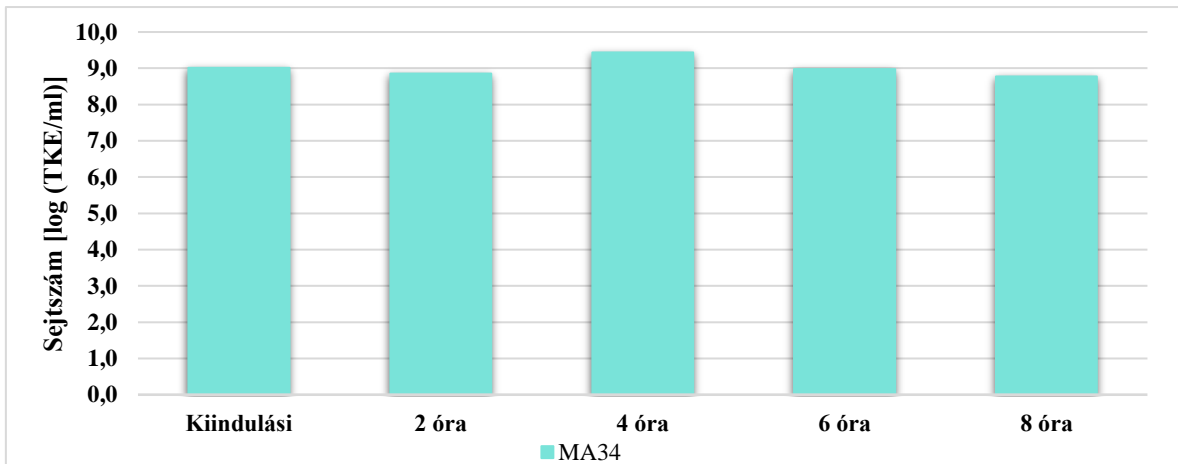
21. ábra: MA32 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ **MA33 törzs vizsgálata**



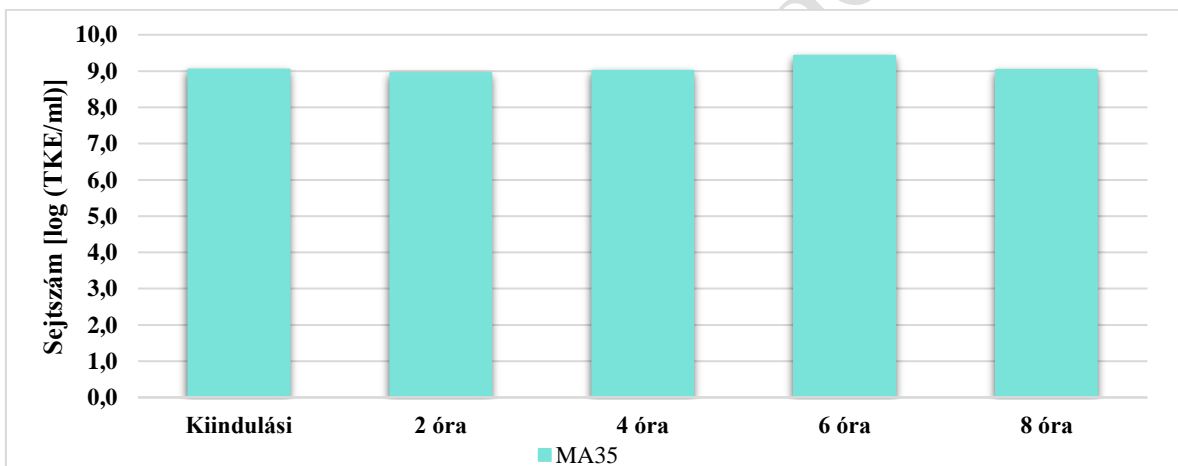
22. ábra: MA33 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ **MA34 törzs vizsgálata**

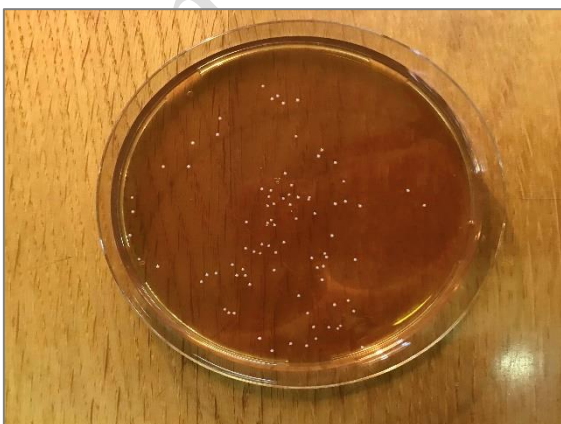


23. ábra: MA34 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei

▪ **MA35 törzs vizsgálata**



24. ábra: MA35 epesavas kezelés során vett mintavételek eredményei



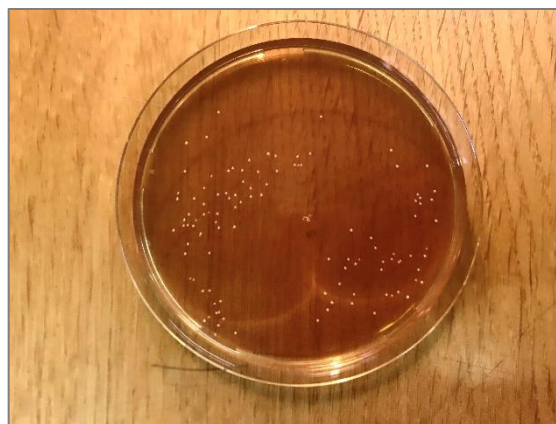
25. ábra: MA35 törzs 2 óra utáni mintavétele epesavas közegben



26. ábra: MA35 törzs 4 óra utáni mintavétele epesavas közegben



27. ábra: MA35 törzs 6 óra utáni mintavétele
epesavas közegben



28. ábra: MA35 törzs 8 óra utáni mintavétele
epesavas közegben

Lactocaseibacillus paracasei MA35 törzsének mind a 4 időpontban vett minták inkubációt követő eredményei láthatók a 25., 26., 27. és 28. ábrán. A törzs rendkívül jó túlélőképessége miatt a 2., a 4., a 6. és a 8. órában vett mintavételt követően az életképes sejtek telepeket képeztek, amelyek révén meghatározható volt a sejtszám (24. ábra).

5.4. Eredmények összegzése

Lactococcus nemzetség

Gyomorsavas vizsgálat során az általam vizsgált *Lactococcus* nemzetségbe tartozó törzsek kevésbé bizonyultak ellenállóknak, szemben Drouault és munkatársai (1999) eredményeivel. Kísérletem során a modellezett gastrointestinális tér hatásaival szemben nem alkalmaztam olyan módszereket, amelyek védelmi funkciójukat betöltve elősegítették volna a baktériumsejtek túlélési arányának növekedését. Drouault és munkatársai (1999) gyomorsavas vizsgálata során kapott 89%-os túlélési arányát, a *Lactococcus lactis* MA75 törzs 60 perc után vett mintavételi eredményem közelítette meg a legjobban 77,43%-os túlélési aránnyal (13. ábra) nyombél. Ennél a törzsnél még 120 perc után is 39,82%-os eredményt számoltam, ami a 29. ábrán látható. Így a vizsgált *Lactococcus* nemzetségbe tartozó tejsavbaktériumok közül funkcionális tulajdonságainak további vizsgálatára ezt a törzset választanám. Ha további vizsgálatokat folytatnék nagy valószínűséggel alkalmaznám a kutató módszereit, és az élelmiszerek fontos védőhatását mikrokapszulázással reprezentálnám (Drouault et al., 1999).

Összességében viszont epesavas közegben a *Lactococcus* nemzetségnél kiemelkedően magas számban számolhattam túlélő baktériumtelepeket mind az öt törzs esetében (30. ábra). Szemben Drouault és munkatársai (1999) 9%-os eredményével, az általam kapott

eredmények a következők voltak túlélési arány tekintetében: *Lactococcus lactis* MA11 törzsnél 99,3% (12. ábra); MA75 törzsnél 98,85% (14. ábra); *Lactococcus formosensis* KP28 törzsnél 88,44% (6. ábra); és *Lactococcus garvieae* KP16 törzsnél 65,17% (3. ábra). Emiatt felmerült bennem egy olyan kezelés lehetősége, amelynél ezeket a probiotikus törzseket nem szájon át bevihető étrendkiegészítőként, hanem ezt kikerülve rögtön a bélrendszer közegébe juttatva segítenék elő túlélésüket és szaporodásukat. Napjainkban már nemzetközileg széles körben elfogadott kezelésnek minősül a székletmikrobióta-transzplantáció (faecalmikrobióta-transzplantáció – FMT), amelyet leggyakrabban a *Clostridium difficile* fertőzés (CDI) kezelésére alkalmaznak. A kezelések Magyarországon még kezdetlegesek, de annál nagyobb lehetőséggel bírhatnak a jövőre nézve. Egyik kiemelkedő előnye, hogy biztonságos, potenciálisan életmentő, költséghatékony, emellett jelentősen rövidíti a hospitalizációs időt és az orvos-beteg találkozások számát is. A *Clostridium difficile* magas kórházi letalitásához viszonyítva, a széklettranszplantáció rendkívül nagy hatékonyságú eljárás, amely során a beteg (recipiens) bélrendszerébe egy egészséges donorból készített székletszuszpenziót juttatnak. Az élő bélbaktériumok helyreállítják a beteg bélflóráját, ezzel eliminálva a CDI-t. Számos esetben ez a módszer szignifikánsan felülmúlta az antibiotikumterápia hatékonyságát, így európai és hazai irányelvek is ajánlják alkalmazását egyes esetek kezelésére. Mindemellett sikerrel alkalmazták például a colitis ulcerosa és az irritábilis bél-szindróma bizonyos eseteinek adjuváns terápiájára. A kedvező eredmények, továbbá egyes betegségek kialakulásában a mikrobiom szerepének egyre szélesebb körű felismerése a székletmikrobiom-transzplantáció indikációjának bővüléséhez vezethet (Nagy et al., 2020).

***Lactocaseibacillus* nemzetség**

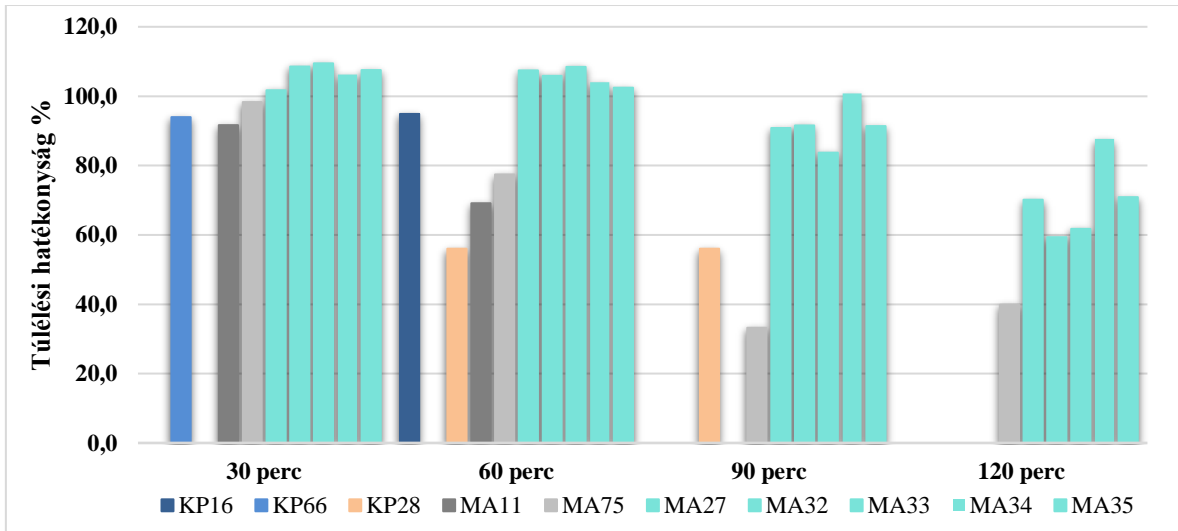
Gyomorsavas közegben *Lactocaseibacillus paracasei* törzsek esetében is az ellenkező értékeket kaptam mind az öt esetben, mint a hasonló *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó törzseket vizsgáló kutatók: Corcoran és munkatársai (2005). Ahhoz, hogy a vizsgált baktériumokat életképesnek minősíthessük a gyomor-béltraktusban eltöltött időt követően el kell érniük egy meghatározott 10^6 - 10^7 TKE/g körüli sejtszámot. Ugyanis ekkora sejtmennyiség szükséges ahhoz, hogy az adott törzs ki tudja fejteni jótékony hatását a bélrendszerre, illetve a gazdaszervezet egészére. Az eredményeket az 5. táblázat adatai tartalmazzák: a MA32 és MA33 törzsek 120 perces túlélési arányától ($2,00 \cdot 10^5$ TKE/ml; $2,42 \cdot 10^5$ TKE/ml) eltekintve a többi minta elérte a meghatározott 10^6 - 10^7 TKE/g körüli sejtszámot (MA27 – $2,60 \cdot 10^6$ TKE/ml; MA34 – $8,00 \cdot 10^7$ TKE/ml; MA35 – $2,60 \cdot$

10^6 TKE/ml). Corcoran és munkatársai (2005) gyomorsavas kísérlete során összekapcsolta a savas körülmények ellen alkalmazott F₀F₁ enzim-komplex hatását glükózzal. Így annak érdekében, hogy a vizsgált törzseimnél még több élő, szaporodóképes sejt élhesse túl a szervezet nehezítő körülményeit epesavas közegben, itt is alkalmaznám a glükóz pozitív hatását, amellyel egy optimálisabb protonpumpa működés alakulhatna ki a sejtmembrán felszínén, és az intracelluláris térben a pH csökkenésének megakadályozása is kivitelezhetővé válna.

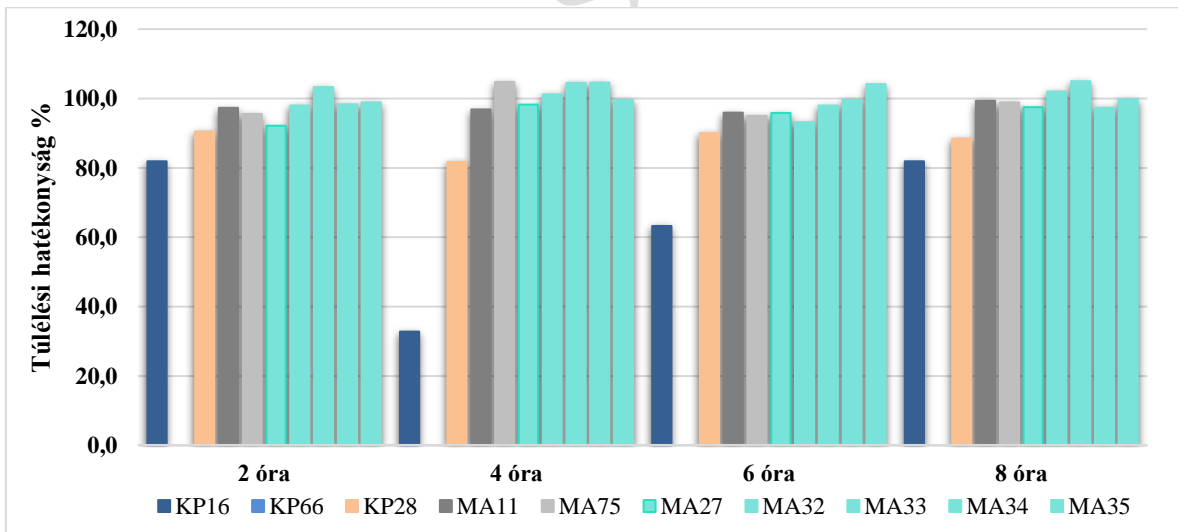
Az epesavas vizsgálat eredményeit összegezve megállapítható, hogy a *Lactocaseibacillus paracasei* gyomorsavas közeg hatásaihoz mérve is sokkal jobb eredményeket tapasztaltam. A MA27 törzs gyomorsavas 70,13%-os túlélési arányához képest (15. ábra) epesavas közegben 8 óra elteltével is 97,42%-ot ért el (20. ábra). A MA32 törzs 16. ábrán látható 59,35%-os túlélési arányt mondhatni megduplázta a 21. ábra epesavas eredményeire tekintve (101,98%). Szintúgy a MA33 törzs is, aminél a gyomorsavas érték 61,7% (17. ábra), míg az epesavas 105% volt (22. ábra). A MA34 és MA35 törzsek pH 2 és epesav túlélési aránya kisebb volt: MA34 gyomorsavas 87,68% – epesavas 97,29% (18. és 23. ábra adatai); MA35 gyomorsavas 70,9% – epesavas 99,84% (19. és 24. ábra adatai).

A fent leírt eredményeket figyelembe véve a 29. és a 30. ábra eredményei alapján probiotikus készítményekhez elsődlegesen a *Lactocaseibacillus paracasei* faj törzsei közül a MA27, MA34, MA35 törzseket, a *Lactococcus lactis* faj törzsei közül pedig a MA75 törzset javaslom, amennyiben megfelelnek a többi kritériumnak is, amiket egy probiotikus törzssel szemben támasztottak. Ebben az esetben például takarmánykiegészítőként alkalmazhatóak lennének az állattartásban. A szakirodalomban széles körben dokumentáltak már számos olyan mikroorganizmust, amelyek probiotikus tulajdonságokat mutattak, a mai napig a legelterjedtebb probiotikumok a *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* és *Bifidobacterium* nemzetségekben találhatók. A bakteriális probiotikumok hatékonyabbnak bizonyultak csirkék, sertések és fiatal borjak esetében is. Különös érdeklődés övezi a *Lactococcus lactis* vizsgálatát, mivel ez a faj ígéretesnek bizonyult különböző halfajok védelmére a bakteriális kórokozókkal szemben. Képes volt növelni az immunparamétereket, valamint védelmet nyújtott a furunkulózisos gennyes bőrelváltozás ellen. Ugyanebben az irányban más kutatások is beszámoltak az *Lactococcus lactis* (10^8 TKE/g) olajbogyó lepényhalban (*Paralichthys olivaceus*) történő alkalmazásával megemelkedett szérum immunparamétereiről (mint például a szérum peroxidáz, lizozim és antiproteáz), valamint a *Streptococcus iniae* elleni rezisztenciáról (Arsène et al., 2021).

A *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus formosensis* és *Lactococcus lactis* fajok törzseit pedig az újító széklettranszplantációs módszernél javasolnám, amennyiben az említett probiotikus kritériumoknak teljes mértékben megfelelnek.



29. ábra: *Lactococcus garvieae* (KP16, KP66), *Lactococcus formosensis* (KP28), *Lactococcus lactis* (MA11, MA75) és *Lactocaseibacillus paracasei* (MA27-35) törzsek túlélőképessége gyomorsavas közegben



30. ábra: *Lactococcus garvieae* (KP16, KP66), *Lactococcus formosensis* (KP28), *Lactococcus lactis* (MA11, MA75) és *Lactocaseibacillus paracasei* (MA27-35) törzsek túlélőképessége epesavas közegben

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatásom során *Lactococcus* és *Lactobacillus* nemzetségek baktériumtörzseinek túlélőképességét követtem nyomon a gyomor- és béltraktust modellező közegeket alkalmazva. A manapság gyakorta fogyasztott fermentált élelmiszerekben és tejtermékekben alkalmazott probiotikus hatású baktériumok közé sorolhatók a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségek fajainak egyes törzsei, de előszeretettel alkalmazzák probiotikumként az általam vizsgált *Lactococcus lactis* faj egyes törzseit is. Ezért a *Lactobacillus* és a *Lactococcus* nemzetség egyes törzseinek összehasonlítását, és savak hatására a változó életképességű sejtjeik vizsgálatát tűztem ki célul.

Az egészséges mikrobiom optimális jellemzője a bélbaktériumok magas fokú, stabil diverzitása. Működése során sokféle élettani funkciót tölt be: alapvető tápanyagforrást biztosít, a gyomor-bélrendszer integritását segíti és támogatja immunrendszerünk védekezőképességét is. A gazdaszervezet és a mikrobióta fajok közötti szimbiotikus kapcsolat felborulásával a szervezet fogékonyabbá válik különböző betegségekkel szemben. Említhetjük például az elhízást, szív- és érrendszeri rendelleneségeket, depressziót, anyagcserezavarokat és mentális betegségeket is. Így az egyre veszélyesebb tünetegyüttesek normalizálása érdekében fontos a mikrobiom egyensúlyának fenntartása a megfelelő étrenddel és probiotikus készítményekkel, a gyógyszerek körültekintő használatával és az életvitelünk optimalizálásával.

Kísérleteim során a *Lactococcus* nemzetségből a *Lactococcus lactis* a *Lactococcus formosensis* és a *Lactococcus garvieae* baktériumtörzseit vizsgáltam. *Lactobacillus* nemzetségből pedig az eredetileg *L. paracasei* néven ismert, majd 2020-tól *Lactocaseibacillus paracasei*-re átnevezett faj baktériumtörzseit.

Mivel a fermentált tejtermékek és az erjesztett élelmiszerek tartalmaznak probiotikumokat, ezért ezeknek a gyomorban töltött általános időtartamával számolva a pH 2-es vizsgálat utolsó mintavételezését a 120. perc után végeztem. Az epesav hatásának kifejtését pedig pH 6,4 értéken vizsgáltam, számolva a vékonybélben eltöltött körülbelül 8 órás emésztési idővel. A lefagyasztott törzsek inkubációjával való felszaporítását követően, ahhoz, hogy az eredményekben pontos összehasonlítást tudjak végezni a baktériumok túlélési arányát tekintve, Bürker-kamrás sejtszámlálást végeztem. Ennek alapján mindegyik törzsnél nagyságrendileg 10^7 – 10^8 sejtszámot állapítottam meg, amelyek eredményeit a 3. táblázat szemlélteti.

A két baktérium nemzetség eredményeit összevetve 8 órás intervallum alatt két óránkénti mintavételt követően az epesavas közegnek túlélési arány%-át tekintve, a *Lactocaseibacillus paracasei* faj törzseinek értékei voltak a legjobbak. Eredményeim mind az öt törzs esetében 97 – 105% között voltak, míg a *Lactococcus* fajok különböző törzsei 65 – 99,3% között váltakoztak, de leginkább a *Lactococcus lactis* törzsek eredményei voltak kiemelkedőek (MA11 – 99,3%; MA75 – 98,85%).

A gyomorsavas közeg hatásait szintén a *Lactocaseibacillus paracasei* élte túl a legjobb sejtszámmal. Túlélési arányuk 56 – 88% között változott. Miközben a *Lactococcus*-oknál csak egyetlen egy esetben a *Lactococcus lactis* MA75 törzsénél lehetett 120 perc után is 39,82%-os túlélési sejtszámot megállapítani. *Lactococcus formosensis*, *Lactococcus garvieae* esetében csak 30, 60 és 90 percig maradtak szaporodóképes sejtek, így hosszú távú ellenállóképességükről nem volt igazán meggyőző eredmény.

Összegezve az eredményeket, probiotikus készítményekhez elsősorban a *Lactocaseibacillus paracasei* faj törzseit javasolnám, közülük is a MA27, a MA34 és a MA35 törzseket rendkívüli gyomor- és epesav-ellenállóképességük miatt, illetve a jövőben akár takarmánykiegészítőként is lehetségesnek tartom alkalmazásukat, amennyiben megfelelnek a probiotikus törzsekkel szembeni többi szigorú kritériumnak is. A *Lactococcus* nemzetség törzseit a kitűnő epesav tűrésüket tekintve egy kezdetleges, de nagy lehetőséggel bíró, napjainkban már nemzetközileg széles körben elfogadott székletmikrobióta-transzplantáció alapjaként tudnám elképzelni.

7. IRODALMI HIVATKOZÁS

- Arsène, M. M. J., Davares, A. K. L., Andreevna, S. L., Vladimirovich, E. A., Carime, B. Z., Marouf, R., Khelifi, I. (2021). The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary World*, 14(2), 319. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.319-328>
- Bested, A. C., Logan, A. C., Selhub, E. M. (2013). Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part II – contemporary contextual research. *Gut Pathogens* 2013 5:1, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-3>
- Brandão, R. L., Castro, I. M., Bambirra, E. A., Amaral, S. C., Fietto, L. G., Tropia, M. J. M., Neves, M. J., Dos Santos, R. G., Gomes, N. C. M., Nicoli, J. R. (1998). Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 564–568. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.564-568.1998>
- Candelli, M., Franza, L., Pignataro, G., Ojetti, V., Covino, M., Piccioni, A., Gasbarrini, A., Franceschi, F. (2021). *Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases*. 22(12), 6242. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://sci-hub.se/10.3390/IJMS22126242>
- Caridi, A. (2002). Selection of *Escherichia coli* -inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 303–308. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000300>
- Chen, Y.-S., Otaguro, M., Lin, Y.-H., Pan, S.-F., Ji, S.-H., Yu, C.-R., Liou, M.-S., Chang, Y.-C., Wu, H.-C., Yanagida, F. (2014). *Lactococcus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 146–151. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052811-0>
- Collins, D. M., Phillips, A. B., Zannoni, P. (1989). *Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. 105–108. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-2-105>

- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3060. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005>
- Cotter, P. D., Hill, C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 429–453. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>
- Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D., Renault, P. (1999). Survival, Physiology, and Lysis of *Lactococcus lactis* in the Digestive Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4881. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4881-4886.1999>
- Ezendam, J., Van Loveren, H. (2006). *Probiotics: Immunomodulation and Evaluation of Safety and Efficacy*. 1–14. <https://doi.org/10.1301/nr.2006.jan.1-14>
- Garbacz, K. (2022). Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 356–366. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2021.12.013>
- Hancz Cs. (2021). A mikrobiom globális szerepe a „One Health” megközelítésmód szerint. *Magyar Agrár- És Élettudományi Egyetem*. <https://doi.org/10.31914/aak.2512>
- Iwabuchi, N., Yonezawa, S., Odamaki, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Xiao, J.-Z. (2012). Immunomodulating and anti-infective effects of a novel strain of *Lactobacillus paracasei* - that strongly induces interleukin-12. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(2), 230–239. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.01003.x>
- Kim, W.-K., Jang, Y. J., Han, D. H., Jeon, K., Lee, C., Han, H. S., Ko, G. (2020). *Lactobacillus paracasei* - KBL382 administration attenuates atopic dermatitis by modulating immune response and gut microbiota. *Gut Microbes*, 12(1), 1819156. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1819156>
- Kiss I., Kapócs G., Frecska E., Móre Cs. (2018). *LEGE ARTS MEDICINAE, Orvostudományi Folyóirat*. 28.
- Knight, R., Buhler, B. (2015). *Szerves részünk: Hogyan befolyásolják életünket a mikrobák?* TED Books. Simon & Schuster, Inc. New York. https://books.google.hu/books?hl=hu&lr=&id=xHqTDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT8&dq=mikrobiom+tudom%C3%A1nyos+cikk&ots=MEEuEi4u_A&sig=QoMndRnjYTa7NevzrpIsjWBm-VU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true

- Kumar, H., Lund, R., Laiho, A., Lundelin, K., Ley, R. E., Isolauri, E., Salminen, S. (2014). Gut microbiota as an epigenetic regulator: Pilot study based on whole-genome methylation analysis. *MBio*, 5(6). https://doi.org/10.1128/MBIO.02113-14/SUPPL_FILE/MBO006142092ST4.PDF
- Lakatos, G., Tulassay, Zs. (2009). Probiotics in gastrointestinal disorders. In *Orvosi Hetilap* (Vol. 150, Issue 19, pp. 883–894). Akademiai Kiado Rt. <https://doi.org/10.1556/OH.2009.28604>
- Li, H., Limenitakis, J. P., Greiff, V., Yilmaz, B., Schären, O., Urbaniak, C., Zünd, M., Lawson, M. A. E., Young, I. D., Rupp, S., Heikenwälder, M., McCoy, K. D., Hapfelmeier, S., Ganal-Vonarburg, S. C., & Macpherson, A. J. (2020). Mucosal or systemic microbiota exposures shape the B cell repertoire. *Nature*, 584(7820), 274–278. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2564-6>
- Lorca, G. L., Raya, R. R., Taranto, M. P., de Valdez, de F. G. (1998). *Biotechnology Letters*, 20(3), 239–24. <https://doi.org/10.1023/A:1005369617313>
- Makras, L., Van Acker, G., De Vuyst, L. (2005). Lactobacillus paracasei subsp. paracasei 8700:2 Degrades Inulin-Type Fructans Exhibiting Different Degrees of Polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6531–6537. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6531-6537.2005>
- Nagy G. Gy., Tudlik Zs., Gergely L., Kónya J., Orosi P., Rákóczi É., Szabó J., Várvölgyi Cs., Vitális E., Paragh Gy. (2020). A székletmikrobita-transzplantáció technológiájának és minőségirányítási hátterének újragondolása a SARS-CoV-2 víruspandémia kapcsán. *Orvosi Hetilap*, 161(44), 1858–1871. <https://doi.org/10.1556/650.2020.32023>
- O’Keeffe, T., Hill, C. (1999). BACTERIOCINS | Potential in Food Preservation. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 183–191. <https://doi.org/10.1006/RWFM.1999.0150>
- O’Mahony, M. S., Marchesi, R. J., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A.-M., Quigley, M. M. E., Cryan, F. J., Dinan, G. T. (2008). *Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses*. (263–267). *Biological Psychiatry* 65(3). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.026>

- Orlando, A., Refolo, M. G., Messa, C., Amati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V., Russo, F. (2012). Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Viable or Heat-Killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 Gastric and DLD-1 Colon Cell Lines. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1103–1111. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.717676>
- Ortiz, C., López, J., del Amo, E., Sevilla, T., García, P. E., San Román, J. A. (2014). *Lactococcus Garvieae* Infective Endocarditis: Report of 2 Cases and Review of the Literature. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 67(9), 776–778. <https://doi.org/10.1016/J.REC.2014.04.008>
- Palleja, A., Mikkelsen, K. H., Forslund, S. K., Kashani, A., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., Liang, S., Feng, Q., Zhang, C., Pyl, P. T., Coelho, L. P., Yang, H., Wang, J., Typas, A., Nielsen, M. F., Nielsen, H. B., Bork, P., Wang, J., ... Pedersen, O. (2018). Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nature Microbiology*, 3(11), 1255–1265. <https://doi.org/10.1038/S41564-018-0257-9>
- Papp-Bata, Á., Szakály, Z. (2021). *A PROBIOTIKUMOK MÚLTJA, JELENE ÉS JÖVŐJE A THE PAST, PRESENT AND FUTURE OF PROBIOTICS 1,2. LXXVIII.* <https://doi.org/10.34100/TEJGAZDASAGvol78iss1-2pp19-27>
- Perlmutter, D. (2017). *Agyépítők. Kossuth Kiadó.*
- Rallu, F., Gruss, A., Maguin, E. (1996). *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70(2–4), 243–251. <https://doi.org/10.1007/BF00395935/METRICS>
- Rogan, J. W., Gladen, C. B., Hung, L.-K., Koong, L.-S., Shih, Y.-L., Taylor, S. J., Wu, C.-Y., Yang, D., Ragan, B. N., Hsu, C.-C. (1988). *Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan.* *Science*, 241(4863), 334–336 /. <https://doi.org/10.1126/science.3133768>
- Saha, U. B., Saroj, S. D. (2022). Lactic acid bacteria: prominent player in the fight against human pathogens. <https://doi.org/10.1080/14787210.2022.2128765>, 20(11), 1435–1453. <https://doi.org/10.1080/14787210.2022.2128765>
- Salaris, C., Scarpa, M., Elli, M., Bertolini, A., Guglielmetti, S., Pregliasco, F., Brun, P., Castagliuolo, I. (2021). *Lactocaseibacillus paracasei* DG enhances the lactoferrin anti-

- SARS-CoV-2 response in Caco-2 cells. *Gut Microbes*, 13(1).
<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1961970>
- Salguero, V. M., Al-Obaide, I. A. M., Singh, R., Seipmann, T., Vasylyeva, L. T. (2019). *Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type2 diabetic patients with chronic kidney disease*. *Experimental and Therapeutic Medicine*.
<https://doi.org/10.3892/ETM.2019.7943>
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, C. R., McNabb, C. W., Moughan, J. P., Roy, C. N. (2013). *The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract*. 2013, 1–16 |. *Mediators of Inflammation*.
<https://doi.org/10.1155/2013/237921>
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405–440.
<https://doi.org/10.1016/J.FEMSRE.2004.01.003>
- Shewale, N. R., Sawale, D. P., Khedkar, C. D., Singh, A. (2014, January). *Selection criteria for probiotics: A review*. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*.
https://www.researchgate.net/publication/288067379_Selection_criteria_for_probiotics_A_review
- Song, A. A. L., In, L. L. A., Lim, S. H. E., Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories* 2017 16:1, 16(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/S12934-017-0669-X>
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X-N., Kubo, C., Koga, Y. (2004). *Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice*. 263–275. *The Journal of Physiology*, 558(1).
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Szabó A., Rajnavölgyi É. (2013). *The Brain-Immune-Gut Triangle: Innate Immunity in Psychiatric and Neurological Disorders*.
- Tasdemir, S. S., Sanlier, N. (2020). An insight into the anticancer effects of fermented foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104281.
<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.104281>

- Turnbaugh, J. P., Gordon, I. J. (2009). *The core gut microbiome, energy balance and obesity*. 587(17) / 4153-4158. The Journal of Physiology. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136>
- Wang, C. C.-Y., Shie, H.-S., Chen, S.-C., Huang, J.-P., Hsieh, I.-C., Wen, M.-S., Lin, F.-C., & Wu, D. (2007). *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. 68–73. International Journal of Clinical Practice, 61(1). <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.00855.x>
- Wang, S., Ahmadi, S., Nagpal, R., Jain, S., Mishra, S. P., Kavanagh, K., Zhu, X., Wang, Z., McClain, D. A., Kritchevsky, S. B., Kitzman, D. W., Yadav, H. (2020). Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed *Lactobacillus paracasei* D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: from *C. elegans* to mice. *GeroScience*, 42(1), 333–352. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00137-4>
- Whitehead, K., Versalovic, J., Roos, S., Britton, R. A. (2008). Genomic and Genetic Characterization of the Bile Stress Response of Probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1812. <https://doi.org/10.1128/AEM.02259-07>
- Zhao, L., Wei, J., Zhao, H., Zhu, B., Zhang, B. (2017). *Detoxification of cancerogenic compounds by lactic acid bacteria strains. (1–16)*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1339665>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Csernus Olíviának és Dr. Kosztik Juditnak a szakdolgozat munkám elkészítése alatt nyújtott útmutatásukért és támogatásukért. Szakértelmük, meglátásaik és bátorításuk jelentős szerepet játszott kutatásom során, hogy a lehető legjobb eredményt érhessem el.

Hálás vagyok Dr. Kosztik Juditnak, hogy kísérletezésem során minden kérdéseimre türelmesen és részletesen válaszolva lehetővé tette, hogy kutatásom és annak kiértékelése személyes tapasztalataimat bővítse, és érdeklődésemet a jövőben is fenntartsa.

Bán Fanni - Szakdolgozat

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Bán Fanni
A Hallgató Neptun kódja: M0079F
A dolgozat címe: Tejsavbaktérium törzsek pH és epesav tűrésének vizsgálata
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Biomérnök és Erjedésipari 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 nyilatkozáttal valótlanul 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 tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

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

Kelt: Budapest, 2023. május 3.

Bán Fanni

Hallgató aláírása

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Bán Fanni (hallgató Neptun azonosítója: M0079F) konzulenseként 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.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2023. május 3.



Belső konzulens
Dr. Csernus Olívia