

SZAKDOLGOZAT

Emődy-Kiss Blanka

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Műszaki Intézet

Élelmiszerlánc minőségügy szakirányú továbbképzési szak

**FERMENTÁLT ZÖLDSÉGKÉSZÍTMÉNYEK TEJSAVBAKTÉRIUM
CSÍRASZÁMA ÉS ANNAK BECSLÉSI LEHETŐSÉGEI**

Belső konzulens: Dr. Korzenszky Péter Emőd
habilitált egyetemi docens

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** MATE Műszaki Intézet
Mezőgazdasági és
Élelmiszeripari Gépek Tanszék

Külső konzulens: Dr. Pomázi Andrea
egyetemi docens
MATE, Élelmiszertudományi és
Technológiai Intézet,
Élelmiszermikrobiológia, -
higiénia és -biztonság Tanszék

Készítette: **Emődy-Kiss Blanka**

Gödöllő

2024

**MŰSZAKI INTÉZET
ÉLELMISZERLÁNC MINŐSÉGÜGY
SZAKIRÁNYÚ TOVÁBBKÉPZÉSI SZAK**

SZAKDOLGOZAT

feladatlap

Emődy-Kiss Blanka (DNO63R)

részére

A szakdolgozat címe:

Fermentált zöldségkészítmények tejsavbaktérium csíraszama és annak becslési lehetőségei

Feladatkiírás:

Ismertesse szakirodalom alapján a fermentált zöldségkészítmények sajátosságait. Kereskedelmi forgalomban kapható termékekből becsüljön tejsavbaktérium csíraszámot tenyésztési vizsgálattal, luminometriával, áramlási citometria alkalmazásával. A kapott eredményeket hasonlítsa össze. Azonosítson jellemző baktérium telepeket MALDI-TOF-MS analízissel.

Közreműködő tanszék: Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Gépek Tanszék

Külső konzulens: Dr. Pomázi Andrea, egyetemi docens, MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Élelmiszerminőségi, -biztonsági és Táplálkozástudományi Központ, Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék

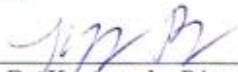
Belső konzulens: Dr. Korzenszky Péter Emőd, habilitált egyetemi docens, MATE, Műszaki Intézet, Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Gépek Tanszék

Beadási határidő: 2024. április 22. (hétfő) 12.00 óra

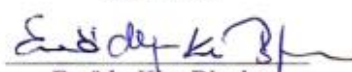
Gödöllő, 2023. november 15.

Jóváhagyom


Dr. Bártfai Zoltán
tanszékvezető

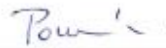

Dr. Korzenszky Péter
szakfelelős

Átvettem


Emődy-Kiss Blanka
hallgató

A dolgozat készítőjének külső konzulense nyilatkozom arról, hogy a hallgató az előre egyeztetett konzultációkon megjelent.

Gödöllő, 2024. *április* hó *15.* nap


(külső konzulens)

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés és célkitűzések.....	4
1. Irodalmi áttekintés	6
1.1 Tejsavbaktériumokról általánosan.....	6
1.2 Tejsavas erjesztés mikrobiológiája	8
1.3. Tejsavas erjesztés technológiai lépései	10
1.4. Fermentált zöldségkészítmények kedvező élettani hatásai	13
1.5. Fermentált élelmiszerek és funkcionális élelmiszerek tudományos és jogi szemszögből	15
1.6. Termékfejlesztések.....	17
1.7.Minőségbiztosítás.....	18
1.8. Fermentált élelmiszerek tejsavbaktérium számának becslése	18
1.8.1. Tenyésztéses vizsgálatok	18
1.8.2. Luminometria	19
1.8.3. Áramlási citometria	19
2. Anyagok és módszerek	22
2.1. Vizsgált termékek	22
2.2. Csíraszámbecslések összehasonlításának fő technikai lépései	23
2.3. Tenyésztéshez és fenntartáshoz használt táptalajok, izolátumok, törzsek	23
2.4. Mintavétel és homogenizálás	24
2.5. Csíraszámbecslés anaerob tenyésztéssel MRS táptalajon	24
2.6. Fajmeghatározás MALDI-TOF-MS- készülékkel.....	25
2.7. Csíraszámbecslés luminometriával	26
2.8. Csíraszámbecslés áramlási citométerrel	26
2.9. Statisztikai értékelés	27
3. Eredmények és kiértékelés.....	28
3.1. Csíraszámbecslés anaerob tenyésztéssel, pH értékek	28

3.2. Fajmeghatározás MALDI-TOF-MS készülékkel.....	29
3.3. Csíraszámbecslés luminometriával.....	32
3.4. Csíraszámbecslés áramlási citometriával.....	36
3.5. Csíraszámbecslési eredmények összehasonlítása.....	42
4. Következtetések és javaslatok	43
5. Összefoglalás	46
Irodalomjegyzék	48
Köszönetnyilvánítás.....	56

Rövidítésjegyzék

AU	Arbitrary Unit
BSA	Bovine Serum Albumine
CFDA	Carboxyfluoreszcein Diacetátot
EFSA	European Food Safety Authority
FL-1; -2; -3	Fluorescens chanel -1; -2; -3
FLAB	Fructofil Lactic Acid Bacteria
FSC	Forward Scatter
HCCA	Cyano-4-Hydroxy-Cinnamic Acid
ISAPP	International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics
LAB	Lactic Acid Bacteria
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight- Mass Spectrometry
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe táptalaj
PBS	Phosphate Buffer Saline
PI	Propidium-Jodid
Rho-123	Rhodamin-123
SCFa	Short Chain Fatty Acid
SSC	Side Scatter
TKE	Teleképző Egységek

Bevezetés és célkitűzések

Az orvostudomány a kutatás fejlődésével az emberi szervezetet nem csupán egyedi entitásként, hanem a mikrobiommal együttműködő egységként kezdi kezelni. Az ókori görögök "ép testben ép lélek" filozófiája új értelmet nyer a Humán Mikrobiom Program által. Testünk szerves részét képezi a bélcsatornában élő mikroorganizmusok közössége, és ennek egyensúlya jelentősen befolyásolható az általunk fogyasztott ételekkel. A minőségi étrend nemcsak a bél mikrobiomra gyakorol hatást, hanem közvetve, és vagy azon keresztül befolyásolja testi egészségünket, hangulatunkat és kedélyállapotunkat is.

A városi életmód, a stressz, a mozgásszegény életvitel, a felborított bioritmus, a finomított élelmiszeranyagok, csak néhány a feltárt okok közül, amelyek miatt egyre többen szenvednek civilizációs betegségekben. A betegségek kezelése és gyógyítása komoly társadalmi és anyagi terhet jelent mind az egyén, mind környezete számára. A helytelen életmód generálta civilizációs betegségek nagy része, akár 25-70 %-a elkerülhető lenne a minőségi étrend bevezetésével (Szabó, 2015). Az egészségtudatos fogyasztók számára kifejezett igényként fogalmazódik meg, hogy olyan élelmiszerek legyenek elérhetőek a piacon, amelyek túl azon, hogy táplálóak, legyenek olyan hatásúak is, amelyekkel hosszútávon elkerülhetőek a betegségek.

Az erjesztett élelmiszerek több ezer éve az emberiség táplálékának részét képezik. A fermentálással készült zöldségkészítmények rostanyagokban és antioxidánsokban bővelkednek és természetes módon tartalmazznak tejsavbaktériumokat. A tartósítás ezen ősi formájával olyan különleges íz és aroma komponensek képződnek, amelyek érdekessé és változatossá teszik az étrendet.

A kereskedelmi forgalomban kapható fermentált zöldségkészítmények kínálata Magyarországon is újraéledőben van. Nem csak a klasszikusnak számító káposzta alapú termékekre kell gondolni, hanem a zöldségfélék legszélesebb palettájára, kezdve a gyökérzöldségektől, a zsenge hüvelyes zöldborsón át a gyömbérrel, erőspaprikával vagy tormával ízesített változatokig. Egyre többen foglalkoznak otthon is zöldségek fermentálásával, hogy egészséges és változatos étrendet alakítsanak ki.

A kereskedelmi forgalomban kapható fermentált zöldségkészítmények egy része kistermelői forrásból származik. A gyártók leírása szerint, az általam összegyűjtött készítményekben, az előállítás során nem használnak fel tartósítószeret, és hőkezelésnek

sem vetik alá. Kizárólag konyhasót, zöldséget, fűszereket és vizet tartalmaznak. Nem használnak fel starterkultúrát a fermentációhoz, az erjedés spontán indul, a zöldségek felületéről és a gyártási környezetből származó mikroorganizmusok által.

A tejsavbaktériumok felhasználása igen sokrétű. Számos élelmiszer tartósítási technológiában, de a takarmányozási eljárásokban is előtérbe kerülnek. Termékfejlesztések kapcsán hozzáadott mikroorganizmusokként, akár starterkultúra, vagy probiotikus törzsek formájában jelenhetnek meg.

Az élelmiszeriparban laborvizsgálatokra számos ponton szükség van. A gyártási folyamatok monitorozása, az élelmiszerek minőségi ellenőrzése során, akár a felhasznált starterkultúrák aktivitásának követésében, vagy élelmiszerbiztonsági kérdések megválaszolásában. Termékfejlesztések kapcsán is fontos szempont lehet a tejsavbaktériumok csíraszama a késztermékben és az egészséget támogató fajösszetétel aránya és életképessége. Az MSZ ISO 15214 szabvány foglalkozik élelmiszerekre vonatkozó mezofil tenyésztéssel, az ISO 19344 szabvány pedig a tejtermékekre vonatkozó áramlási citometriás tejsavbaktérium csíraszámbebecslésével. A tenyésztési vizsgálatok nagy erőssége a szelektivitásukban rejlik, hátrányuk viszont, hogy időigényesek. A gyors kimutatási módszerek ugyan nem szelektívek, de megfontolt korlátok között, rövid időn belül jó közelítéseket adhatnak. Alkalmazhatóságuk termékfüggő, ezért izgalmas kérdés ezen lehetőségek számbavétele.

Kérdésfeltevéseim a következők voltak:

- 1., Tartalmaznak-e tejsavbaktériumokat a kereskedelmi forgalomban megvásárolható tartósítószermentes, nem hőkezelt fermentált zöldségkészítmények?
- 2., Milyen csíraszámokban tartalmaznak tejsavbaktériumokat?
- 3., Milyen tejsavbaktérium fajokat tartalmaznak az alapanyagok szerint csoportosított termékek?
- 4., Megbecsülhető-e a tejsavbaktériumok csíraszama luminometriás és áramlási citometriás kimutatási módszerekkel fermentált zöldségkészítményekben?

1. Irodalmi áttekintés

1.1 Tejsavbaktériumokról általánosan

Az emberiség az erjesztés technológiáját több ezer éve ismeri. A tejsavbaktériumok egészségügyi hatásait a XX. század fordulóján kezdték felismerni. Albert Döderlein írta le először, hogy a tejsavat termelő baktériumok (Lactic Acid Bacteria: LAB) gátolják bizonyos patogén mikrobák szaporodását, 1908-ban Metchnikoff világított rá tejsavbaktériumokkal kapcsolatos egészségügyi előnyökre, fermentált tejtermékek kapcsán (Holzapfel et al., 2001). A molekuláris technikák elterjedése előtt a mikroorganizmusok csoportosítása fenotípusos bélyegeik alapján történt. A *Lactobacillus* nemzetséget Beijerinck javasolta 1901-ben, Gram-pozitív, tejsavat termelő, fermentatív, fakultatív anaerob, spórát nem képező baktériumok csoportjára (Zheng et al., 2020), és Orla-Jensen 1919-ben tovább finomította a csoportosítást (Holzapfel et al., 2001). Ennek megfelelően a LAB csoport filogenetikai szempontból nem volt egységes.

Azonban az idő haladtával a molekuláris biológiai technikák fejlődésével egyre pontosabb taxonómiai meghatározásokra nyílt lehetőség. Ennek megfelelően számos változást követhetünk nyomon az utóbbi évtizedekben. Molekuláris vizsgálatokkal kidolgozták a Gram-pozitív baktériumok filogenetikai törzsfáját, a riboszómális 16S rRNS és 23S rRNS szekvencia analízis alapján (Schleifer – Ludwig, 1995a) és elvégezték a LAB csoport filogenetikai csoportosítását (Schleifer – Ludwig, 1995b). Zheng és munkatársai 2020-ban a LAB csoport tagjait modern molekuláris módszerek alapján rendszerezték, szempontjaik között a core-genom analízis mellett, a fiziológiai és ökológiai paraméterek is szerepeltek. Így 26 rendszertani csoportot alkottak, ezek közül növényi vonatkozásúak a *Lactobacillaceae*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Loigolactobacillus* csoportok (Zheng et al., 2020; Qiao et al., 2022).

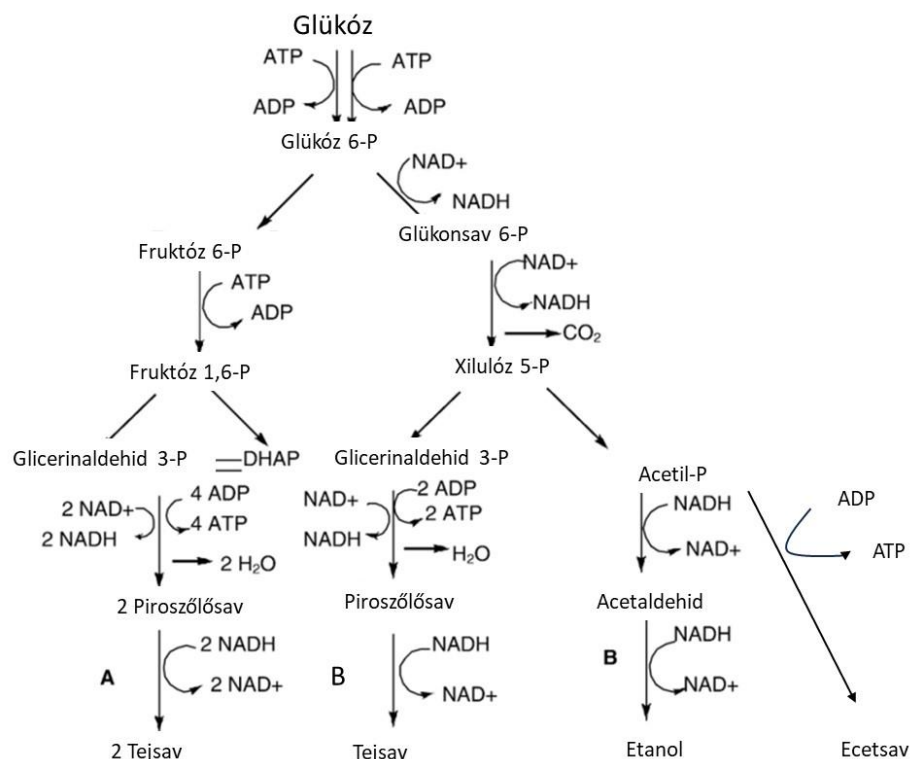
Előfordulásukat tekintve megtalálhatóak a növényzeten, az emberi és állati szervezet normál mikrobiótájának tagjaiként (Zheng et al., 2020), többnyire jellegzetes Gram-pozitív pálcák, vagy kokkuszkok, de klinikai mintákban változatos alakban is megfigyelték őket, melyek vagy a fajra eredendően jellemző, vagy a környezeti tényezők befolyása miatt alakulnak ki.

Ennek megfelelően leírtak kokkus, kokkobacillus, elágazásmentes fonalak, hajlított pálca, kifli és gyűrű alakokat is (Czirok, 1999). Spórát nem képező, kataláz és oxidáz negatívak, aerotoleráns, fakultatív anaerob szervezetek (Schleifer – Ludwig, 1995b).

A táptalajok összetételével szemben igényesek, növekedésükhöz fehérjék, aminosavak, nukleotidok és vitaminok is szükségesek. Szaporodásuk hőmérsékleti optimuma mezofil és termofil tartományba esik (5°C és 45°C), pH optimuma pedig pH 5.5–6.5 között van, de tolerálják az ennél savasabb környezetet is (Reddy et al., 2008),

Kemoorganotróf mikroorganizmusok, energiaszerzésük szerint obligát fermentálók. Az energiát szénhidrát lebontásból (1.ábra) homofermentatív, vagy heterofermentatív úton nyerik (Reddy et al., 2008).

1.ábra: A homo- (A) és heterofermentatív (B) tejsavas erjedés vázlata
(Forrás: Reddy et al., 2008 alapján)



Ennek megfelelően, vagy csak tejsav, vagy tejsav mellett ekvimoláris mennyiségben széndioxid, ecetsav, vagy etanol, sőt formiát és succinát is képződhet az erjesztés során. A homofermentatív anyagcseréjűek, egy mol glükózból kétszerannyi ATP-t nyernek, mint a heterofermentatívok. Megkülönböztetnek obligát homofermentatív, obligát és fakultatív heterofermentatív LAB szervezeteket. A LAB-ok vagy D(-)- vagy L(+)-tejsavat, vagy a két izomer racém keverékét képezik (Reddy et al., 2008). Ennek élettani jelentősége van, mert a D(-) forma acidózist okozhat bizonyos betegségekben (Remund, 2023).

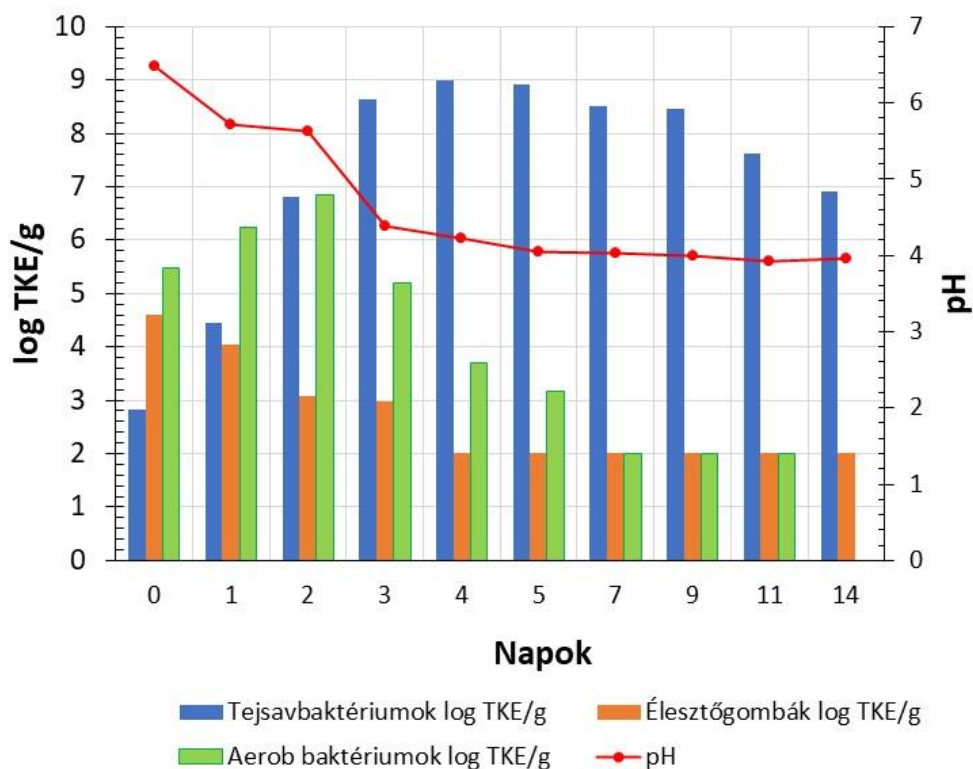
1.2 Tejsavas erjesztés mikrobiológiája

A zöldségek, gyümölcsök fermentációjához általában nem használnak starterkultúrákat, hanem spontán, a környezetből származó baktériumokkal indul a folyamat. A nyers zöldségek felszínén a mikrobiális közösségnek csak kis részét (20-40 telepképző egység/g) képezik a tejsavbaktériumok (Di Cagno et al., 2016). Ezek a fajok jellemzően a *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *L. arabinosus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. sake*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecalis* var. *liquefaciens*, *E. faecium*, (Deák, 2006). Érdekességgént megjegyezhetjük, hogy a közelmúltban fruktóz bontó fruktofil tejsavbaktériumokat (FLAB) írtak le érett gyümölcsök felszínéről és gyümölcs fermentumokból (Endo et al., 2018). A fermentációs folyamatban a LAB-ok a szelektív környezetnek köszönhetően hamar elszaporodnak.

Pederson és Albury foglalta össze 1969-ben a savanyúkáposzta fermentációjának szukcesziós folyamatát. A fermentáció során az első uralkodóvá váló faj a heterofermentatív *Leuconostoc mesenteroides*. Így az első szakaszban tejsavtermelésük következtében négy körülire csökken a pH érték (2. ábra). Az alacsony pH és az általuk képzett további növekedési faktorok kedvezőleg hatnak más tejsavbaktériumok szaporodására. További íz és aroma anyagokkal járulnak hozzá az élelmiszer jellegéhez. Ezzel párhuzamosan széndioxid termelődik, a közegből elfogy az oxigén és anaerob viszonyok alakulnak ki, a Gram-negatív koliform baktériumok és az élesztők száma lecsökken a közösségben (2. ábra) (Di Cagno et al., 2016; Pederson – Albury, 1969).

2: ábra: A mikroorganizmus populációk változása a savanyú káposzta erjesztése során (TKE.: telepképző egységek száma)

(Forrás: Deák 2006. 6.5 táblázat alapján saját szerkesztés)



A második szakaszban a savtűrőbb *L. brevis* és *L. plantarum*, *Pediococcus spp.* válnak dominánssá (Di Cagno et al., 2016; Pederson – Albury, 1969), és folytatják a fermentálást tíz napon át. A harmadik szakaszban 16-18 nap elteltével a homofermentatív *L. plantarum* szaporodik fel és a termék pH értéke 3,8 körülire csökken. A második és harmadik szakasz tejsavbaktériumai további aroma anyagok képződésével járulnak hozzá a termékek ízvilágához. Az utolsó hűtött tárolási szakaszban a pentózokat bontó *L. brevis* szaporodása indul be ismét, a pH tovább csökken 2,5-re (Deák, 2006). A fermentációs folyamatok következménye az, hogy az élelmiszerek többféle élettani állapotban tartalmazzák a mikroorganizmusok sejtjeit. A szelektív környezettől függő domináns fajok befolyásolják a zöltségek textúráját, és a késztermékek ízét. (Penas et al., 2010; Di Cagno et al., 2016). Egy észak kínai tanulmány megállapította, hogy a savanyúkáposztában található illékony vegyületek szoros összefüggést mutatnak a *Clostridium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* fajokkal (Zabat et al., 2018).

1.3. Tejsavas erjesztés technológiai lépései

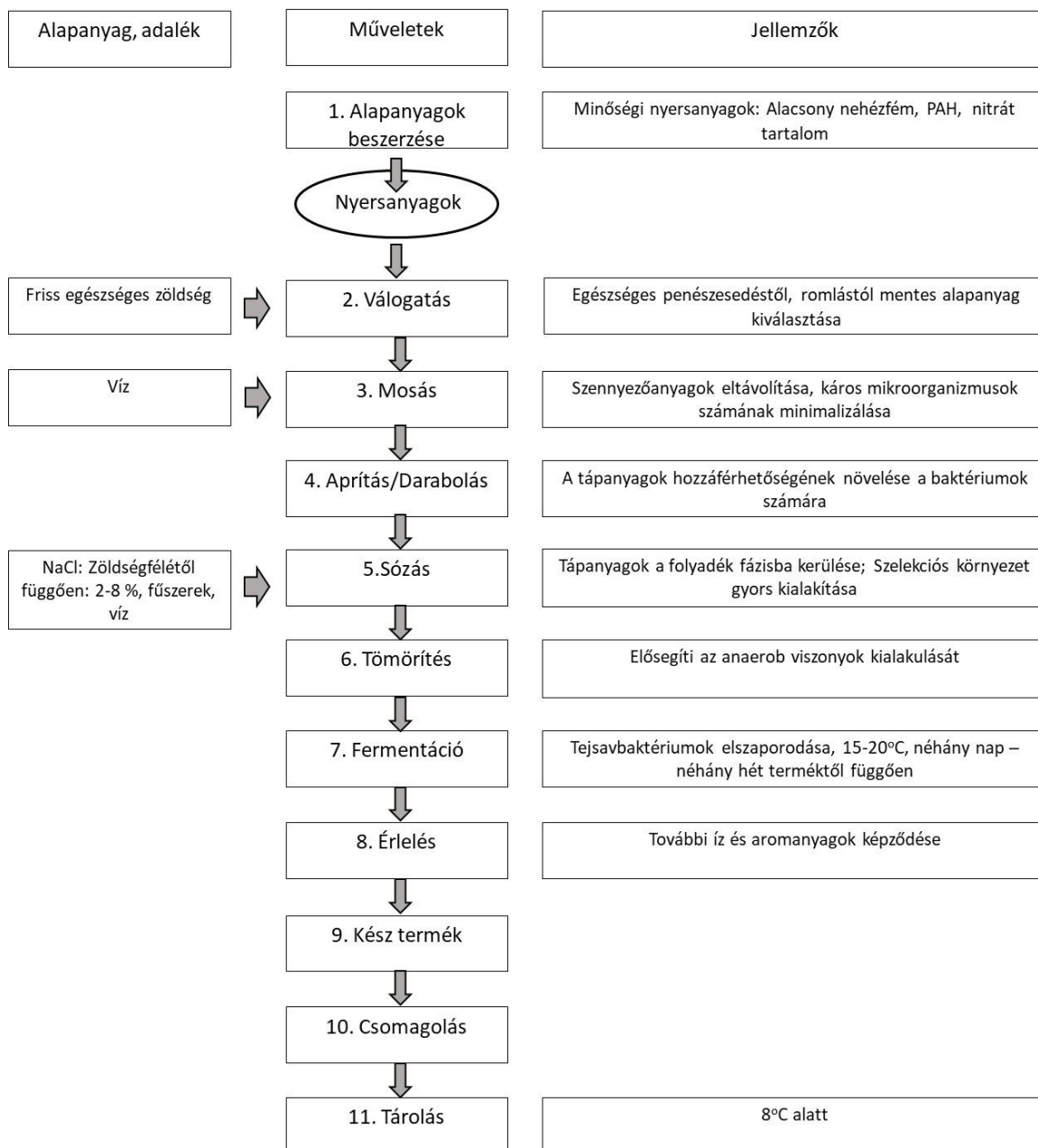
A fermentálás napjainkban egyre népszerűbbé válik, és számos előnyt nyújt. A megfelelő tejsavas fermentálásnak köszönhetően az étel biztonságosan eltarthatóvá válik. Előny lehet továbbá, hogy az elkészítése és tárolása is energiatakarékos, mert a hagyományos fagyasztási vagy konzerválási módszerekhez képest, nem igényel jelentős energiabefektetést, így a környezetkímélő tartósítási megoldások közé tartozik.

A Magyar Élelmiszerkönyv a természetes savanyítással készülő termékeket két élelmiszerkategóriába sorolja. Az egyik a savanyítással készült zöldség és gyümölcs termékek kategóriája. Ebben minden olyan zöldségféle beletartozik, amely savanyításra alkalmas. A másik a savanyított vagy savanyú káposzta élelmiszer kategória.

A kistermelői előállítás sok szempontból hasonlítható az otthoni fermentálásra, mivel saját termesztésű nyersanyagokból, viszonylag kis mennyiségű termék előállításáról van szó, amelynek sikere pedig nagyban függ, a gyártó bevált technológiai eljárásaitól. A savanyítás klasszikus tartósítási eljárás, mely évezredek tapasztalatait öleli fel, a technológiai lépéseit a 3. ábra mutatja. Ezek rendre az alapanyagok beszerzése, válogatás, sózás, tömörítés, fermentáció, esetleg érlelés, csomagolás és tárolás lépéseiből áll (Swain et al., 2014; Montet et al., 2014).

A világon termesztett zöldségnövények közül Európában, 40-42 faj ismert (Gubicskóné Kisbenedek, 2015). A termékek kapcsán felmerülő veszélyek elkerülése érdekében ajánlott a nyersanyagokat a beszerzés során gondosan kiválasztani. Élelmiszerbiztonsági szempontból, ügyelni kell a felhasznált zöldségek környezeti károsanyag tartalmára. A zöldségnövények esetén nehézfémek, poliaromás szénhidrogének (PAH) és nitrátok szennyezettségének kockázata áll fenn. Egyes leveles zöldségfélék például a káposzta nagyobb mennyiségben tartalmazhatnak PAH-eket, de vannak növényfélék, amelyek a talajból is felveszik azt, például a sárgarépa (Armbruszt, 2015a). Fontos, hogy az alapanyag alacsony nitrát tartalmú legyen. A nitrát felhalmozódás jellemző, például a káposzta, retek, cékla esetén (Armbruszt, 2015a).

3.ábra: Fermentált zöldségkészítmény gyártásának technológiai lépései
(Forrás: Swain et al., 2014; és Montet et al., 2014 alapján saját szerkesztés)



A válogatás során kiválasztják a friss, minőségi ép alapanyagokat. A zöldség legyen friss ép állapotú, romlás, penészedés és barnulásmentes. A terményeket alaposan megmossák, eltávolítják a szennyező anyagokat (3. ábra).

Ezt követően feldarabolják a zöldségeket, pl. szeletelik, gyalulják, szecskázzák, vagy lereszelik. Ennek módja függ a felhasznált zöldségféléstől és a fogyasztói kedveltségtől. Az aprítási művelet azonban nemcsak esztétikai szempontokat szolgál, hanem növeli a tápanyagok hozzáférhetőségét a baktériumok számára a vágási felületek mentén.

A következő lépésben az előkészített nyersanyagokat összekeverik sóval. A só mennyisége függ a fermentálni kívánt zöldség fajtájától (Montet et al., 2014). A sózással nő az ozmózisnyomás a növényi sejtekben, ennek hatására, plazmolízis következik be, és az oldott tápanyagok folyadékfázisba kerülnek (Deák, 2006). A kialakult folyadékfázis biztosítja, hogy a növényi részek levegőtől elzártan helyezkedjenek el, egyes zöldségfélék esetében felöntőlé alkalmazása indokolt (Montet et al., 2014). A sózás irányítja, hogy mely baktérium fajok kezdik az erjesztést. Ezáltal a sózás, a kialakult élelmiszer minőségét is befolyásolja. A savanyított uborka állagát kedvezőtlenül befolyásolja a termelődő széndioxid. Ezért célszerűen magasabb sókoncentrációt alkalmaznak (>3,5%), azért, hogy az alacsonyabb sótűrőképessége *Leuconostoc* fajokat visszaszorítsák (Di Cagno, 2016; Pederson – Albury, 1969).

A tömörítés segíti az anaerob viszonyok kialakulását. A sózott zöldségeket tömörítik, vagy súlyokkal lenyomják a fermentáló edényben, így a zöldség a levegőtől elzártan a lé alá kerül. Így a savanyított termékek előállításának Jó Higiéniai Gyakorlata szerint, a tejsavas fermentációhoz szükséges körülmények biztosítása garantálja, a minőségi és biztonságos termék előállítását.

A fermentáció szakaszában az edényt lefedik, és hagyják a zöldségeket 15-20°C-on erjedni, terméktől függően, akár néhány hétig is (Swain et al., 2014). A fermentáció során elszaporodnak a tejsavbaktériumok, és a szénhidrátokat tejsavvá alakítják. Néhány hagyományosan előállított készítmény, jellemző sókoncentrációja és erjesztési ideje: savanyúkáposzta 2–3% sótartalom és néhány hét, kimchi 2-4%-os sótartalom, néhány naptól néhány hónapig, a hőmérséklettől függően, fermentált uborka 5-7%-os sótartalom, hőmérséklettől függően, akár két-három hét is lehet (Di Cagno et al., 2016). Ezután a fermentált zöldségeket még tovább is érlelhetik, ami további íz- és textúraváltozásokat eredményezhet.

A csomagolás különbözhet aszerint, hogy a csomagolást is képző üvegben történik az erjesztés, vagy hordókban fermentálnak, és utólag porciózzák a termékeket. A Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus 2-603) ajánlása szerint hosszabb tárolás esetén a termékeket pasztörözhetik, vagy tartósítószerrel adagolhatnak hozzá. A készítményeket hűvös helyen tárolják az értékesítésig.

Az elkészült termékben a savas kémhatást a feldúsult tejsav, és a heterofermentatív módon képződő esetsav eredményezi. Olyan élelmiszerekben, ahol alacsony a pH érték, a gyenge szerves savak antimikrobiális hatása erősebb (Armbruszt, 2015a). A tejsavbaktériumok

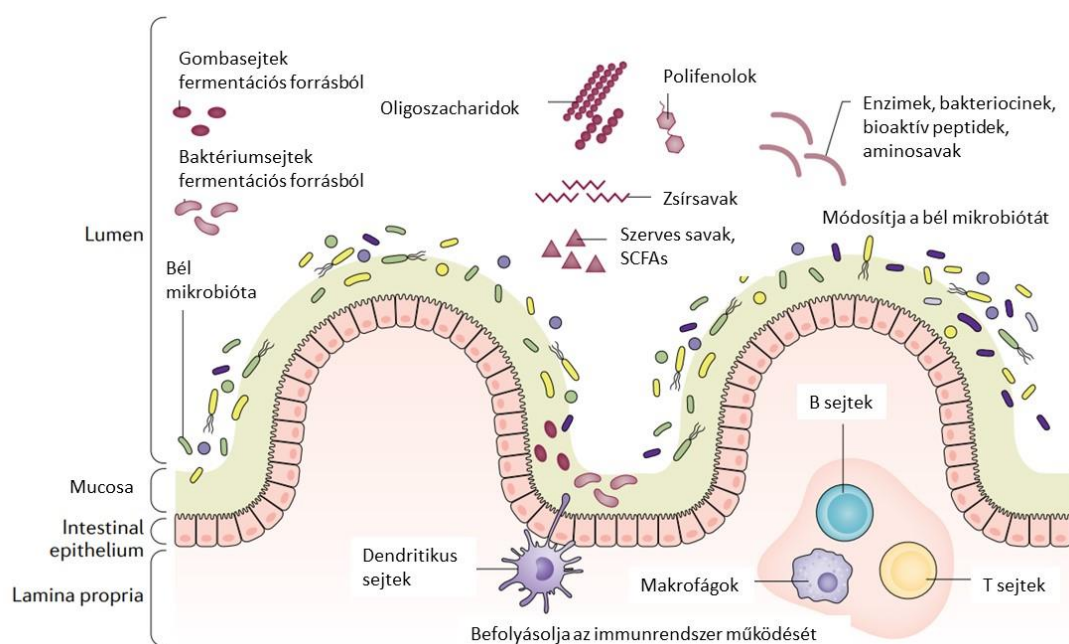
ezenfelül képesek bakteriocinek termelésével gátolni a patogén mikróbak szaporodását. (Zacharof – Lovitt, 2012)

A növényi termékeket előállító vállalkozásoknak a 852/2004/EK rendelet élelmiszer-higiéniai előírásainak kell megfelelnie. Az élelmiszerek megengedhető mikrobiális szennyezettségének maximális mértékét Magyarországon a 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet határozza meg az adott élelmiszer termék kategóriában.

1.4. Fermentált zöldségkészítmények kedvező élettani hatásai

A fermentált élelmiszerek és az egészségre gyakorolt hatásuk kapcsolata igen bonyolult. Számos tanulmány foglalkozik egy-egy adott termékre, fajra, alapanyagra specifikus jellemzők kedvező élettani hatásaival. Izgalmas és összetett téma a bél mikrobiótával és a gazdaszervezet immunrendszerével való kölcsönhatás. A „posztbiotikumyszerű” elpusztult bakteriális sejtek sejtfelszíni molekulái befolyásolhatják az immunrendszert, vagy a kiszabadult enzimkészletükkel segítheti az emésztést. Az élő szaporodóképes baktériumsejteket befolyásolhatják a zöldségalapanyagokból származó prebiotikumok és kölcsönhatásba léphetnek a bél mikrobiótával, és az immunrendszerrel (Vinderola et al., 2023). A lehetséges hatásokat összefoglalva a 4. ábra mutatja (Marco et al., 2021).

4.ábra: Fermentált élelmiszerek összetevőinek bioaktív anyagokká alakulása
(Forrás: Marco et al., 2021.)



A tejsavbaktériumok csökkentik az ételek glikémiás indexét azáltal, hogy lebontják a mono- és diszacharidokat, segítik a felszívódást, mert poliszacharidokat, fehérjéket, zsírokat hidrolizálnak (Marco et al., 2021). Képesek polifenol vegyületeket, flavonoidokat bontani, így növelik azok hozzáférhetőségét (Bíró, 2014), ezáltal gátolhatják a gyulladásos citokinek termelését (Shahbazi et al., 2021). A polifenol vegyületek csak kevés: *Escherichia coli*; *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.* baktériumfaj tudja bontani (Bíró, 2014). A fermentált élelmiszerek baktériumai képesek mérgező anyagokat ártalmatlanítani, mikotoxinokat eliminálni (Vinderola – Ritieni, 2015). Növényi eredetű antinutritív anyagokat (fitátokat, lektineket) bontanak le (Bíró, 2014). Antimikrobiális anyagokat, szerves savakat, tejsav, ecetsav, vajsav, kapronsav, ezenkívül hidrogén-peroxidot termelnek, melyek, de főleg a butirátok, gátolják a patogén mikroorganizmusok szaporodását (Leroy–De Vuyst, 2004; Mokoena 2021), és csökkentik az inzulin rezisztencia kialakulását is (Bíró, 2014). Pishva és munkatársai 2009-ben joghurtból izolált LAB fajok antibakteriális hatását igazolták *Escherichia coli* and *S. enterica* Typhi enteropatogén baktériumokon. A butirátok antikarcinogén hatású vegyületek is, elősegítik a colon epithelialis sejteinek differenciálódását, és gátolják a szaporodásukat (Bíró, 2014). Fermentált élelmiszerekben található LAB-ok képesek lehetnek az immunrendszert jelátviteli folyamatokon keresztül befolyásolni (Marco et al., 21).

Élelmiszer eredetű mikroorganizmusok viselkedésének tanulmányozásában ellentmondásokat fedezhetünk fel. A szakirodalom egy része azt állítja, hogy például a joghurt eredetű baktériumok (*S. thermophilus* és *L. bulgaricus*) ugyan el tudnak jutni a vastagbélbe, de ott nem kolonizálnak, és nem tapadnak meg (Csapó – Albert, 2018), míg más szerzők szerint átmenetileg megtelepedhetnek a bélben (Di Cagno et al., 2016). Hasznosságukat viszont nem vitatják. Egyes szerzők úgy tartják a mezofil tejsavbaktériumok nem rendelkeznek olyan sav-, és epetűrő tulajdonságokkal, hogy képesek legyenek élve eljutnia a vastagbélbe (Csapó – Albert, 2018). Ennek ellenére Cele és munkatársai, 2022-ben fermentált sárgarépa és gyömbér készítményekből izolált *Leuconostoc mesenteroides* törzsek magas sav-, epe-, és lizozim tűrő képességét határozták meg, hasonló tűrő képességgel kapcsolatos megfigyeléseket más tanulmányban is olvashatunk (Vesa et al., 2000). Zubaidah és munkatársai 2020-ban és 2023-ban végzett kísérleteikben gyulladásos biomarkerek csökkenését tapasztalták *E. coli*val megfertőzött egerekben, amelyeket *Lactobacillus casei*t és *Leuconostoc mesenteroides*t

tartalmazó fermentált zöldségkészítményekkel tápláltak. Gyulladásgátló mechanizmusukkal is sok tanulmány foglalkozik (Shahbazi et al, 2021).

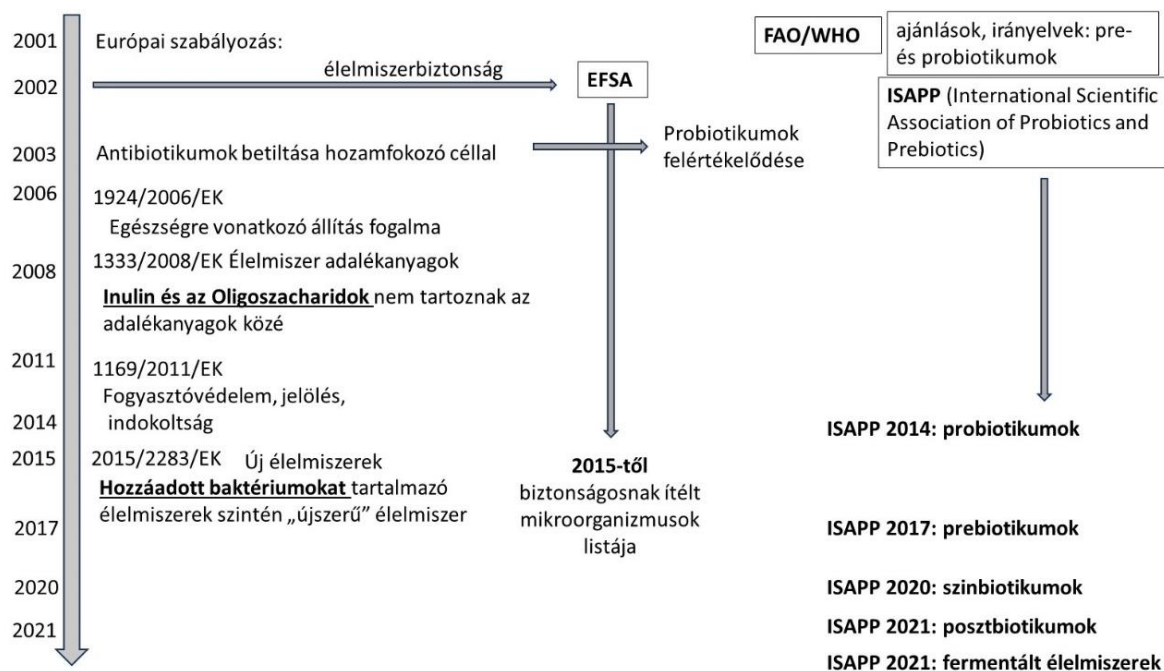
1.5. Fermentált élelmiszerek és funkcionális élelmiszerek tudományos és jogi szemszögből

A mai köznyelvben az élőflórás, probiotikus, prebiotikus szavak és fogalmak összemosódhatnak, sokan egyenlőség jelet tesznek a fermentált élelmiszerek és a felsorolt kategóriák között. A fogyasztói piacot elárasztó reklámok világában a következetlen szóhasználat számos félreértésre adhat okot. A szakirodalmat áttekintve is megfigyelhető, hogy a kifejezések jelentése az elmúlt évtizedek alatt folyamatosan változik és finomodik, és használata még mindig nem egységes. A spontán módon fermentált élelmiszerek nem tartoznak a probiotikus termékek körébe, noha a fogyasztói felfogásban megfigyelhető ezen fogalmak felcserélése vagy szinonimaként való használata.

Magyar vonatkozásban élőflórás, prebiotikus, probiotikus és szinbiotikus kifejezéseket a Magyar Élelmiszerkönyvben, a tejtermékek kapcsán olvashatunk, kritériumokat a csíraszámok tekintetében is rögzít. A probiotikus baktériumok a termékben 10^6 CFU/g csíraszám mennyiségben kell, hogy jelen legyen a lejáratidő utolsó napjáig. A Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus 2-603) rögzíti a tejsavas fermentálással készült zöldségkészítményekre vonatkozó irányelveket is, csíraszámokra vonatkozó követelményeket itt nem tartalmaz. Hiszen a tejsavbaktériumok jelenléte a kész termékekben nem elvárt, és a hosszabb eltarthatóságot hőkezeléssel vagy tartósítószer hozzáadásával is biztosíthatják.

A hozzáadott baktériumok, mint probiotikus hatású mikroorganizmusok más szabályozási eljárások alá tartoznak. A funkcionális élelmiszerek körébe tartozó gazdagított probiotikus, és prebiotikus termékek népszerű termékek az egészségtudatos vásárlók körében. A FAO/WHO 2001-ben ajánlásokat és irányelveket fogalmazott meg a probiotikus mikroorganizmusok meghatározására. Tóth 2018-ban összefoglalta, melyek az irányadó európai jogszabályok a pre- és probiotikumok szemszögeiből. A tudományos szakmai és jogi szabályozásokat időrendben az 5. ábra foglalja össze.

5: ábra: A „biotikus” és fermentált élelmiszerek tudományos és jogi szempontjai
(Forrás: Tóth, 2018. és Vinderola et al., 2023. alapján saját szerkesztés)



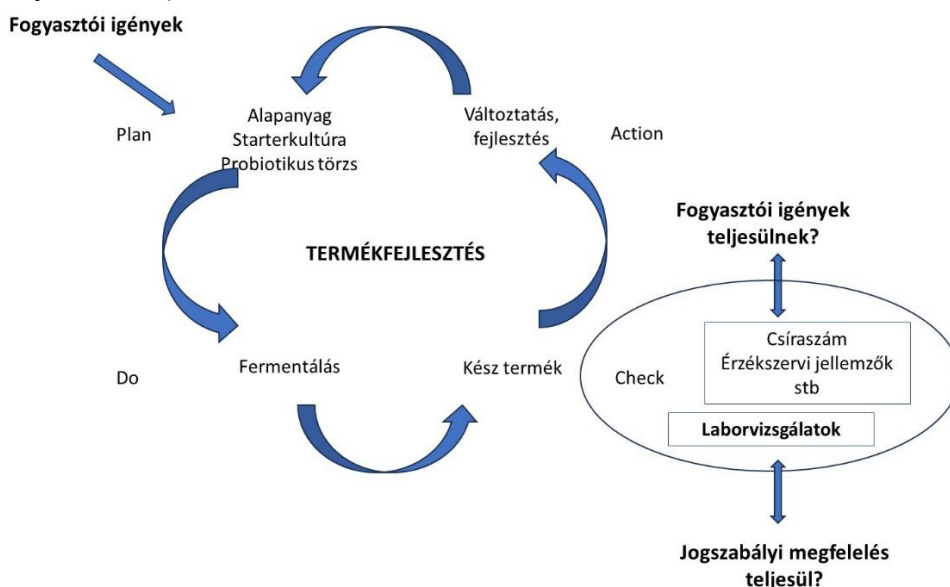
A funkcionális élelmiszer kérdéskört az európai jogszabályok az egészségre vonatkozó állításokon keresztül közelítik meg. Az egészségre vonatkozó állítás a 1924/2006/EK rendeletben, majd a 1169/2011/EK jelölési rendeletben jelenik meg. Az élelmiszerekhez hozzáadott adalékanyagokkal kapcsolatban a 1333/2008/EK rendelet az irányadó, ebben megemlíti, hogy az inulin és oligoszacharidok (prebiotikumok) nem tartoznak bele az adalékanyagok körébe. A (EU) 2015/2283 rendelet az „új élelmiszerek” csoportba sorolja a hozzáadott mikroorganizmust tartalmazó termékeket (5. ábra). A pre- és probiotikus élelmiszeripari trendeknek a fenti jogszabályok mentén kell mozogniuk (Tóth, 2008). A European Food Safety Authority (EFSA) 2015 óta közzéteszi a biztonságosnak ítélt mikroorganizmus törzsek listáját (Tóth, 2018). Mindeközben 2002-ben megalakult az International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) nemzetközi tudományos társaság, amely 2014-ben definiálta a probiotikus élelmiszerek csoportjait. A meghatározás szerint azok az élelmiszerek probiotikusak, amelyekben hozzáadott formában van jelen a probiotikus törzs, a fermentált élelmiszerek, más kategóriába esnek (Hill et al., 2014). Az ISAPP konszenzus nyilatkozatot adott (5. ábra) ki 2017-ben a prebiotikumokról (Gibson et al., 2017), 2020-ban a szinbiotikumokról (Swanson et al., 2020), 2021-ben a posztbiotikumokról (Salminen et al., 2021), és 2021-ben a fermentált élelmiszerekről is (Marco

et al., 2021). A fermentált élelmiszer elképzelhető módon a pre-, pro, szin- és posztbiotikus tulajdonságok lehetséges hordozója lehet, de nem sorolható egyik kategóriába sem, a fogalmakat nem lehet felcserélni (Vinderola et al., 2023). A társaság definíciója szerint a fermentált ételek és italok, „olyan élelmiszerek, amelyek a kívánt mikrobiális növekedéssel és az élelmiszer összetevők enzimatiszus átalakulásával készültek” (Marco et al., 2021).

1.6. Termékfejlesztések

A minőségellenőrző vizsgálatokra számos szempontból szükség van. A termékfejlesztés területén is, a fermentációs folyamatok ellenőrzésével, és felügyeletével garantálható, a termékek folyamatos minősége, biztonsága, a jogszabályoknak való megfelelése, és a fogyasztói igények teljesülése, és így csökkenthető a kockázatok mértéke is (6. ábra).

6.ábra: Termékfejlesztések és a minőségellenőrző laborvizsgálatok kapcsolata
(Forrás: saját munka)



Az élő mikroorganizmusokat tartalmazó termékek, napjainkban kiemelt szerepet töltenek be az egészségügyi és az élelmiszeripari szektorban. A magyarországi felmérések szerint a fogyasztókat az ár-bizalom-íz egyenlő arányban befolyásolja vásárlás döntésében (Szabó, 2015). Az egészségtudatos fogyasztók olyan élelmiszereket választanak, amelyek rendszeres fogyasztása lehetőséget teremt az egészség megőrzésére és javítására. A termékfejlesztés szempontjából fontos, a jótékony hatású összetevő meghatározása. A fermentált élelmiszerek köre számos termékfejlesztési lehetőséget rejt. Fejlesztési irány lehet a probiotikus tulajdonságú, gyorsan savanyító törzsek szelektálása, a termékeket kedvezően

befolyásoló starterkultúrák fejlesztése (Alameri et al., 2018). Alacsony hisztamin (Halász et al., 1999), magasabb vitamin tartalmú termékek (Penas et al., 2010), növényi alapú joghurt készítmények, funkcionális növényi és gyümölcsalapú fermentált italok előállítása csak néhány a sokféle lehetőség közül (Di Cagno et al., 2016).

1.7. Minőségbiztosítás

Az élelmiszervizsgálatok minőségbiztosítása a vonatkozó ISO szabványok alkalmazásán alapul. A módszerek pontos betartásával a kapott eredmények összehasonlíthatóvá válnak. A szabványok rögzítik a vizsgálatokhoz szükséges mintavétel, feldolgozás és kimutatás pontos körülményeit és eljárásait.

A gyors mikrobiológiai módszerek előnyei a gyorsaság, nagy áteresztőképesség, a mintából való direkt vizsgálat lehetősége. A vizsgálni kívánt anyag paramétereit megfelelő specificitással, szelektivitással, érzékenységgel mutassa ki, igazodjon a minta sajátosságaihoz a meghatározási és kimutatási küszöb, tág határok között mozogjon a zavartűrése, és precizitás jellemezze (Armbruszt, 2015b).

1.8. Fermentált élelmiszerek tejsavbaktérium számának becslése

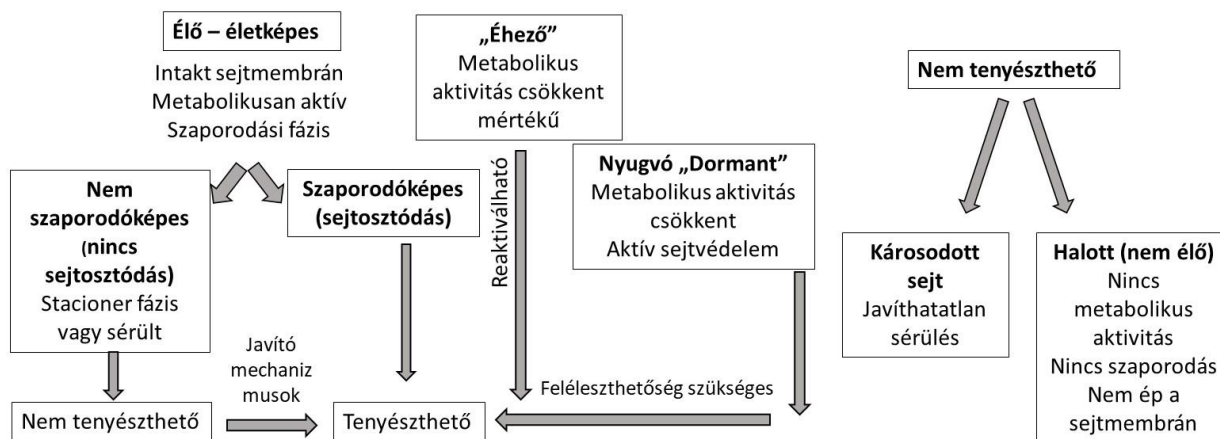
1.8.1. Tenyésztéses vizsgálatok

A tejsavbaktériumok csíraszámának meghatározása fontos lehet élelmiszerbiztonsági és minőségellenőrzési szempontból. A csíraszámbecslés pontatlansága, a módszer technikájából adódik, mert a táptalaj felszínére felvitt baktérium szuszpenzió sejtjei, a mechanikai szélesztés során nem csak egyesével válnak szét, hanem kötegekbe rendeződve is maradhatnak. Az eredményeket ezért telepképző egységekben (TKE) kell megadni (Davis, 2014). A mezofil tejsavbaktériumok tenyésztéses csíraszám meghatározását a MSZ ISO 15214 szabvány rögzíti. A tenyésztéses vizsgálatok nagy előnye, hogy lehetőséget teremt a baktériumfajok azonosítására. Erre alkalmas elfogadott módszer MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight- Mass Spectrometry) analízis. A kimutatás alapját a mikroorganizmusok egyedi fehérjeprofilja képezi (Lovász, 2014).

Azonban az élelmiszerekben különböző élettani állapotban találhatóak a baktériumsejtek (7.ábra.) A különböző élettani állapotú sejtekről számszerű adatokat a

tenyésztéstől független módszerekkel kaphatunk (Davis, 2014; Fan et al., 2021, Vinderola et al., 2023).

7.ábra: Baktériumsejtek különböző élettani állapotai fermentált élelmiszerekben
(Forrás: Vinderola et al., 2023 alapján)



1.8.2. Luminometria

A luminometria egy fénykibocsátást detektáló módszer. A biolumineszcens kimutatás alapját az adja, hogy az élő sejtek ATP tartalma in vivo kimutatható a luciferin-luciferáz enzimrendszeren keresztül. A lumineszcencia fényintenzitása arányosan változik a rendszerben található ATP mennyiségével, így arányosan változik az élő sejtek számával is (Armbruszt, 2015b). Az enzimrendszert rekombináns formában számos gyári kit tartalmazza, többek közt a BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay kit (Promega). A kit egy lépéses nagy áteresztőképességű vizsgálatra ad lehetőséget, akár 100 baktériumsejt is kimutatható vele (http¹). A biolumineszcens módszert élelmiszeripari termékek vizsgálatára, felület fertőtlenítés hatékonyságának ellenőrzésére is használják. Felületi tisztasági ellenőrzése esetén már 10⁴ TKE/100 cm² szennyezettség is kimutatható (Armbruszt, 2015b).

1.8.3. Áramlási citometria

Az áramlási citometria alkalmazható az élelmiszer-mikrobiológiában, mivel gyors és érzékeny módszer a baktériumsejtek egyenkénti elemzésére és számlálására. Az érzékenysége függ attól, hogy milyen az élelmiszer-maradványoktól való mentesítés hatékonysága. Lehetőséget teremt különböző fiziológiás állapotban lévő baktériumsejtek elkülönítésére is.

Nem függ a tenyésztéstől, és egyszerre több paraméter elemzése is lehetséges. Detektálható a membránintegritás, a membránpotenciál, intracelluláris pH, enzimaktivitás, kimutathatók kórokozó mikroorganizmusok fluoreszcens specifikus antitest jelöléssel, és szorter egységgel összekötve megoldható a kiválasztott populáció sejtenkénti kiválogatása további vizsgálatok céljára (Comas-Riu – Rius, 2009). A mikroorganizmusok az élelmiszerekben stresszhatások következményeként arra kényszerülhetnek, hogy életképes, de nem tenyészthető (Viable But Not Culturable: VBNC) állapotba kerüljenek (7. ábra). Áramlási citometriával detektálhatóak élő, aktív, halott és stresszhatások alatt álló sejtek is (Comas-Riu– Rius, 2009).

A membránintegritást vizsgáló technikák a festék kizárásával vagy a festék megtartásával adnak információt a sejtekről. Aktív kizáró típusú festék a halott sejtek elkülönítésére alkalmas propídium-jodid (PI), amely nukleinsavat fest azokban a sejtekben, ahol áteresztő a membrán, vagyis halottak. Kombinálva Syto sejtátersztő nukleinsav festéssel elkülöníthetővé válnak a halott sejtek, a többi állapotban lévő baktérium sejtől (Bunthof, 2001).

A membránpotenciál jelző technikák, olyan töltött lipofil vegyületeket használnak, amelyek könnyen átjutnak a sejtmembránon, és összegyűlnek a sejtben a sejt elektromos töltése szerint. A Rhodamin-123 egy kationos lipofil festék, melyet széles körben használnak baktériumfestésre (Matsuyama, 1984; Yu et al., 2020), önmagában vagy PI festékkel kombinálva (Bunthof, 2001). Kaprelyants és munkatársai 1996-ban leírták, hogy a Rho-123 festéssel elkülöníthetőek a baktériumtenyészet „dormant” állapotú sejtei.

A sejtaktivitást nem specifikus észteráz enzimműködés révén lehet detektálni, erre olyan észteráz szubsztrát festék alkalmas, amely permeábilisan bejut a baktériumsejt citoplazmájába és ott az észteráz aktivitás következtében fluoreszkálóvá válik. Ilyenek a fluoreszcein diacetát és a calcein AM festékek csoportjai (Bellassi et al., 2023; Bunthof, 2001).

A tejtermékekben a tejsavbaktérium csíraszám meghatározás egyik metodikája az ISO 19344:2015 szabványban rögzített áramlási citometriai vizsgálat. A szabvány Syto9-et, propídium jodidot (PI) carboxyfluoreszcein diacetátot (CFDA) felhasználó módszereket alkalmaz. Feltételezi, hogy egyéb mikroorganizmusok jelentős számban nincsenek jelen a mintában a gyártási technológiának köszönhetően. A szabvány szerint a csíraszám meghatározási határ 10^6 sejt/g termék.

Azon megfontolás alapján, hogy a fermentált zöldségfélék is jelentős számban tartalmazhatnak tejsavbaktériumokat, az áramlási citometria is alkalmasnak tűnik a mennyiségi meghatározásra.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Vizsgált termékek

A vizsgálat céljára Magyarországon összegyűjtött 1. táblázatban feltüntetett fermentált zöldségkészítményeket mintavételezésig 4°C-on hűtve tároltam. A termékek pH értékeit kézi Testo típusú pH mérővel mértem, standard oldattal (pH 4 és 7 (Testo)) történő kalibrálás után.

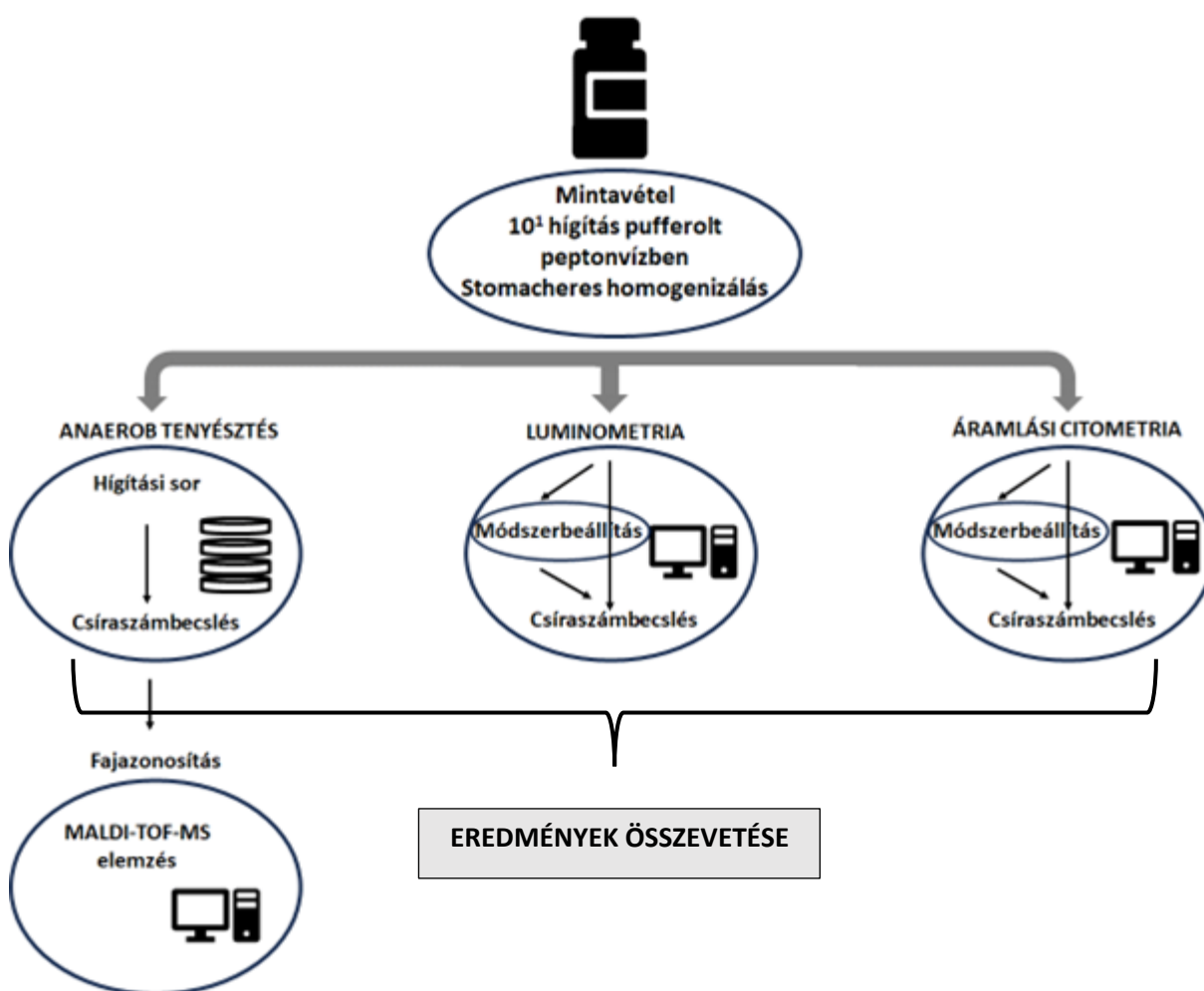
1. táblázat: Befőtt üvegekben forgalmazott zöldségkészítmények
(Forrás: saját munka)

Sor-szám	Készítmény	Rövidítés	Lejárat	Vizsgálat dátuma	Felöntőlé	Aprítás módja
1.	Cukorborsó	B	2024.03.22.	2023.01.31.	áttetsző, alján pellet van	egész
2.	Lilakáposztalilahagyma	Lh	2024.04.20.	2024.01.22.	élénk lila, nincs pellet	gyalulva
3.	Káposztarépa-brokkoli	KRB1	2023.11.15.	2023.11.20.	áttetsző, alján nincs pellet	gyalulva
4.	Káposztarépa-brokkoli	KRB2	2024.02.28.	2024.02.21.	áttetsző, alján nincs pellet	gyalulva
5.	Káposztakápiapaprika	KP1	2024.02.28.	2024.02.21.	áttetsző, alján nincs pellet	gyalulva
6.	Káposztakápiapaprika	KP2	2024.02.28.	2024.02.22.	áttetsző, alján nincs pellet	gyalulva
7.	Cékla-torma	CK	2023.11.30.	2023.11.30.	sötétlila	reszelve
8.	Cékla-répagyömbér	CRGY1	2024.02.28.	2024.02.27.	sötétlila	reszelve
9.	Cékla-répagyömbér	CRGY2	2024.02.28.	2024.02.27.	sötétlila	reszelve
10.	Sárgarépa	R0	2023.12.30.	2023.12.12.	áttetsző, alján pellet van	vékonyra szeletelve
11.	Sárgarépagyömbér	RGY0	2024.02.21.	2024.02.01.	áttetsző, alján pellet van	vékonyra szeletelve
12.	Sárgarépa	R	2024.02.28.	2024.01.31.	narancssárga, sűrű	reszelve
13.	Sárgarépa-Gyömbér	RGY1	2024.01.31.	2024.01.31.	narancssárga sűrű	reszelve
14.	Sárgarépa-Gyömbér	RGY2	2024.01.31.	2024.01.31.	narancssárga sűrű	reszelve
15.	Sárgarépa-Gyömbér	RGY3	2020.02.28.	20204.02.15.	narancssárga sűrű	reszelve
16.	Sárgarépa-Gyömbér	RGY4	20204.02.28.	2024.02.20.	narancssárga sűrű	reszelve

2.2. Csíraszámbecslések összehasonlításának fő technikai lépései

A csíraszámbecslések összehasonlítását a 8. ábrán szemléltetett módon végeztem. A mintavételt követően a decimális hígítás első elemét homogenizáltam, majd külön-külön meghatároztam, anaerob tenyésztéssel, luminometriával és áramlási citometriával a készítmények tejsavbaktérium csíraszámát.

8. ábra: Csíraszámbecslések összehasonlításának fő technikai lépései
(Forrás: saját munka)



2.3. Tenyésztéshez és fenntartáshoz használt táptalajok, izolátumok, törzsek

Az anaerob tenyésztéses vizsgálatokhoz és a módszerbeállításokhoz táptalajokra, hígító és mosó pufferoldatokra volt szükség. A módszerbeállításokhoz teszt izolátumokat használtam, amelyek fenntartása is táptalajokat igényelt. A felhasznált anyagok a következők voltak:

de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) táptalaj tejsavbaktérium tenyésztéshez: MRS leves (Biolab Diagnosztikai Laboratórium Zrt) táptalaj elkészítése a gyártó utasítása szerint (6,2 pH),

kiegészítve 18 g/l agarral (Merck). Sterilizés autoklávban 15 perc 121°C-on. A 47°C-ra kihűtött táptalajba sterilre szűrt kálium-szorbát oldatot kevertem 1,5 mg/l végkoncentrációban az élesztők és penészek szaporodásának gátlására.

Schaedler táptalaj (Scharlab) *Lachancea thermotolerans* élesztő izolátum fenntartásához.

Elkészítése a gyártó utasítása szerint.

Pufferolt peptonvíz: hús pepton (pankreatikusan emésztett (Merck)) – 10 g, nátrium-klorid – 5 g, dinátrium-hidrogénfoszfát-dodekahidrát – 9 g, kálium-dihidrogén-foszfát – 1,5 g, desztilláltvíz – 1000 ml, pH (RT) $7,0 \pm 0,2$, sterilizés autoklávban 121°C, 15 perc

Foszfát puffer sóoldat (PBS) (Lonza) egyszeres töménységben, pH 7,4

Müller-Hinton tápfolyadék (Bio-Rad): elkészítés a gyártó utasítása szerint

A módszerek beállításokhoz használt mikroorganizmusok: a munka kezdeti fázisában azonosított, gyorsan, megbízhatóan növekvő izolátumokat választottam teszt törzseknek: 6-os izolátum (*Pediococcus ethanolidurans*); 38K izolátum (*Lactiplantibacillus plantarum*); *Lachancea thermotolerans*; *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

2.4. Mintavétel és homogenizálás

A mintavételezés és hígítási sorok elkészítéséhez az MSZ ISO 6887-1 szabvány útmutatásait vettem alapul. A vizsgálatok lejáratí időn belül történtek 2023. november és 2024. február közötti időszakban. A készítmények üvegeit 70%-os alkoholos külső áttörést követően bontottam ki. A zöldségállományból 10 g-ot ($\pm 5\%$) mértem ki, amelyet hígítottam 90 ml szobahőmérsékletű pufferolt peptonvízzel (pH $7,00 \pm 0,2$). Stomacher (BA 6021) készülékkel homogenizáltam 90 sec időtartamig. Az elkészült szuszpenzióból háromféle módszerrel vizsgáltam a csíraszámokat.

2.5. Csíraszámbecslés anaerob tenyésztéssel MRS táptalajon

A kiindulási szuszpenziókból 1 ml térfogatot tovább hígítottam öt tagú decimális hígítással 10 ml-es végtérfogatokban. Az egyes hígításokat 5 sec vortexes keveréssel homogenizáltam. Két egymást követő hígítási tagból három párhuzamos szélesztéses leoltást végeztem 100-100 μ l térfogattal, előzőleg Petricsészékbe öntött MRS táptalajra. Az inkubálási paramétereket MSZ ISO 15214 szabvány alapján választottam meg 30°C -on, anaerob körülmények között. A tenyésztés eredményének leolvasását 72 h múlva végeztem. Anaerob

közeget Oxoid típusú anaerob Jarban Anaerocult™ A (Merck) rendszerrel, Anaerotest strip (Merck) indikátor mellett biztosítottam. A telepképző egységek számolásánál (TKE) a 30-300 közötti telepszámú csészék eredményeit vettem figyelembe, majd azokat átlagolva, hígítási szorzótényezővel kalkulálva egy gramm termékre vonatkoztattam az eredményeket.

2.6. Fajmeghatározás MALDI-TOF-MS- készülékkel

A fajmeghatározásokat Bruker MALDI Biotyper sirius IVD típusú készülékkel végeztem. Az MRS táptalajon tenyésztett különböző telepmorfológiával rendelkező jellemző telepeket átoltottam friss MRS táptalajra és háromszori átoltással az izolált telepekből tisztatenyészetet hoztam létre, MALDI-TOF-MS meghatározásokat ezután végeztem.

Két mintaelőkészítési módszert használtam. 1./ A direkt feltárás esetén a meghatározni kívánt mikroba tenyészet telepéből steril fogvájóval mintát vettem és felvittem a mintatartó lemez megfelelő pozíciójára. A felvitt mintaanyagra 1 µl 70% -os hangyasavat pipettáztam, majd a teljes száradást követően 1µl Cyano-4-Hydroxy-cinnamic acid (HCCA) mátrix-oldatot cseppentettem a mintára. Száradás után történt az analízis. 2./ Azokat a telepeket melyeket in situ feltárással nem sikerült azonosítani, egy hosszabb előkészítéssel próbáltam feltárni. A mikroba telepekből 1 µl-es térfogatú kacs segítségével 96 lyukú microplate lemezbe előzőleg bemért 75 µl HPLC minőségű vízben szuszpenziót készítettem. A mintákra 225 µl abszolút etanolt mértem, felszuszpendáltam, majd a lemezt centrifugáltam (Hermle Z326 K) 2500 g-vel 5 percig. A felülúszó nagy részét eltávolítottam, majd megismételtem a centrifugálási lépést. A maradék felülúszót is óvatosan eltávolítottam és hagytam száradni a mintákat 5 percig szobahőmérsékleten. Ezután 25 µl 70% -os hangyasavval felszuszpendáltam az üledéket, majd 25 µl 50% -os acetonitrilt adtam hozzá, majd ismét szuszpendáltam. A mintákat ezt követően centrifugáltam 2500 g-n 5 percig. A mintatartó lemezre a felülúszókból 1 µl-t vittem fel, hagytam száradni, majd 1 µl HCCA mátrix-oldattal fedtem le és a teljes száradás után analizáltam.

A felvett tömegspektrumok alapján a szoftver összehasonlítja, majd megadja a legvalószínűbb találatokat. A valószínűséget pontszámmal jellemzi. Az elemzéshez Standard adatbázist használtam. A faj azonosítása nagy valószínűségű, ha a pontszám 2,00-3,00 közé esik, alacsony valószínűségű, ha 1,70-2,00 között van, ekkor a mikroorganizmust csak nemzetség szinten sikerült beazonosítani, és nem megbízható az eredmény 1,7 alatt.

2.7. Csíraszámbecslés luminometriával

A mérést GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader készülékkel végeztem 0,25 másodperces integrációs idővel. A vizsgálathoz használt BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay kit a Promega gyártó terméke. Az utasítási javaslatnak megfelelően Müller-Hinton (MH) tápfolyadékban mértem a lumineszcencia értékeit. A mért lumineszcencia, a leírás szerint, a luciferin-luciferáz enzimrendszeren keresztül mért ATP tartalommal arányos. Fehér színű, a lumineszcencia mérésre alkalmas 96 lyukú lemezben végeztem a vizsgálatot, minden esetben három parallel mintával. A kalibrációs egyenest vettem fel hígított szintenyészetek lumineszcencia értéke és ezzel párhuzamosan kitenyészett telepkepző egységek (TKE) adatai alapján. Ehhez MH tápfolyadékban 0,1 OD (600nm-en) értékre beállított baktériumszuszpenzió decimális hígításait készítettem el és mértem a hígításokhoz tartozó lumineszcenciát. Azért, hogy párhuzamosan kövessem a TKE-ek számát, leoltottam a hígítási sor tagjait MRS táptalajra. A lumineszcencia méréshez a zsebekbe 100 µl térfogatú mintákhoz 100 µl Reagenst mértem, kevertetés és öt perc várakozás után detektáltam a jelet. A módszer adaptálása után a fermentált zöldségkészítmények tízszeresen hígított mintáiból 200-200 µl-t mértem be egy-egy zsebbe. Ezután a lemez centrifugálásával (2500 g, öt perc) összegyűjtöttem a sejteket a zsebek fenekén, majd a felülúszóból 150 µl-t eltávolítottam és 150 µl Müller-Hinton tápfolyadékra cseréltem. Három mosási lépés után 100 µl felülúszót pipettáztam le, majd a zsebben maradt 100 µl mintához 100 µl Reagenst tettem, kevertetés és öt perc várakozás után mértem a lumineszcencia jelet. A csíraszámbecslés eredményeit a kalibrációs egyenes alapján számoltam, a végeredményt egy gramm termékre vonatkoztatva adtam meg.

2.8. Csíraszámbecslés áramlási citométerrel

A vizsgálatokat Beckman Coulter DxFLEX áramlási citométer készülékkel végeztem. A műszerbeállítások a következők voltak, küszöb: SSC-H 4000 érték, közepes felszívási sebesség, $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ esemény gyűjtése egy mintából. Az előkészítésnél szükséges a készülék adottságai miatt 50 µm-es szűrőn átszűrni a mintákat. A tisztatenyészetek esetében a baktérium szuszpenziót PBS oldatban 0,35 OD (600nm-en) értékre állítottam be. Az áramlási citometriás méréshez a szuszpenzió további hígítása szükséges nagyságrendileg az 1000

esemény/ μl sűrűség eléréséhez. Minden esetben három parallel mintával dolgoztam. A termékvizsgálatoknál a decimális hígítások első, esetenként második tagját vizsgáltam.

Felhasznált festékek: LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Thermofisher): Syto9 (3,34 mM) 3×10^4 -szeres hígítása PBS-ben; Propídium-jodid (PI) (20 mM); Rhodamin-123 (Rho-123) (Biotinum) 5 $\mu\text{g/ml}$ PBS-ben. A festetlen, az egyszeresen és kétszeresen festett mintákat a 2. táblázat szerint készítettem, áramlási citometriai vizsgálathoz használt csövekben (BD Falcon).

2. táblázat: Áramlási citometria festési protokollja

(Forrás: saját munka)

1.	Festetlen minta színtenyészetből / zöldségtermékből	200 µl PBS + 20 µl baktériumszuszpenzió / zöldség-hígítás	mérés (5 × 10 ⁴ esemény)	
2.	Syto9 / PI festés színtenyészetből / zöldségtermékből	200 µl Syto9 + 20 µl baktériumszuszpenzió / zöldség-hígítás + 0,1 µl PI	Inkubálás: 15 percig 37 °C-on sötétben, majd mérés (5 × 10 ⁴ esemény)	
3.	Rho-123 / PI festés színtenyészetből / zöldségtermékből	200 µl 5 µg/ml Rho- 123 + 40 µl baktériumszuszpenzió / zöldség-hígítás	Inkubálás: 30 percig 37 °C-on sötétben, Mosás 3x 1 ml PBS-BSA (1 %), centrifugálás: 3000g, 5 perc, az utolsó centrifugálás után 200 µl üledéket hagyva	+200 µl PBS + 0,1 µl PI (Végtér fogat 400 µl) Inkubálás: 15 percig 37 °C-on sötétben, majd mérés (5 × 10 ⁵ esemény)

A kapukat a színtenyészetek segítségével állapítottam meg. A csíraszámbecslések eredményeit a kikapuzott populációk esemény/ μl értékeiből a megfelelő hígítások szorzatai alapján számoltam, a végeredményt egy gramm termékre vonatkoztatva adtam meg.

2.9. Statisztikai értékelés

A kiértékelés során a mérési adatok átlagait és szórásait vettem figyelembe.

A mérési adatok közötti összefüggés leírására egyszerű lineáris regressziót alkalmaztam.

3. Eredmények és kiértékelés

3.1. Csíraszámbeclés anaerob tenyésztéssel, pH értékek

A fermentált zöldségkészítményeket az alapanyagok szerint három csoportra osztottam. Káposzta alapú termékek csoportjába öt üveg, sárgarépa alapú termékekhez hét üveg, cékla alapú termékekhez három üveg, egyéb csoportba a cukorborsót soroltam. Minden termék erősen savas kémhatású volt. A termékek pH értéke átlagosan $3,36 \pm 0,12$. A termékek kémhatását és az anaerob tenyésztés csíraszámbeclési eredményeit a 3. táblázat foglalja össze. Három termék esetén nem tenyésztett ki tejsavbaktérium MRS táptalajon, a vizsgálati körülmények között, ezekkel a készítményekkel a továbbiakban nem foglalkoztam.

3. táblázat: A fermentált zöldségkészítmények csíraszámait tenyésztési vizsgálattal és pH értékei

(Forrás: saját munka)

Csoport	Sorszám	Termék	Csíraszám TKE/g	Szórás (tenyésztés)	pH (RT)
<i>Egyéb</i>	1.	B	$<10^3$	0,0	3,16
<i>Káposzta alapú</i>	2.	Lh	$<10^3$	0,0	3,35
	3.	KRB1	$6,2 \times 10^4$	$\pm 5,6 \times 10^3$	3,20
	4.	KRB2	$4,1 \times 10^4$	$\pm 1,2 \times 10^4$	3,45
	5.	KP1	$2,2 \times 10^5$	$\pm 8,5 \times 10^3$	3,39
	6.	KP2	$4,8 \times 10^4$	$\pm 4,9 \times 10^3$	3,48
<i>Cékla alapú</i>	7.	CK	$1,8 \times 10^5$	$\pm 1,4 \times 10^4$	3,40
	8.	CRGY1	$3,7 \times 10^5$	$\pm 1,3 \times 10^4$	3,61
	9.	CRGY2	$8,3 \times 10^3$	$\pm 6,9 \times 10^3$	3,44
<i>Sárgarépa alapú</i>	10.	R0	$3,4 \times 10^4$	$\pm 7,1 \times 10^2$	3,20
	11.	RGY0	$<10^3$	0,0	3,19
	12.	R	$1,4 \times 10^7$	$\pm 2,1 \times 10^6$	3,35
	13.	RGY1	$1,5 \times 10^7$	$\pm 1,7 \times 10^6$	3,41
	14.	RGY2	$1,8 \times 10^7$	$\pm 2,0 \times 10^6$	3,31
	15.	RGY3	$3,8 \times 10^7$	$\pm 4,3 \times 10^6$	3,45
	16.	RGY4	$1,3 \times 10^8$	$\pm 1,6 \times 10^7$	3,39

A káposzta csoport tagjaiban 10^4 - 10^5 nagyságrend, a cékla csoportnál 10^3 - 10^5 nagyságrend és a sárgarépa csoportnál 10^4 - 10^8 nagyságrend közé esett az MRS táptalajon kitenyészthető baktériumok telepképző egységének száma, egy gramm termékre vonatkoztatva. A munkám során a legmagasabb csíraszámokat a sárgarépa alapú termékekben kaptam. A készítmények vizsgálata során romlásra utaló jeleket nem tapasztaltam az egyedi minták bontásánál.

3.2. Fajmeghatározás MALDI-TOF-MS készülékkel

A tenyésztés előnye, hogy lehetőség van a mikroorganizmusok taxonómiai vizsgálatára. Élve ezzel a lehetőséggel, tájékoztató jelleggel a termékek tenyészeiből néhány, többnyire négy-öt jellemző telepet vettem le. Ezekből tiszta tenyészetet készítettem, az azonosítás érdekében. A meghatározáshoz MALDI-TOF-MS készüléket használtam.

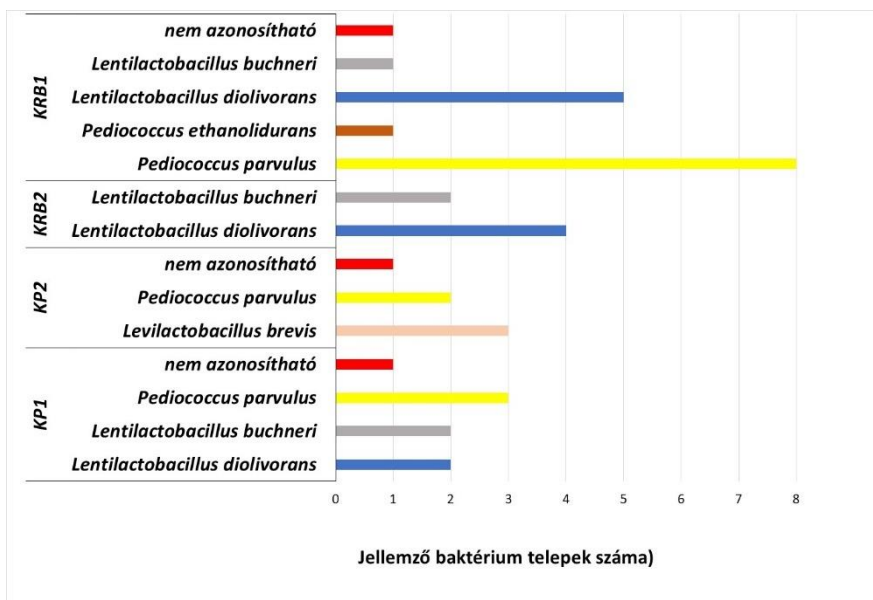
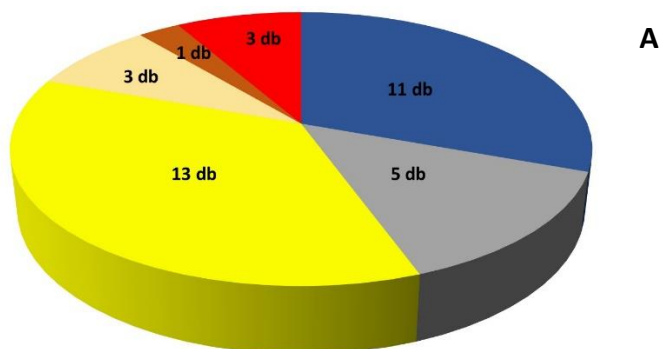
Tizenhárom termékből összesen 88 izolátumot vizsgáltam meg, 55 izolátumot in situ módszerrel sikerült meghatározni, 24 izolátumot második feltárási módszerrel, kilenc esetben nem tudtam még nemzetségszinten sem beazonosítani az adott baktériumot.

Jellemzően *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Levilactobacillus brevis*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus parabucner*, *Pediococcus parvulus*, és *Pediococcus ethanolidurans* baktériumokat azonosított a szoftver.

A négy káposzta alapú készítményben 36 kitenyésztett baktérium izolátumot azonosítottam, az eredményeket a 9. ábra mutatja. A csoport készítményeiből legnagyobb részt (9. ábra A), a *Pediococcus parvulus* faj, és a *Lentilactobacillus* nemzetség, legvalószínűbb találat szerint, *L. diolivorans* faj volt azonosítható. Jelen vizsgálat alapján legalább öt különböző faj előfordulása valószínűsíthető a zöldségkészítmény csoportban. A 9. ábra B részén az egyedi minták diverzitását vizsgálhatjuk, a legváltozatosabb fajösszetétel a KRB1 és KP1 termékekben jelent meg.

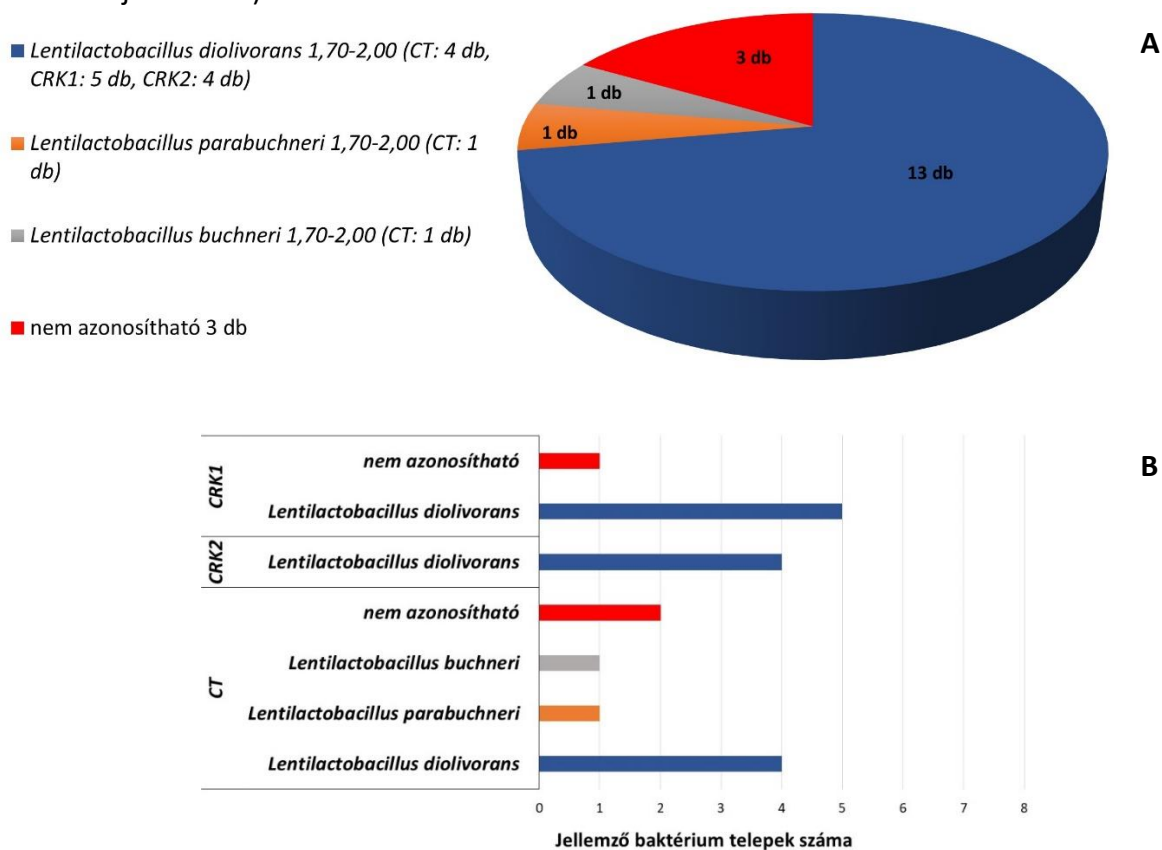
9.ábra: Baktérium fajok előfordulása fermentált káposzta alapú készítményekben: (A) termékcsoportban; (B) egyedi mintákban azonosítva (pontszámok: fajsztű: 2,00-3,00; nemzetség szintű: 1,70-2,00; nem azonosítható: < 1,7)
(Forrás: saját munka)

- *Lentilactobacillus diolivorans* 1,70-3,00 (KP1: 2 db, KRB1: 5 db, KRB2: 4 db)
- *Lentilactobacillus buchneri* 1,70-3,00 (KP1: 2 db, KRB1: 1 db, KRB2: 2 db)
- *Pediococcus parvulus* 2,00-3,00 (KP1: 3 db, KP2: 2 db, KRB1: 8 db)
- *Levilactobacillus brevis* 2,00-3,00 (KP2: 3 db)
- *Pediococcus ethanolidurans* 1,70-3,00 (KRB1: 1 db)
- nem azonosítható 3 db



A három cékla alapú készítményből 18 db kitenyésztett baktérium izolátumot azonosítottam, az eredményeket a 10. ábrán mutatom be. A vizsgálatban a *Lentilactobacillus* nemzetség, jelenlétét sikerült valószínűsíteni. A szoftver szerint ez a *L. diolivorans* faj lehet. 10. ábra A része). Ez alapján a fermentált céklakészítmények mikrobiológiai szempontból kevésbé változatosnak tűnnek. A 10. ábra B részén az egyedi mintákból azonosított fajokat tüntettem fel. A CT termék diverzebb fajösszetételt mutatott, mint a CRGY1 és CRGY2 készítmények.

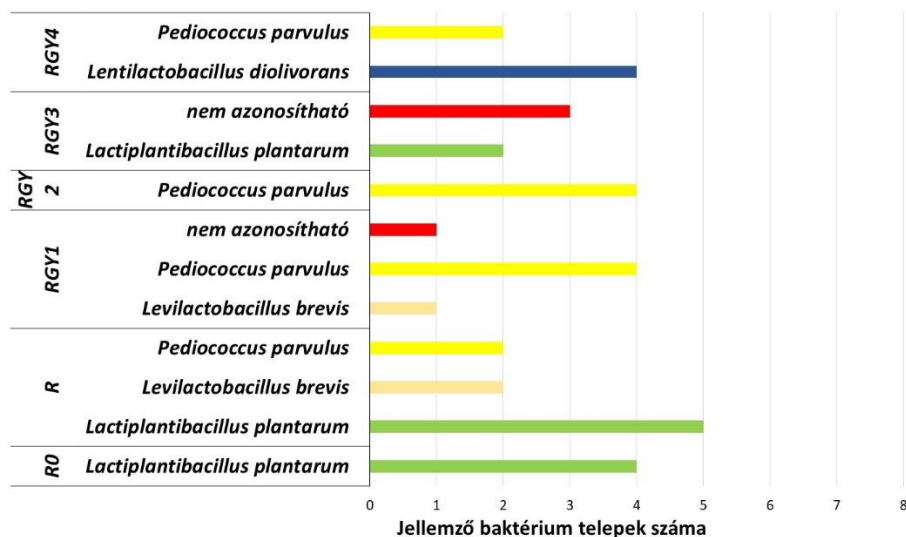
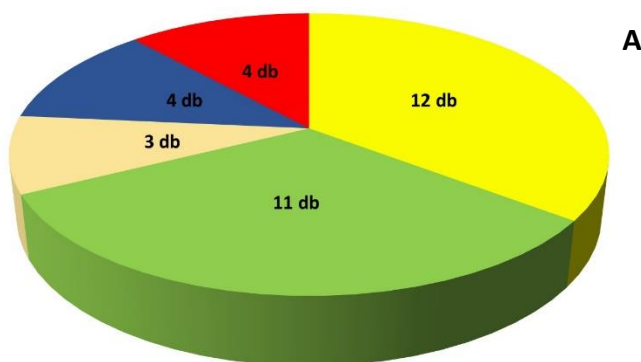
10.ábra: Baktérium fajok előfordulása fermentált cékla alapú készítményekben: (A) termékcsoportban; (B) egyedi mintákban azonosítva (pontszámok: fajsztű: 2,00-3,00; nemzetség szintű: 1,70-2,00; nem azonosítható: < 1,7)
(Forrás: saját munka)



A hat sárgarépa alapú készítményből 34 kitenyészett baktérium izolátumot azonosítottam, az eredményeket a 11. ábrán láthatjuk. A csoportban (10. ábra A) négy faj jelenlétét sikerült valószínűsíteni. Két egyformán domináns fajt találunk az elemzésben, a *Pediococcus parvulus* és a *Lactiplantibacillus plantarum* baktériumokat, ez utóbbi egyedül ebben a zöltség csoportban jelenik meg. A 10. ábra B részén a készítmények diverzitása szerint, jellemzően 2-3 faj jelenik meg. A *Lactiplantibacillus plantarum* az R és R0 készítményekben dominál.

11.ábra: Baktérium fajok előfordulása fermentált sárgarépa alapú készítményekben: (A) termékcsoporthoz; (B) egyedi mintákban azonosítva (pontszámok: fajszintű: 2,00-3,00; nemzetség szintű: 1,70-2,00; nem azonosítható: < 1,7)
(Forrás: saját munka)

- *Pediococcus parvulus* 1,70-3,00 (R: 2 db, RGY1: 4 db, RGY2: 4 db, RGY4: 2 db)
- *Lactiplantibacillus plantarum* 1,70-3,00 (R0: 4 db, R: 5 db, RGY3: 2 db)
- *Levilactobacillus brevis* 2,00-3,00 (R: 2 db, RGY1: 1 db)
- *Lentilactobacillus diolivorans* 1,70-2,00 (RGY4: 4 db)
- nem azonosítható 4 db



3.3. Csíraszámbeecslés luminometriával

A mérések megkezdése előtt több tényező tisztázásra szorult, ezért a következő módszerbeállítási lépéseket végeztem el. Először megbecsültem a módszer alsó méréshatárát.

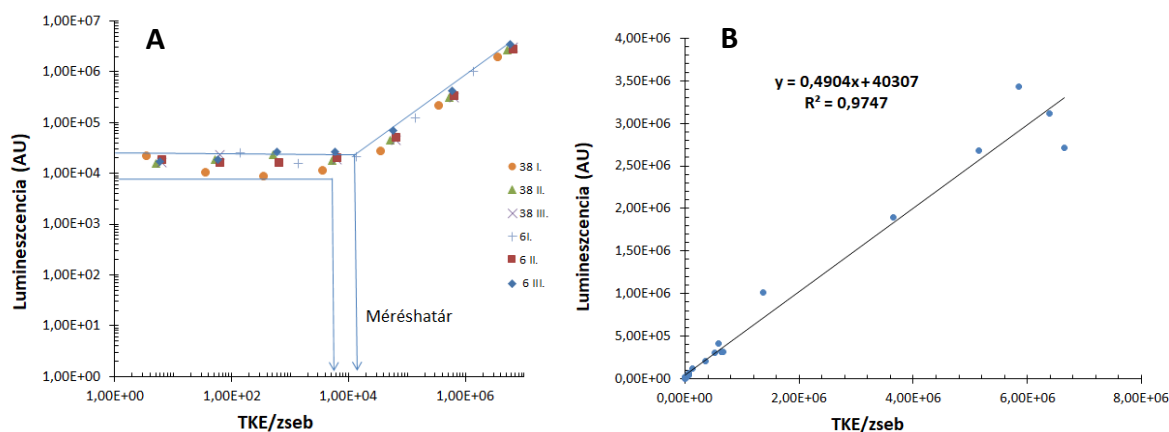
Utána megvizsgáltam, hogy a készítmények mintáiból való direkt mérés esetén működőképes-e a mérési rendszer. A kapott eredmények megfontolásával megkíséreltem a mérési rendszert optimalizálni.

A csíraszám meghatározás alsó határát a következők szerint vizsgáltam. A *P. ethanolidurans* és *L. plantarum* izolátumok ismert mennyiségének (0,1 OD) hozzáadásával hígítási sort készítettem Müller-Hinton tápfolyadékban, majd a kit segítségével megmértem a hígításokhoz tartozó lumineszcencia intenzitást, ezzel párhuzamosan elvégeztem a hozzátartozó tenyésztési vizsgálatokat is. Grafikonon ábrázoltam a mért lumineszcencia intenzitás és a TKE számának kapcsolatát. A szemléltető ábrán (12. ábra A) bejelöltem a hígítási sor által kirajzolt lumineszcencia jel alsó meghatározási tartományát. A zsebben található 10^3 és 10^4 db telepképző egységhez tartozó relatív lumineszcencia $1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$ (AU) érték között mozog, tehát megállapítható, hogy ez a rendszer nem alkalmas 1×10^4 db alatti tejsavbaktérium sejtszám meghatározásra. Mivel a készítményeket az első decimális hígításaikból elemeztem, a csíraszám meghatározásának határát a készítményben 5×10^5 /g baktérium számban tudtam definiálni. A kalibrációs egyenest a határ feletti pontokra illesztve kaptam (12. ábra (B)), így az egyenes egyenlete a következő:

$$y = 0,4904x + 40307 \quad (1)$$

ahol, y: lumineszcencia intenzitás (AU); x: TKE száma.

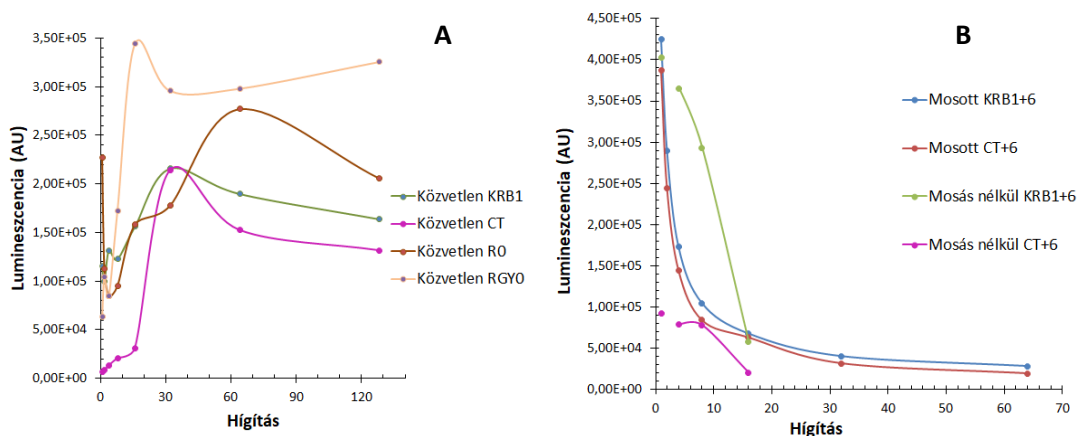
12. ábra: A lumineszcencia és TKE kapcsolata: meghatározási határ alsó régiója (A) és az illesztett kalibrációs egyenes (B) (n=6)
(Forrás: saját munka)



Minthogy a zöldségkészítmények esetén előnyt jelentene, ha közvetlen módon, a színes felöntőlében lehetne elvégezni a mérést, kísérletet állítottam be a módszer

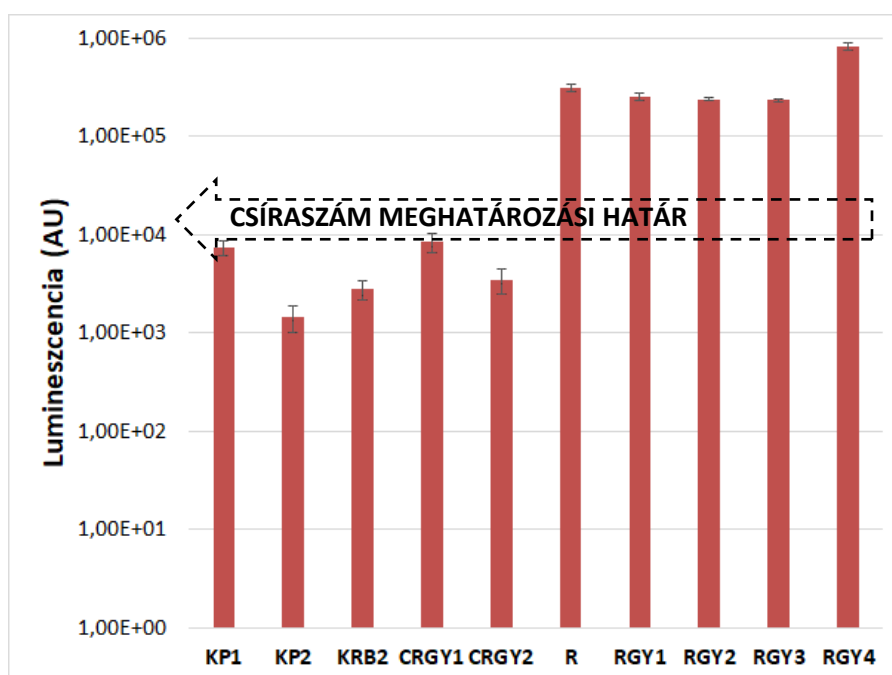
adaptálására. A direkt mérés során azonban a színanyag és a lé erősen savas kémhatása, vagy egyéb ismeretlen faktorok jelenléte gátolhatja a reakciót. A közvetlen módszer beállítása során figyelembe vettem, hogy a szakirodalom szerint a luciferin-luciferáz rendszer pH optimuma 7,75-ös értéknél van (Deák, 2006). A fermentált termékek pH értéke átlagosan 3,36 volt, ezért is indokolt a mintaelőkészítésénél pufferolt peptonvíz használata. A minta mikroszkópos vizsgálata során ép növényi sejteket nem, de sok növényi törmelékkel láttam a feldolgozás első hígításában. Kísérletek alapján megállapítottam, hogy mivel ismeretlen a különféle zöldségfélék szöveti törmelékének háttér lumineszcenciája és zavarólag hatnak a színanyagok is, nem lehetséges a közvetlen mérés (13.ábra A). Tehát ahhoz, hogy egységes metodikát használhassak az eltérő alapanyagú termékeknel, a közeget Müller-Hinton tápfolyadékra cseréltem az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtak szerint. Így a próba méréseim szerint, a *Pediococcus ethanolidurans* izolátummal kevert, 0,22 µm-es szűrővel előzőleg leszűrt, káposzta és cékla minták esetében, a hígítás mértéke követhető volt a lumineszcencia jel változásával (13.ábra B).

13. ábra: A fermentált zöldségkészítmények 10^1 hígításainak lumineszcencia jele (AU): közvetlen mérés estén (A); optimalizált, Müller-Hinton közegre cserélt mérés esetén (B) (Forrás: saját munka)



A fermentált zöldségkészítmények vizsgálatának eredményeit a 14. ábrán mutatom be. A káposzta és cékla csoport méréseiből azt látjuk, hogy minden mérési pont $10^3 - 10^4$ (AU) lumineszcencia értékek között, vagyis a meghatározási határ alatt van. Levonhatjuk azt a következtetést, hogy a baktérium sejtek száma a zsebben tízezres nagyságrend alatti. A sárgaréparépa alapú csoport lumineszcencia jele jóval magasabb tartományba esik, $10^5 - 10^6$ (AU) értékek között van, ennek megfelelően milliós nagyságrend feletti csíraszám becsülhető.

14. ábra: A fermentált zöldségkészítmények 10^1 hígításainak lumineszcencia jele (AU) (Meghatározási határérték: 2×10^4 (AU) felett)
(Forrás: saját munka)



A sárgarépa alapú termékek tejsavbaktérium csíraszámát a 12. ábrán feltüntetett egyenes egyenlete (1) $y = 0,4904x + 40307$ alapján, a 10^1 hígítási tagok lumineszcencia adataiból számoltam. A mérések alapján a 4. táblázatban összefoglalt csíraszámbecslési eredményeket kaptam.

A káposzta és cékla csoportoknál csak a méréshatár minimum értékéből következtethetünk arra, hogy a csíraszám a termékekben $5 \times 10^5/\text{g}$ -nál kisebb vagy azzal egyenlő mennyiségben van jelen. A sárgarépa csoport eredményeit az egyenlet alapján számoltam a hígításokkal kalkulálva, így $1 \times 10^7 - 8 \times 10^7$ csíraszám/g közötti eredményeket kaptam. A szórások minden esetben egy nagyságrenddel kisebb értékek (4,3-16,3% körüliek).

4. táblázat: A fermentált zöldségkészítmények csíraszámbebecslése: TKE egy gramm termékre vonatkoztatva lumineszcencia alapján
(Forrás: saját munka)

Csoport	Sorszám	Termék	TKE/g	Szórás
<i>Káposzta alapú</i>	4.	KRB2	$\leq 5 \times 10^5$	-
	5.	KP1	$\leq 5 \times 10^5$	-
	6.	KP2	$\leq 5 \times 10^5$	-
<i>Cékla alapú</i>	8.	CRGY1	$\leq 5 \times 10^5$	-
	9.	CRGY2	$\leq 5 \times 10^5$	-
<i>Sárgarépa alapú</i>	12.	R	$2,8 \times 10^7$	$\pm 1,5 \times 10^6$
	13.	RGY1	$2,2 \times 10^7$	$\pm 1,8 \times 10^6$
	14.	RGY2	$2,0 \times 10^7$	$\pm 3,2 \times 10^6$
	15.	RGY3	$1,9 \times 10^7$	$\pm 3,1 \times 10^6$
	16.	RGY4	$7,9 \times 10^7$	$\pm 3,4 \times 10^6$

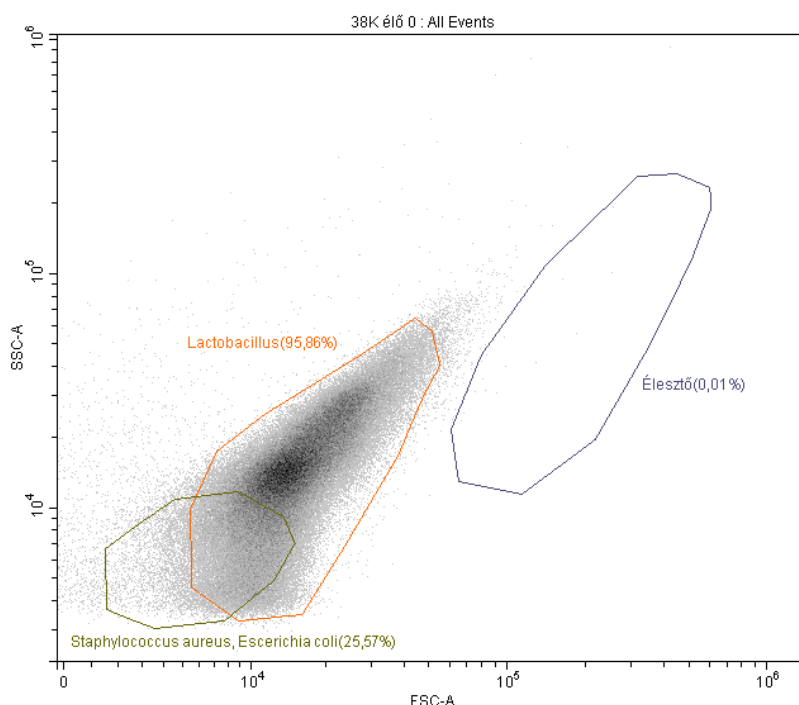
3.4. Csíraszámbebecslés áramlási citometriával

A módszer adaptálásához beállítási lépésekre volt szükség. Elsőként tejsavbaktérium színtenyészetek és egyéb mikroorganizmusok fényszórási képét vizsgáltam és kijelöltem a csoportokra jellemző kapukat. Ezután a tejsavbaktérium izolátumok Rho-123 festődését mértem és becslest tettem az alsó kimutathatósági határra zöldségkészítmény jelenlétében. Következő pontban megvizsgáltam a tejsavbaktérium színtenyészetek Syto9 és PI festődését tisztatenyészetből és zöldség készítménnyel kevert mintában.

Az első kísérleti pontban különböző méretű mikroorganizmusok fényszórási képét elemeztem. Három kaput állítottam be, melyek a közös kapuba eső *P. ethanolidurans* és *L. plantarum* tejsavbaktériumoknak (6-os és 38K izolátumok); az *Escherichia coli* és *Staphylococcus aureus* közös csoportjának; és a *Lachancea thermotolerans* élesztőfajnak felel

meg (15. ábra). Megállapítottam, hogy a fényszórási kép és az FL-3 – FSC dot-plot alapján az élesztők elkülöníthetőek. A fényszórási kép kapuit Rhodamin-123 festődő események megfeleltetésére használom. A tejsavbaktérium kapu és a *S. aureus* + *E. coli* kapuk részben átfedésben vannak.

15.ábra: *L. plantarum* izolátum fényszórási képe mikroorganizmusok szerinti kapuzással (Forrás: saját munka)

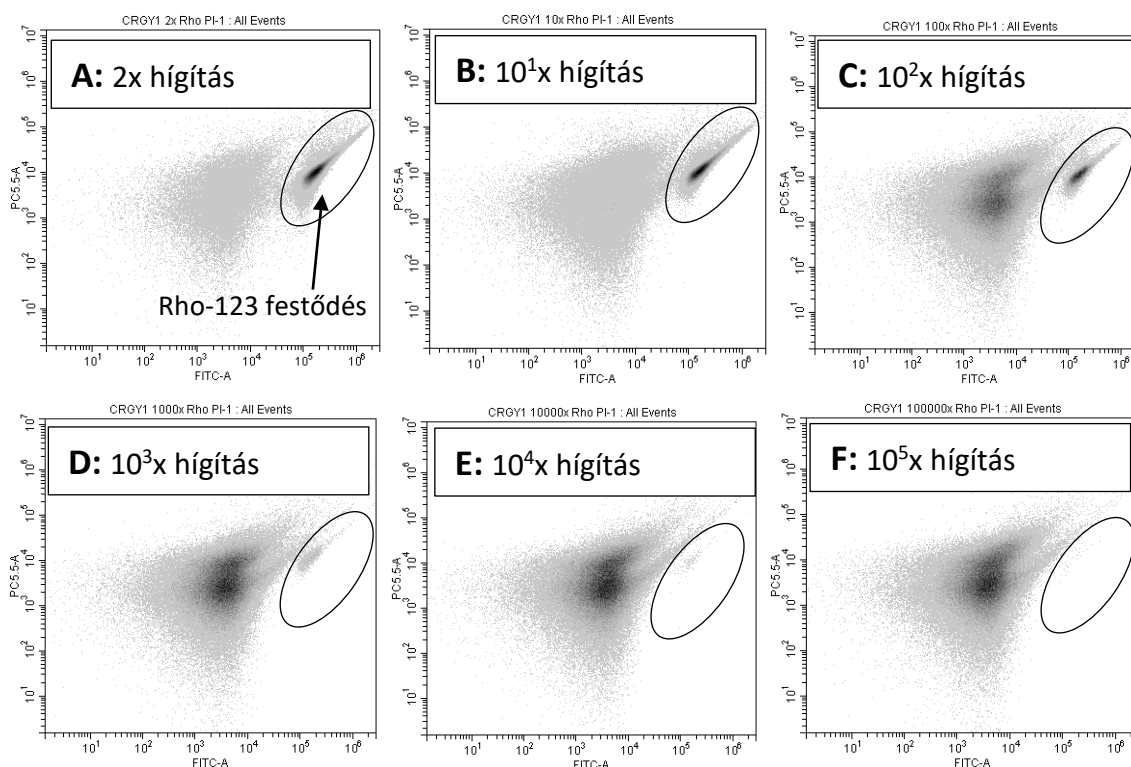


Második kísérleti pontban az izolált tejsavbaktériumok Rho-123 festődését vizsgáltam színtenyészetek segítségével. Friss 12 órás tenyészetek szuszpenzióját élő pozitív kontrollnak, hővel elölt párhuzamosát halott, negatív kontrollnak használtam. A Rho-123 festék olyan magas háttérfluoreszcenciát ad, hogy elfedi a sejtekhez tartozó jelet, szükségessé vált mosási lépések beiktatása, ezt kétszeri PBS-BSA (1%) mosással biztosítottam. Az élő sejtek a Rho-123 festéket felveszik, ezért kikapuzhatóak fluoreszcencia intenzitás alapján. A Rho-123 az elpusztult hőkezelt sejtekben nem dúsul fel. A halott sejtek festésére a PI festést használtam, populációjukat FL-3-as csatornában mértem. Megfigyelésem szerint a Rho-123 festődés közel fél óra alatt eltűnik, ezért a mérést a festést követően azonnal el kell végezni.

Harmadik lépésben mérést terveztem, hogy tájékoztató jelleggel megvizsgáljam az alsó meghatározási határt. Két biológiai ismétlést végeztem a következők szerint. A CRGY1

zöldségkészítményt hővel kezeltem annak érdekében, hogy a benne található mikrobákat előljem (holt sejt populáció), ezt kevertem *P. ethanolidurans* izolátum OD 0,35 értékre beállított decimális hígítási sorához, egy-egy arányban. Rho-123 festést követően megállapítottam, hogy 10 esemény/ μ l detektálásnál már elkülöníthető a fluoreszkáló populáció (16. ábra D). Ez a mérési csőben tízezer db/ml eseménynek felel meg, ami a festéshez használt szuszpenzióban százezer db/ml töménységet jelent. Mivel a termékek első decimális hígításaiból készülnek a csíraszámbecslések, így a csíraszám meghatározás határát a készítményekben 1×10^6 /g baktérium számban tudom definiálni. Alatta nem meggyőző, csak sejthető a festett csoport jelenléte (16. ábra E). Így eldönthető, hogy 10^6 /g határ alatt vagy felett van-e az élő baktériumok száma a készítményekben. Azonban, ha a szennyezettség nagyságrendekkel nagyobb mértékű a határ is azzal arányosan növekszik.

16. ábra Hígítási sor: *P. ethanolidurans* izolátum (OD 0,35) és hőkezelt zöldségkészítmény keverékéből, a Rhodamin-123 festett események száma: (A) 3096 esemény/ μ l, (B) 842 esemény/ μ l, (C) 82 esemény/ μ l, (D) 8 esemény/ μ l, (E) 1 esemény/ μ l, (F) < 1 esemény/ μ l (Forrás: saját munka)

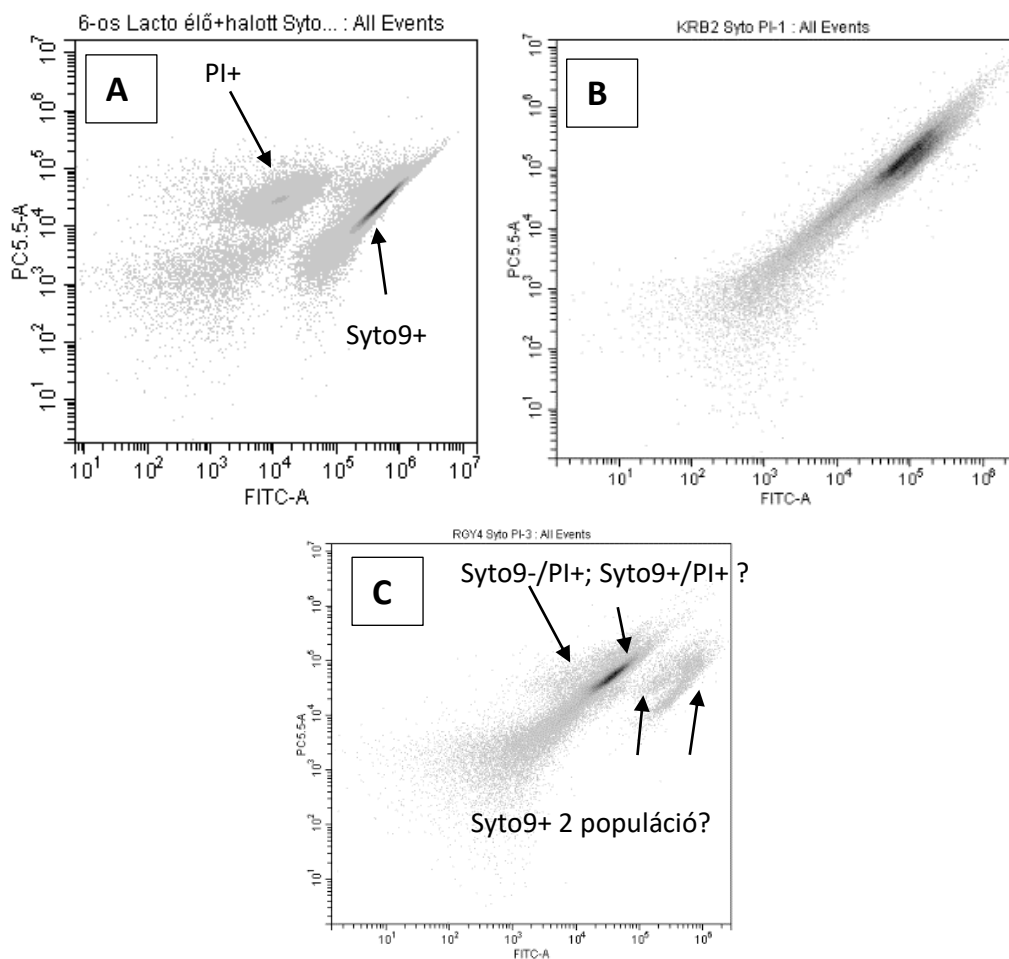


A továbbiakban a szintenyészetek Syto9 és PI festődését is megvizsgáltam. Az élő és hőkezelt szintenyészet keverékében a duplafestéssel elválik a PI festett halott sejtek csoportja a Syto9 festett ép membránú sejtek csoportjától (17. ábra A). A festést többféle

zöldségkészítmény mintán kipróbálva azt találtam, hogy vagy nem válik el egyértelműen a két festés, vagy összemosódva több populáció is megjelenik. A zöldség minták esetében problémát jelent a növényi eredetű sejtmарadványok jelenléte. A nagy szemcsék kiszűrésére csak az áramlási citometriában használt 50 µm-es szűrési előkészítést használtam. Ezek alapján azt állapítottam meg, hogy ebben a rendszerben a Syto9/PI festődés a populációk elkülönítésénél bizonytalan eredményt nyújthat.

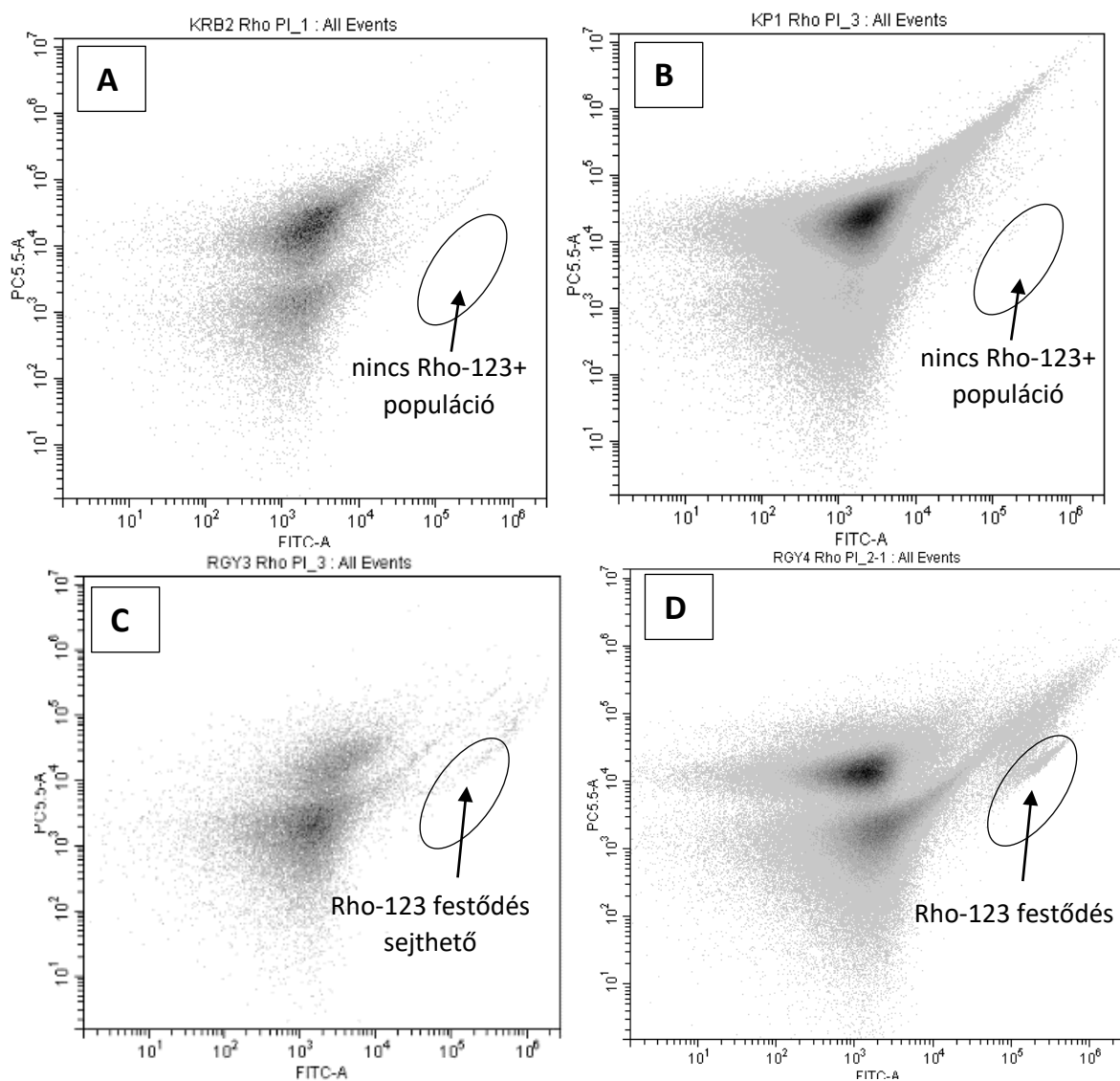
17. ábra: Syto9 és PI festés: *P. ethanolidurans* szintenyészetben (A) zöldségkészítmény mintákban (B: KRB2, C: RGY4)

(Forrás: saját munka)



A csíraszámbecslési vizsgálatot hat termék esetében végeztem el. Négy készítménynél (KRB2, KP1, KP2, CRGY1) a Rho-123 kapuba eső események száma kisebb, mint 10 db/ μ l, azonban a RGY3 és a RGY4 készítménynél sejthető a festett élő populáció, de a meghatározási határ közelében van az fluoreszkáló események száma (18. ábra).

18.ábra: Zöltségkészítmények Rho-123/PI festése: (A) KRB2; (B) KP1; (C) RGY3; (D) RGY4 (Forrás: saját munka)



A zöldségkészítmények vizsgálataiból származó adatokat a 5.táblázatban foglaltam össze. Négy készítménynél sem a Syto9 festéssel sem a Rho-123 festéssel nem volt kimutatható mennyiségű fluoreszkáló esemény az FL-1 csatornában, míg a RGY3 és RGY4 mintákban igen. A kikapuzott események számából arra lehet következtetni, hogy ezek, a készítményekből kitenyészthető TKE számával egyeznek meg. Érdekes megfigyelni, hogy a Syto9 kapuban nagyobb eseményszámokat találunk, ennek megfelelően magasabb csíraszámot is becsül a módszer. A halott elemek festésére alkalmas PI kapuban minden esetben rendkívül magas objektumszám jelenik meg. Többek közt ez az oka a magas a kimutathatósági határnak. Gyakorlatilag a zaj, több mint két nagyságrenddel haladja meg Rho-123 vagy Syto9 festett események számát. Továbbá megfigyeltem, hogy az élesztők kapuzására beállított FL-3 – FSC dot-plot-ban elkülönülni látszanak események, annak ellenére, hogy alacsony számban vannak jelen leolvastam az adatokat, érdekessége ezeknek, hogy nem mutatnak sem Syto9, sem Rho-123 sem PI festődést.

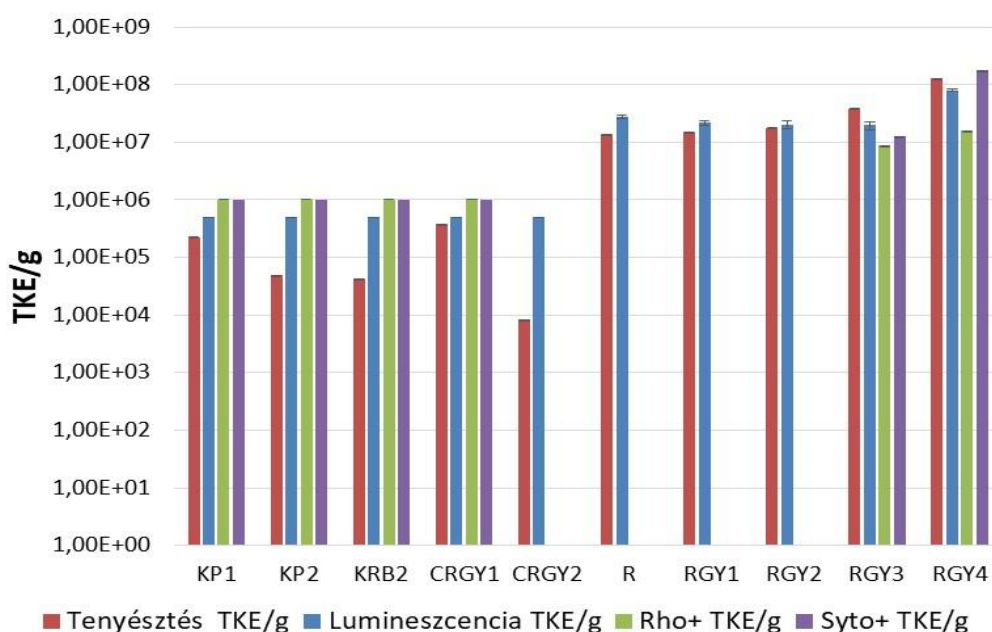
5.táblázat: Csíraszámbeclés eredményei áramlási citometriás elemzéssel (Rho+: Rhodamin-123 festett események száma; Syto+: Syto9 festett események száma; PI+: propidium festett események száma; nm: nem mérhető)
(Forrás: saját munka)

Csoport	Sz.	Term.	Rho+	Syto+	PI+	Élesztő méretű esemény	Rho+	Syto+	Halott	Élesztő méretű esemény
			db/ μl	db/ μl	db/ μl	db/μl	esemény/g	esemény/g	esemény/g	esemény/g
Káposzta alapú	4.	KRB2	n.m.	n.m.	4675	3,5	$\leq 10^6$	$\leq 10^6$	$5,1 \times 10^8$	$3,9 \times 10^5$
	5.	KP1	n.m.	n.m.	5101	2,9	$\leq 10^6$	$\leq 10^6$	$5,6 \times 10^8$	$3,3 \times 10^5$
	6.	KP2	n.m.	n.m.	1916	5,0	$\leq 10^6$	$\leq 10^6$	$2,1 \times 10^8$	$5,5 \times 10^5$
Cékla alapú	8.	CRGY1	n.m.	n.m.	531	0,3	$\leq 10^6$	$\leq 10^6$	$2,9 \times 10^8$	$1,8 \times 10^5$
Sárgarépa alapú	15.	RGY3	8,9	12,7	268	2,6	$8,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^8$	$2,6 \times 10^6$
	16.	RGY4	19,3	161,3	749	2,5	$2,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$

3.5. Csíraszámbebecslési eredmények összehasonlítása

A háromféle becslési módszer eredményeit a 19. ábrán hasonlítottam össze. Az egyes mérésekhez tartozó szórások minden esetben egy nagyságrenddel kisebb tartományba esnek. Míg a tenyésztési vizsgálatoknak nagy az érzékenysége, így az alacsony csíraszámok is könnyen kimutathatóak vele, addig a luminometriás módszer $5 \times 10^5/\text{g}$ termékre vonatkoztatott csíraszám felett képes csak mérni, ugyanígy az alsó határ az áramlási citometriás vizsgálatnál is magas, 1×10^6 csíraszám/g. Minden esetben, ahol meghatározási határ alattinak becsülték a módszerek a csíraszámot, a tenyésztés is megerősítette azt. Megvizsgálva a készítményeket csak a répa alapú készítményeknél volt lehetőség a pontos számok összehasonlítására. A lumineszcencia eredményei egy nagyságrenden belül követték a tenyésztéses vizsgálat eredményeit. Az áramlási citometriás eredmények esetén összetettebb a kép, mert a Rho-123 festődő sejtek a RGY4 mintánál alábecsülték a tenyésztés eredményét, míg a Syto9 pozitív sejtek megegyeznek vele. Elmondható, hogy a $1 \times 10^6/\text{g}$ csíraszám érték felett mind a három eljárással kimutatható és meghatározható, és a magasabb csíraszámok elfogadható közelítéssel becsülhetőek az általam mért termékekben.

19. ábra: Tenyésztési, luminometriai és áramlási citometriai csíraszámbebecslések összehasonlítása. Áramlási citometriai vizsgálat négy készítménynél nem történt (CRGY1, R, RGY1 és RGY2). (Rho+: Rhodamin-123 festett események, Syto+: Syto9 festett események) (Forrás: saját munka)



4. Következtetések és javaslatok

A munkám során vizsgált fermentált termékek tenyésztési vizsgálatait áttekintve megállapíthatjuk, hogy az általam vizsgált készítmények többnyire tartalmaztak tejsavbaktériumokat, jellemzően 10^3 - 10^8 /g csíraszámokban. A legmagasabb csíraszámokat a sárgarépa alapú termékekben kaptam. Felmerül a kérdés vajon miért a sárgarépa készítményekben a legmagasabb a csíraszám. Összevetve a cukortartalmukkal, a háromféle zöldségalapanyag szénhidrát és cukortartalma nem tér el jelentősen egymástól, a káposztának 3,2 %, a céklának 6,76 % (Mirmiran et al., 2020), és a sárgarépának 4,7 % (Swain et al., 2014) a cukortartalma. Tehát ezzel nem magyarázható az eltérés. Fontos azonban kihangsúlyozni, hogy csak az általam használt tenyésztési körülmények esetén igazak a csíraszámbecslési és a fajösszetételre vonatkozó eredmények. Összetett képet akkor kapnánk, ha a számba vehető különféle táptalajokon is elvégeznénk a vizsgálatot és az eredményeket összevetnénk egymással.

A szakirodalom szerint a fajok diverzitása nyersanyagokként változó, a káposzta termékek jellemzően *Leuconostoc mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*, a sárgarépa termékek *L. plantarum*, *L. brevis* (Di Cagno 2013), a cékla termékek a *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, and *L. acidophilus* (Zamanpour et al., 2023) fajok tartalmazzak. Elemezve az egyes termékcsoportok fajösszetételét azt mondhatjuk, három-öt féle baktérium faj azonosítható. Vélelmezhető különbség a fajok összetételében alapanyagok szerint. A leggyakoribb fajok az irodalomtól eltérően a káposzta esetében a *P. parvulus* és *L. diolivorans*, a cékla esetében a *L. diolivorans*, és sárgarépa csoportban az irodalommal azonosan megjelenik a *L. plantarum*, és mellette a *L. brevis* és *P. parvulus* is. Gyömbérrel való fűszerezés esetén nem jellemző a fajok érzékenysége (Swain et al., 2014), közöttük megjelenik az általam is azonosított *L. plantarum* és *L. brevis*. A vad típusú fajok azonosítása a probiotikus tulajdonságokkal bíró fajok keresése szempontjából is hasznos lehet (Cele et al., 2022). Azonban meg kell jegyeznünk, hogy a munkám során sok esetben a MALDI-TOF-MS készülékkel a meghatározás csak nemzetségszintig volt megbízható. Molekuláris módszerekkel, vagy fenotípusos vizsgálatokkal érdemes lehet beazonosítani a nemzetségek fajait. A fajok elfordulásának gyakoriságvizsgálata nem volt célja a munkámnak, de megfelelő elemszámnöveléssel ez is megvalósítható lenne.

A luminometriai mérésen alapuló csíraszámbecslésről elmondhatjuk, hogy összevetve a tenyésztési vizsgálatokkal, alacsony, csíraszámoknál csak arra alkalmas, hogy eldöntsük 5×10^5 nagyságrend alatti tartományba esik-e a készítmény baktérium száma vagy sem. Magasabb csíraszámoknál durva becslésre használható, a szakirodalom szerint is csak 10^4 TKE felett lehetséges a kimutatás (Jasson et al., 2010). A méréseimmel összhangban a BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay kit luminezscencia jele Aragonés és munkatársai szerint (2012) 10^4 - 10^8 TKE/ml között lineáris. A módszer nagy előnye, hogy gyors és minimális előkészítést igényel, azonban a készítmények vegyes mikrobiológiai összetétele miatt az eredményeket kellő körültekintéssel szabad csak figyelembe venni. A módszer több szempontból is optimalizálásra szorul, illetve az eredmények korlátozott felhasználására ad csak lehetőséget a fermentált zöldségfélék esetében. A mérést befolyásolhatja az élesztők jelenléte is. Ha a termékek jelentős mennyiségben tartalmaznak élesztőket, akkor magas luminezscencia jelre lehet számítani, ezáltal a becslés pontatlan lesz. A tenyészet pillanatnyi állapotától is függ az eredmény. Gyakorlatilag a megvásárolható termékek mikroba közösségi szempontból pusztuló tenyészetnek felelnek meg, ahol a baktériumsejtek csökkent sejtaktivitása várható. Hátránya, hogy felszerelést és szakmai felkészültséget igényel a használata. Megbízhatósága erősen függ a mérendő terméktől, és közegtől, érzékenysége emiatt alacsony, 5×10^5 TKE/g nagyságrend alatt nem használható fermentált zöldségfélék esetében.

Az áramlási citometriai mérések értelmezése sok esetben nehéz feladat a minta rendkívüli összetettsége miatt. Log fázisban lévő színtenyészeteken beállított festési eljárások módosulnak az erősen szennyezett mintákban, ami eltérő viselkedésű populációkat eredményez. Annak eldöntése, hogy ezek a változatosan festődő események pontosan milyen tulajdonságú objektumoknak felelnek meg, még további részletes vizsgálatokat igényelne. Azért, hogy tisztán lássunk először is ki kellene dolgozni egy eljárást, amivel a szennyezésektől mentesíteni lehet a mintákat. tejtermékek esetében már vannak kidolgozott extrakciós metodikák (Bunthof, et al., 2002) Másrészt, ha megfontolásokat teszünk a festeni kívánt baktériumok státuszáról, akkor arra jutunk, hogy a készítmények nem csak aktív, hanem úgynevezett „dormant”, előregedő, sérült, elpusztult sejteket is tartalmaznak. Ezek egymástól való megkülönböztetése lehetséges (Bellassi et al., 2023), de csak akkor, ha a mintát sikerül megtisztítani a szennyeződésektől. A propidium-jodid kapuba eső események magukba foglalják a „poszbiotikumszerű” halott baktérium sejtek számát is, de sajnos, jelenlegi mérési

rendszerben nem lehetséges különválasztani a halott növényi eredetű részekről. Ráadásul vannak olyan tejsavbaktériumok, amelyek nem festődnek PI-dal (Bunthof et al., 2001). Tovább bonyolítja a képet, hogy ezekben a fermentált készítményekben többféle baktérium faj, sőt élesztők is jelen lehetnek. Az élesztőkapuban detektált eseményekből arra következtetnek, ha ezek nem növényi törmelékek, akkor vagy nincsenek aktív állapotban, vagy egyéb ok miatt nem festődnek. Vizsgálatokat lehetne tervezni annak megállapítására, hogy milyen az élesztők kimutathatósága, illetve hogyan viselkednek az eltérő fajok a különböző festődési eljárásokban. Annak ellenére, hogy az áramlási citometria nyújtotta részletesebb vizsgálati képet erősen rontja a magas háttérzaj, a membránpotenciál kimutatására alkalmas Rhodamin-123 festés 10^6 /g élő csíraszámnál nagyobb tartományokban használhatónak tűnik, ugyanilyen határértéket definiál az ISO 19344:2015 szabvány is. Azonban a megállapított meghatározási határ a szennyezettség mértékétől függ, nagyságrendi növekedése esetén a határérték is arányosan növekszik. A szakirodalom szerint azonban a Rho-123 festés helyett metodikai okokból adódóan, a CFDA festés alkalmasabb az aktív sejtek meghatározására (Bunthof et al. 2001).

Összefoglalva elmondható, hogy ha az előzetes érzékszervi vizsgálatokkal nem állapítunk meg pimpósodást, élesztősödést, vagy romlásra utaló egyéb jeleket, akkor nem csak a tenyésztéses, hanem a luminometriai és áramlási citometriai módszer is alkalmazható a 10^6 /g vagy nagyobb élő tejsavbaktérium csíraszám becslésére. Viszont szennyező mikroorganizmusok jelenlétében csak a tenyésztési vizsgálat tud pontos és szelektív eredményt adni.

5. Összefoglalás

A fermentált zöldségkészítmények több szempontból is népszerűek. Magas tejsavbaktérium csíraszámuk és különleges összetételük a legkülönbébb termékfejlesztési ötleteket ihleti meg. A minőségellenőrzés szerves részét képezik az élelmiszerek laborvizsgálatai. A jogszabályi megfelelések és fogyasztói igények teljesülésének mérési eszköze, többek között a csíraszámbecslés is.

A kérdéseim is e laborvizsgálati téma köré csoportosultak. A csíraszámbecslési módszerek összehasonlítási alapja a „gold standard” módszerként alkalmazott tenyésztéses vizsgálat. Az élősejtszámok kimutatásában jelenleg ismert legérzékenyebb eljárás, azonban a nem tenyészthető, sérült, „dormant” és halott sejtek számáról nem ad eredményeket, és a kimutatás is hosszú időt vesz igénybe.

A termékek vizsgálatát a következők szerint végeztem. Nyersanyagok szerint három, káposzta, cékla és sárgarépa csoportra bontottam a készítményeket. Megmértem a készítmények pH értékét, majd tejsavbaktérium csíraszámot becsültem anaerob tenyésztéses vizsgálattal, MRS táptalajon. Ezek alapján megállapíthatóvá vált, hogy a három csoport mindegyikében erősen savas a pH érték ($3,36 \pm 0,12$). A tizenhat zöldségkészítményből tizenhárom tartalmazott 10^3 tejsavbaktérium/g feletti élőcsíraszámot. Egy gramm készítményre vonatkoztatva a káposzta csoport 10^4 - 10^5 nagyságrendben, a cékla csoport 10^3 - 10^5 nagyságrendben, míg a sárgarépa csoport kimagasló 10^4 - 10^8 nagyságrendben tartalmazott tejsavbaktériumokat.

A készítményekből kitenyésztett baktérium telepek fajazonosítását MALDI-TOF-MS készülékkel végeztem. A káposztacsoport izolált telepei zömében a *Pediococcus parvulus* és a *Lentilactobacillus diolivorans* volt, a cékla csoporté a *Lentilactobacillus diolivorans*, és a sárgarépa csoporté a *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus* fajok voltak. Az egyedi minták fajösszetétele, egy és öt faj között alakult, legnagyobb diverzitást a káposztaalapú készítmények mutatták.

A luminometriai csíraszámbecslést a luciferin-luciferáz ATP kimutatás elvén alapuló BacTiterGlo™ Microbial Cell Viability Assay kit segítségével végeztem. Kalibrációs egyenest vettem fel tejsavbaktérium törzsek hígítási sorából, a mért lumineszcencia jel (AU), és a párhuzamosan kitenyésztett telepképző egységek (TKE) száma alapján. Ennek eredményéből megállapítható, hogy egy gramm termékre vonatkoztatva 5×10^5 csíraszám alatt a

luminometriai módszer érzéketlen. A módszer optimalizálása után, tíz terméket vizsgáltam. Öt termék eredménye a káposzta és céklacsoportokból a meghatározási határérték alatt volt, és öt sárgarépa alapú készítmény csíraszám becsülhető volt a módszerrel. Az eredmények jó közelítéssel egy nagyságrenden belül követték a tenyésztés eredményeit.

Az áramlási citometriai csíraszámbeclést Rhodamin-123, propídium-jodid és Syto9 festékek felhasználásával végeztem. A mérések itt is módszerbeállítási lépéseket igényeltek. Öt készítményt vizsgáltam. Arra a következtetésre jutottam, hogy a minta Syto9 festése diverz képet mutat, a kiértékelése így bizonytalan. A minta Rhodamin-123 festése alapján viszont meghatározható volt az élő csíraszám 10^6 /g baktériumszám felett, ez azonban a szennyezettség mértékével arányosan változhat. A káposzta és cékla csoport készítményeiben az élő csíraszám nem érte el a meghatározási határt. Ezt megerősítette a tenyésztés eredménye. Két sárgarépa alapú terméknel elérte, sőt meg is haladta azt. A vizsgált két esetben a beclés egy nagyságrendi tartomány pontatlansággal, illetve azon belül követte a tenyésztés eredményét. Noha további megerősítő vizsgálatok szükségesek, de az kimondható, hogy a Rhodamin-123 festés alkalmas lehet a fermentált zöldségkészítmények élő tejsavbaktérium csíraszám beclésére 10^6 /g csíraszám felett. A baktériumok további fiziológiás állapotának tájékoztatására növényi törmelékektől való mentesítés után nyílik lehetőség.

A gyors kimutatási módszerek jelentősége a termékfejlesztések kapcsán kerülhet előtérbe. Meghatározott korlátok között alkalmasak lehetnek fermentált zöldségkészítmények csíraszámbeclésére, starterkultúrák aktivitás vizsgálatára, probiotikus zöldségkészítmények élő csíraszámbeclésére, vagy folyamatok nyomon követésére.

Irodalomjegyzék

- Alameri, F., Tarique, M., Osaili, T., Obaid, R., Abdalla, A., Masad, R., Al-Sbiei, A., Fernandez-Cabezudo, M., Liu, S.-Q., Al-Ramadi, B., et al. (2022): Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Vegetable Products: Potential Probiotic and Postbiotic Characteristics Including Immunomodulatory Effects. *Microorganisms*. 10 (1), Paper 389, 15 p. DOI: 10.3390/microorganisms10020389
- Aragones, L. Escudé, C. Visa, P. Salvi, L. Mocé-Llivina, L. (2012): New insights for rapid evaluation of bactericidal activity: a semi-automated bioluminescent ATP assay, *Journal of Applied Microbiology*, 113 (1), 114–125 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05320.x
- Armbruszt, S. (2015b): Élelmiszer vizsgálati módszerek In: Figler M. (szerk.) (2015): *Élelmiszerminőségbiztosítás* Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 137-177.
- Armbruszt, S., (2015a): Élelmiszer toxikológia In: Figler M. (szerk.) (2015): *Élelmiszerminőségbiztosítás* Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 15-99
- Az Európai Parlament és a Tanács 1333/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az élelmiszer-adalékanyagokról
- Az Európai Parlament és a Tanács 1924/2006/EK rendelete (2006. december 20.) az élelmiszerekkel kapcsolatos, tápanyag-összetételre és egészségre vonatkozó állításokról
- Az Európai Parlament és a Tanács 852/2004/EK rendelete (2004. április 29.) az élelmiszer-higiéniáról
- Az Európai Parlament és a Tanács 1169/2011/EU rendelete (2011. október 25.) a fogyasztók élelmiszerekkel kapcsolatos tájékoztatásáról, az 1924/2006/EK és az 1925/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet módosításáról és a 87/250/EGK bizottsági irányelv, a 90/496/EGK tanácsi irányelv, az 1999/10/EK bizottsági irányelv, a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv, a 2002/67/EK és a 2008/5/EK bizottsági irányelv és a 608/2004/EK bizottsági rendelet hatályon kívül helyezéséről
- Az Európai Parlament és a Tanács (EU) 2015/2283 rendelete (2015. november 25.) az új élelmiszerekről, az 1169/2011/EU európai parlamenti és tanácsi rendelet módosításáról,

valamint a 258/97/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet és az 1852/2001/EK bizottsági rendelet hatályon kívül helyezéséről

Bellassi, P., Fontana, A., Morelli, L., (2023): Application of flow cytometry for rapid bacterial enumeration and cells physiological state detection to predict acidification capacity of natural whey starters, *Heliyon*, 9 (8), Paper e19146, 9 p. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e19146

Bíró, Gy. (2014): A bél mikrobióta kapcsolata az egészséggel és betegséggel. Irodalmi áttekintés *Egészségtudomány* 58 (2014/3), 15 p.

Bunthof, CJ, Abee, T. (2002): Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl Environ Microbiol.* 68 (6), 2934-42. DOI: 10.1128/AEM.68.6.2934-2942.2002

Bunthof, CJ., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, FM., Abee, T. (2001): Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 67(5), 2326-35. DOI: 10.1128/AEM.67.5.2326-2335.2001

Cele, N.; Nyide, B.; Khoza, T. (2022): In Vitro Characterisation of Potential Probiotic Bacteria Isolated from a Naturally Fermented Carrot and Ginger Brine. *Fermentation*. 8 (10), 534, 16 p. DOI: 10.3390/fermentation8100534

Comas-Riu, J., Rius, N., (2009): Flow cytometry applications in the food industry, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (8), 999–1011. DOI: 10.1007/s10295-009-0608-x

Czirok, É. (szerk) (1999): *Klinikai és járványügyi bakteriológia*. Budapest, Melania Kft.

Csapó, J. és Albert, Cs. (2018): *Funkcionális élelmiszerek*. Debreceni Egyetemi Kiadó

Davis, C. (2014): Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J. Microbiol. Methods* 103, 9–17. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.04.012

Deák, T. (szerk) (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.

- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M., (2013): Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food microbiology*. 33 (1), 1-10. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.003.
- Di Cagno, R., Filannino, P., és Gobbetti, M., (2016): Fermented Foods: Fermented Vegetables and Other Products, In: Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F. (szerk.) (2016): *Encyclopedia of Food and Health*, United Kingdom. Academic Press, pp 668-674. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00284-1
- Endo, A., Maeno, S., Tanizawa, Y., Kneifel, W., Arita, M., Dicks, L., Salminen, S. (2018): Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes. *Appl Environ Microbiol*. 84(19), Paper e01290-18. 14 p. DOI: 10.1128/AEM.01290-18
- 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről
- Fan, X., Li, X., Zhang, T., Xu, J., Shi, Z., Wu, Z., Wu, J., Pan, D., Du, L. A (2021): Novel qPCR Method for the Detection of Lactic Acid Bacteria in Fermented Milk. *Foods*. 10(12), Paper 3066. 17 p. DOI:10.3390/foods10123066
- FAO/WHO (2001): Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Córdoba, Argentina, 34 p.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017): Expert consensus document: the international scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 14 (8), 491–502. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.75
- Gubicskóné Kisbenedek, A. (2015): Élelmiszerismeret és élelmiszeripari technológiák In: Figler M. (szerk.) (2015): *Élelmiszer-tudományi ismeretek*. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 135-346.
- Halász, A., Baráth, Á., Holzapfel, W. H. (1999): The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung A*, 208 (5-6), 434–438. DOI.:10.1007/s002170050443

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G. *et al.* (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 11, 506–514 DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66
- Holzapfel, W. H., Haberer, O., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365–373. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.365s
- http1, Promega, BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay Technical Bulletin. https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/bactiter_glo-microbial-cell-viability-assay/?catNum=G8230 (Utolsó letöltés: 2024.04.09.)
- ISO 19344 Milk and milk products. Starter cultures, probiotics and fermented products
Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry
- Jasson, V. Jaxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., and Uyttendaele, M. (2010): Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27(6), 710–730. DOI: 10.1016/j.fm.2010.04.008
- Kaprelyants, AS., Mukamolova, GV., Davey, HM., Kell, DB. (1996): Quantitative Analysis of the Physiological Heterogeneity within Starved Cultures of *Micrococcus luteus* by Flow Cytometry and Cell Sorting. *Appl Environ Microbiol.* 62(4), 1311-1316. DOI: 10.1128/aem.62.4.1311-1316.1996
- Leroy, F., és De Vuyst, L. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology.* 15(2), 67–78. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Lovász, Cs., (2014): A kémiai Nobel-díj és a *Staphylococcus aureus*. A modern tömegspektrometria szerepe a mikroorganizmusok azonosításában. *Élelmiszervizsgálati közlemények* 15 (4), pp 327-343.
- Magyar Élelmiszerkönyv, Codex Alimentarius Hungaricus 2-603 számú irányelv (régi 2-33 számú irányelv) Savanyúságok Pickles (2013)

- Magyar Élelmiszerkönyv, Codex Alimentarius Hungaricus 2-51 számú irányelv Tej és tejtermékek, Dairy products (2004)
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hutkins, R. (2021): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 196–208. DOI.: 10.1038/s41575-020-00390-5
- Matsuyama, T., (1984): Staining of living bacteria with rhodamine 123, *FEMS Microbiology Letters*, 21(2), 153–157.
- Mirmiran, P., Houshialsadat, Z., Gaeini, Z. Bahadoran, Z. Azizi, F. (2020): Functional properties of beetroot (*Beta vulgaris*) in management of cardio-metabolic diseases. *Nutrition & Metabolism*. 17(1) Paper 3 15 p. DOI.: 10.1186/s12986-019-0421-0
- Mokoena, M.P.; Omatola, C.A.; Olaniran, A.O. (2021): Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Molecules*, 26 (22), Paper 7055. 13 p. DOI.: 10.3390/molecules26227055
- Montet, D., Ray, R.C., Zakhia-Rozis, N. (2014): Lactic acid fermentation of vegetables and fruits In: Ray., R. C., Montet., D. (szerk). (2014): *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. Boca Raton, CRC Press, pp. 108-140. DOI: 10.1201/b17307-7
- MSZ ISO 6887-1:2000 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A vizsgálati minták, az alapszuspenzió és a decimális hígítások elkészítése mikrobiológiai vizsgálathoz. 1. rész: Az alapszuspenzió és a decimális hígítások elkészítésének általános szabályai
- MSZ ISO 15214 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a mezofil tejsavtermelő baktériumok megszámlálására. Telepszámlálási technika 30 °C-on.
- Pederson, C., Albury. M. (1969): The sauerkraut fermentation, *State Agricultural Experiment Station Technical Bulletin No. 824*. Geneva, New York, Cornell University
- Penas, E, Frias, J, Sidro, B, Vidal-Valverde, C. (2010): Chemical evaluation and sensory quality of sauerkrauts obtained by natural and induced fermentations at different NaCl levels from *Brassica oleracea* Var. capitata Cv. Bronco grown in eastern Spain. Effect of storage. *J Agric Food Chem*. 58(6), 3549-3557. DOI: 10.1021/jf903739a

- Pishva, E., Hassannia, N., Fazeli, M. R., Havaee, A., Jamalifar, H., Hossein, M. P., Shojaee H. és Akbari, M. (2009): Antibacterial Effect of Authochlorous Lactobacillus Strains Isolated from Traditional Yogurts. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8 (8), 1132-1137. DOI: 10.3923/pjn.2009.1132.1137
- Qiao, N., Wittouck, S., Mattarelli, P., Zheng, J., Lebeer, S., Felis, GE., Gänzle, MG. (2022): After the storm-Perspectives on the taxonomy of *Lactobacillaceae*. *JDS Commun.*, 3(3), 222-227. DOI: 10.3168/jdsc.2021-0183
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., & Kumar, E. V. (2008): Amylolytic bacterial lactic acid fermentation A review. *Biotechnology Advances*, 26(1), 22–34. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.004
- Remund, B.; Yilmaz, B.; Sokollik, C. (2023): D-Lactate: Implications for Gastrointestinal Diseases. *Children*, 10 (6), Paper 945. 14 p. DOI: 10.3390/children10060945
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., et al. (2021): The international scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (9), 649–667. DOI: 10.1038/s41575-021-00440-6
- Schleifer, K.H., Ludwig, W. (1995a). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (szerk) (1995): The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria, vol 2. Springer, Boston, MA. pp. 7–18 DOI: 10.1007/978-1-4615-5817-0_2
- Schleifer, K. H., és Ludwig, W. (1995b). Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 461–467. DOI:10.1016/s0723-2020(11)80404-2
- Shahbazi, R., Sharifzad, F., Bagheri, R., Alsadi, N., Yasavoli-Sharahi, H., Matar, C., (2021): Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties of Fermented Plant Foods. *Nutrients*. 13(5), 1516. 20 p. DOI: 10.3390/nu13051516
- Swain, MR., Anandharaj, M., Ray, RC., Parveen Rani, R. (2014): Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. *Biotechnol Res Int.*; 2014. Paper 250424. 19 p. DOI: 10.1155/2014/250424.

- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., et al. (2020): The international scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17 (11), 687–701. DOI: 10.1038/s41575-020-0344-2
- Szabó, Z. (2015): Funkcionális élelmiszerek, étrend-kiegészítők és marketingjük In: Figler, M. (szerk.) (2015): *Élelmiszermínőségbiztosítás*. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 305-357.
- Tóth, Sz., (2018): A pre- és probiotikumok használatának szabályozása az Európai Unióban és a világ más országaiban. *Acta Agraria Kaposvariensis*. 22 (2), 46–62 DOI: 10.31914/aak.2278
- Útmutató a savanyított termékek előállításának jó higiéniai gyakorlatához (2009) Készült a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium támogatásával Campden & Chorleywood Élelmiszeripari Fejlesztési Intézet Magyarország Kht. Kiadás 1. Verzió 2. <https://elelmiszerlanc.kormany.hu/download/0/eb/40000/Savany%C3%ADtott%20term%C3%A9kek%20ghp.pdf> (Utolsó letöltés dátuma 2024.04.14.)
- Vesa, T., Pochart, P., Marteau, P., (2000). Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther.* 14(6), 823-828. DOI: 10.1046/j.1365-2036.2000.00763
- Vinderola, G., Cotter, PD., Freitas, M., Gueimonde, M., Holscher, HD., Ruas-Madiedo, P., Salminen, S., Swanson, KS., Sanders, ME. and Cifelli, CJ. (2023). Fermented foods: a perspective on their role in delivering biotics. *Front. Microbiol.* 14, Paper 1196239. 6 p. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1196239
- Vinderola, G. és Ritieni, A. (2015): Role of probiotics against mycotoxins and their deleterious effects. *Journal of Food Research*. 4(1), 10-21. DOI:10.5539/JFR.V4N1P10
- Yu, H., Liu, W., Li, D., Liu, C., Feng, Z., Jiang, B. (2020): Targeting Delivery System for *Lactobacillus Plantarum* Based on Functionalized Electrospun Nanofibers. *Polymers*, 12 (7), 1565. 12 p. DOI: 10.3390/polym12071565

- Zabat, M.A., Sano, W.H., Wurster, J.I., Cabral, D.J., Belenky, P. (2018): Microbial Community Analysis of Sauerkraut Fermentation Reveals a Stable and Rapidly Established Community. *Foods* 7(5), 77. 8 p. DOI: 10.3390/foods7050077
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *Apacbee Procedia*, 2, 50-56. DOI: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010
- Zamanpour, S., Rezvani, R., Isfahani, A., Afshari, A. (2023): Isolation and some basic characteristics of lactic acid bacteria from beetroot (*Beta vulgaris* L.) —A preliminary study. *Canrea Journal: Food Technology, Nutritions, and Culinary Journal*.6 (1) 42-56. DOI: 10.20956/canrea.v6i1.980.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, CMAP., Harris, HMB., Mattarelli, P., O'Toole, PW., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, GE., Gänzle, MG., Lebeer, S. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 70(4), 2782-2858 DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.
- Zubaidah, E., Arum, M.S., Dewanti, T., Rahayu, A.P., Sriantha, I., Tewfik, I., and Tewfik, I. (2023): Sauerkraut inoculated with *Lactobacillus casei* as a potent immunomodulator in *Escherichia coli* infected mice. *Food Research*. 7 (2), 67-73. DOI: 10.26656/fr.2017.7(2).586
- Zubaidah, E., Ike Susanti, I., Yuwono, S.S., Rahayu, A.P., Sriantha, I. and Tewfik, I. (2020): The combined impact of sauerkraut with *Leuconostoc mesenteroides* to enhance immunomodulatory activity in *Escherichia coli*-infected mice. *European Food Research and Technology*. 246 (8), 1889-1893. DOI: 10.1007/s00217-020-03540-w

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Mindenkinek, a kedves Ismerősöknek, a Kollégáknak, a Barátoknak, a Családomnak, akik lehetőségekkel, ötletekkel, szakmai tanácsokkal és beszélgetésekkel, voltak segítségemre.

Szeretném megköszönni Dr. Pomázi Andrea tanárnőnek és Dr. Korzenszky Péter tanár úrnak témavezetőként nyújtott segítségüket.

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Emődy-Kiss Blanka

A Hallgató Neptun kódja: DNO63R

A dolgozat címe: Fermentált zöldségkészítmények tejsavbaktérium csíraszama és annak becslési lehetőségei

A megjelenés éve: 2024

A konzulens intézetének neve: Műszaki Intézet

A konzulens tanszékének a neve: Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Gépek Tanszék

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

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

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

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

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

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2024. év április hó 20 nap


Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Emődy-Kiss Blanka (hallgató Neptun azonosítója: **DNO63R**) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: Gödöllő, 2024. év április hó 10. nap



belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.