

KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSA EGYES LAKTOBACILLUSOK BIOGÉN AMIN ÉS BAKTERIOCIN SZINTÉZISÉRE

A kutató munka célja:

Autentikus laktobacillus törzsek bakteriocin, hisztamin és hidrogénperoxid termelésének tápléösszetétel függését kívántuk meghatározni, maximális mikroba gátlást és minimális hisztamin képzést eredményező minimális/természetes növényi szubsztrátumú tápközeg kialakítása érdekében.

A bakteriocin hatást *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* baktérium törzsekre, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (aflatoxin termelők), *Fusarium penésztörzsekre*, valamint *Candida galbrata* CBS 138 és *Szaccharomyces cerevisiae* 2880 élesztő törzsekre kívántuk ellenőrizni.

A fentiek értelmében a kutatómunka programja a következő volt:

- 1.) Laktobacillus törzsek szaporodásának és bakteriocin termelésének vizsgálata MRS (kontroll) és különböző táptalaj-komponensekkel kiegészített pepton-víz tápközegekben, valamint növényi szubsztrátumokon: paradicsom-juice, csicsóka- illetve céklalén.
- 2.) Biogén amin képződést befolyásoló tényezők vizsgálata: aminosav dekarboxiláz és diaminooxidáz enzimek aktivitásának szubsztrát koncentráció, hőmérséklet és pH függése.
- 3.) Hidrogén peroxid termelés vizsgálata kiválasztott törzsekre.

EREDMÉNYEK

A tápközeg összetétel hatása autentikus tejsavbaktériumok szaporodására

A vizsgált tápközegek közül az MRS eredményezte a legjobb szaporodást minden törzs esetén. A pepton víz + élesztőkivonat illetve a pepton víz + élesztőkivonat + glükóz táplé összetételek esetén volt még számottevő szaporodás megfigyelhető. *Lb. casei subsp. casei* 2752 törzs pepton víz + Na-acetát összetételű tápoldatban is mutatott igen szerény növekedést.

1. táblázat: A vizsgált laktobacillus törzsek növekedése különböző összetételű tápoldatokban

Inkubáció	Törzs	Tápközeg						
		MRS tápleves	Peptonvíz	2x peptonvíz	Peptonvíz+ Tween 80	Peptonvíz+ Na-acetát	Peptonvíz+ élesztőki-vonat	Peptonvíz+ élesztőkiv.+ glükóz
19 óra	<i>Lb. plantarum</i> 2142	0,512	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,111
	<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	0,598	0,000	0,000	0,001	0,000	0,396	0,127
	<i>Lb. curvatus</i> 2770	0,513	0,001	0,000	0,000	0,002	0,031	0,075
27 óra	<i>Lb. plantarum</i> 2142	1,873	0,000	0,000	0,000	0,000	0,216	0,233
	<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	2,045	0,000	0,000	0,001	0,009	0,542	0,283
	<i>Lb. curvatus</i> 2770	2,006	0,000	0,001	0,001	0,002	0,138	0,217
43 óra	<i>Lb. plantarum</i> 2142	2,287	0,000	0,001	0,000	0,001	0,338	0,371
	<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	2,369	0,000	0,006	0,000	0,090	0,523	0,460
	<i>Lb. curvatus</i> 2770	2,334	0,001	0,001	0,000	0,002	0,279	0,346
67 óra	<i>Lb. plantarum</i> 2142	2,215	0,000	0,003	0,001	0,003	0,320	0,416
	<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	2,331	0,000	0,000	0,000	0,158	0,449	0,521
	<i>Lb. curvatus</i> 2770	2,304	0,001	0,002	0,006	0,002	0,258	0,369

A növényi alapú táplevek: 10% porított szárítmány + 90 % fiziológiás sóoldat (0,9% NaCl) → sterilizálás autoklávban, 121⁰C, 15 perc.

Növesztési körülmények: MRS táplevesen való 24 órás előszaporítás után a steril növényi szubsztrátumra oltottuk a tejsavbaktérium szuszpenzióját úgy, hogy az indulási sejtkoncentráció 10⁶ MPN/mL legyen. Ezt követően 30⁰C-on 72 órát inkubáltuk.

2. táblázat: Növényi szubsztrátumon elérhető sejtkoncentráció

Növényi szubsztrátum	Maximális sejtszám MPN/mL		
	2142	2750	2770
Csicsóka	4,3x10 ⁸	1,6x10 ⁸	2,3x10 ⁸
Cékla	4,3x10 ⁸	1,6x10 ⁸	4,3x10 ⁸
Paradicsomos (tomato juice, TJ)	5,6x10 ⁷	4,3x10 ⁷	6,3x10 ⁷

Növényi alapú tápleveken három kiemelten vizsgált törzs mindegyike szaporodott, már 24 óra inkubálás alatt elérte a maximális sejtkoncentrációt, ami arra utal, hogy a hozzáférhető

szubsztrátum 24 órára elegendő a növekedéshez. Az irodalom szerint a TJ tápleves mindenekelőtt a bakteriocin termelés szempontjából előnyös a csicsóka- és céklaléhez képest, azonban a sejt növekedést tekintve szerényebb eredményt hozott.

Mikroba gátló hatás tápközeg függése

A gátló hatást a különböző összetételű tápközegekben inkubált tejsavbaktériumok 24 órás tenyészetének szűrletéből (nyers bakteriocin oldat) vizsgáltuk agar-diffúziós teszttel.

A vizsgálat menete: 1,5%-os nutrient agart öntöttünk petri csészékbe, majd megdermedés után 7 mm átmérőjű kutakba fúrtunk a gélbe. A baktériumtenyészet centrifugálása után a felülúszó pH-ját 6,8-ra állítottuk a savak gátló hatásának kiküszöbölése érdekében, majd sejtmentesre szűrtük. A szűrletből 3x150 µl-t pipettáztunk a kutakba. A pipettázások között a lemezeket 50°C-on inkubáltuk, melynek során az anyag bediffundált a gélbe. Öt ml felolvasztott BHI lágyagarba (0,7%) belekevertünk 0,5 ml cca 10⁵ sejt/ml csíraszámú tesztorganizmust és óvatosan a nutrient agar tetejére öntöttük. Megdermedés után a lemezeket 30°C-on inkubáltuk 24 órán át. A feltisztulási zónákat vizuálisan értékeltük.

A *Lactococcus lactis subsp. lactis* csak MRS táplevesen termelt *Listeria monocytogenes*-sel szemben hatásos gátló anyagot. A többi vizsgálatba vont törzs aktivitását a 3. táblázat összegzi.

3. táblázat: Az antibakteriális aktivitás tápközeg összetétel függése

Bakteriocintermelő törzs	Tápközeg	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. plantarum</i> 2142	MRS	±	+
	Peptonvíz	±	+
	2x peptonvíz	±	+
	Peptonvíz+Na-acetát	–	–
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát	+	–
	Peptonvíz+Tween 80	–	+
<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	MRS	+	+
	Peptonvíz	+	+
	2x peptonvíz	±	–
	Peptonvíz+Na-acetát	±	–
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát	±	±
	Peptonvíz+Tween 80	±	+
<i>Lb. curvatus</i> 2770	MRS	±	±
	Peptonvíz	+	+
	2x peptonvíz	±	–
	Peptonvíz+Na-acetát	–	–
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát	–	±
	Peptonvíz+Tween 80	±	+

Az adatok jól szemléltetik, hogy a teszt mikroorganizmussal szembeni gátló aktivitás erősen függ a termelő törzstől. Egyazon termelő törzs esetében a gátló hatás tápközeg összetételétől való függése is jól megfigyelhető volt. Megállapítottuk, hogy a bakteriocin képződés nem mutat összefüggést a baktérium szaporodási aktivitásával. Ha egybevetjük a 2142, 2752 és 2770-es törzsek megfelelő tápközegben mért szaporodását és a teszt organizmusokkal szembeni gátló hatását, azt látjuk, hogy a peptonvíz, illetve peptonvíz+élesztő extrakt+glükóz táplevesen tapasztalt gyenge szaporodás ellenére, az antibakteriális aktivitás a 2142 esetében az MRS-sel megegyező, illetve jobb hatást váltott ki *L. monocytogenes*-sel szemben. *E. coli*-val szembeni gátlást vizsgálva, a 2142 és 2752 törzs peptonvízen szaporítva MRS azonos, míg a 2770 törzs jobb inhibíciót váltott ki. Peptonvíz +Tween 80-on való szaporításból nyert nyers bakteriocin oldat mindhárom törzs esetében az MRS-sel azonos gátló hatást mutatott *E. coli*-val szemben.

Ez a megfigyelés egyben azt is alátámasztja, hogy a bakteriocin termelés a szaporodási fázistól független, vagyis a metabolit képződés a stacioner szakaszban megy végbe.

Élesztő gátlóhatóságát vizsgálva, a tápközeg összetétel befolyása szintén megjelent. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat: Élesztőnövekedés gátlóhatósága különböző táptalajokon szaporított tejsavbaktériumok nyers bakteriocin oldataival

Bakteriocintermelő törzs	Tápközeg	<i>Candida glabrata</i> CBS 138	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2880
<i>Lb. plantarum</i> 2142	MRS	++	++
	Peptonvíz	+	++
	2x peptonvíz	±	
	Peptonvíz+Na-acetát	++	±
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát	±	+
	Peptonvíz+Tween 80	++	±
<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	MRS	++	+
	Peptonvíz	+	
	2x peptonvíz	-	+
	Peptonvíz+Na-acetát	+	+
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát	±	+
	Peptonvíz+Tween 80	+	-
<i>Lb. curvatus</i> 2770	MRS	++	+
	Peptonvíz	±	
	2x peptonvíz	±	±
	Peptonvíz+Na-acetát	-	-
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát	-	+
	Peptonvíz+Tween 80	+	-

Látható az adatokból, hogy a 2142 jelű törzs hatékonyan bizonyult mindkét élesztővel szemben, a gátlás mértékében azonban különbségeket detektáltunk a tápközeg összetételétől

függően. A 2752 és 2770 metabolitjával szemben mindkét vizsgált élesztő a tápközeg összetételétől függően mutatott rezisztenciát is.

Bakteriocin termelő LAB törzsek aflatoxin képző *Aspergillus*okra gyakorolt hatását vizsgáltuk együttszaporítás, illetve nyers bakteriocin oldat esetén. Előszelekció után a vizsgálatokat három LAB törzssel (2142, 2752 és 2770), valamint két penész törzsszel (*Asp. parasiticus* 1039 és *Asp. flavus* 31) végeztük. Meghatároztuk a baktérium illetve penész telepképző egységek (tke) 8 napos inkubáció során bekövetkező változásait, valamint a képződő össz-aflatoxin koncentrációt. Az értékeket a kontrollként használt, önmagában szaporított penésztenyészet értékeivel hasonlítottuk össze. Eredményeink azt mutatták, hogy mind az együttszaporítás, mind az előszaporított LAB tenyészet adagolása a penészszaporodást jelentősen gátolta. A toxinképződés is eredményesen visszaszorult a 6. napig. A toxintermelés szempontjából a bakteriocin oldat alkalmazás bizonyult hatékonyabbnak, ebben az esetben csak a 8. napon volt toxintermelés detektálható.

5. táblázat: *Aspergillus* penészekkel szembeni gátló hatás vizsgálata

Bakteriocintermelő törzs	Tápközeg	<i>Asp. parasiticus</i> 1039	<i>Asp. flavus</i> 31
<i>Lb. plantarum</i> 2142	MRS	++	++
	Peptonvíz	++	++
	2x peptonvíz		+
	Peptonvíz+Na-acetát		++
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát		±
	Peptonvíz+Tween 80	++	++
<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	MRS	±	±
	Peptonvíz	++	+
	2x peptonvíz		-
	Peptonvíz+Na-acetát		-
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát		-
	Peptonvíz+Tween 80	+	++
<i>Lb. curvatus</i> 2770	MRS	±	+
	Peptonvíz	++	++
	2x peptonvíz		-
	Peptonvíz+Na-acetát		-
	Peptonvíz+élesztőkivonat+Na-acetát		++
	Peptonvíz+Tween 80	+	-

Fusarium törzsek inhibíciója is határozottan törzsfüggő volt MRS-en nyert bakteriocin oldatok hatására, ahogy ezt következő két táblázat is mutatja.

6. táblázat: *Fusarium* törzsek gátlása LAB törzsekkel

a) Agar – diffúziós módszer

Törzsek	Penészek				
	<i>Fusarium culmorum</i> 301	<i>Fusarium culmorum</i> 302	<i>Fusarium proliferatum</i> M 5689 (karaf.)	<i>Fusarium proliferatum</i> M 5689 (PDA)	<i>Fusarium graminearum</i> 608
2142	++	++	++	++	-
2750	++	++	-	-	-
2775	++	++	+	-	-

b) Agar - diffúziós módszer - felülúszó

Törzsek	Penészek				
	<i>Fusarium culmorum</i> 301	<i>Fusarium culmorum</i> 302	<i>Fusarium proliferatum</i> M 5689 (karaf.)	<i>Fusarium proliferatum</i> M 5689 (PDA)	<i>Fusarium graminearum</i> 608
2142	++	+	+	++	++
2750	+	-	-	++	++
2775	++	++	+	-	++

A spóra kihajtás gátlására vonatkozó kísérleteink nizin esetében már 10 ppm koncentrációban hatékony csírázás gátlást mutattak, de tejes közegben nem eredményezte sem a spóra kihajtás, sem a vegetatív sejtek szaporodásának gátlását.

Zöldség alapú tápközegekben *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* és *Escherichia coli* gátolhatóságát vizsgáltuk MALTHUS készülék segítségével. A tejsavbaktériummal fermentált zöldséglevelekben a *L. monocytogenes* szaporodása teljesen gátolt volt és a leoltás túlélő sejteket nem mutatott. A fermentált céklalé gátolta *E. coli* és *B. cereus* szaporodását, az utóbbit nagyobb mértékben. Ugyanakkor a fermentált csicsókalé nem befolyásolta a fent nevezett mikrobák szaporodását. A MALTHUS készülék csak abban az esetben alkalmazható megbízhatóan amikor a mikroba szaporodása intenzív. A kémcsöves módszer, a megerősítő kioltásokkal alátámasztotta a MALTHUS-sal kapott eredményeket és önmagában is jól értékelhető adatokat szolgáltatott.

Lactobacillus sake gátlóhatósága három tesztorganizmus által termelt bakteriocinnal mind MRS, mind TJ (tomato juice) esetén jó volt. A 2142 és 2750 MRS, míg a 2775 TJ tápközegben eredményezett hatékonyabb gátlást.

7. táblázat: A három vizsgált törzs MRS és TJ táplében képződött bakteriocin oldatának gátló hatása a *Lb. sake* törzssre

	Átlag	Szórás (SD)		Átlag	Szórás (SD)
Kontrol 1	0,7723	0,0607	Kontrol 1	0,7723	0,0607
Kontrol 2	1,0070	0,0607	Kontrol 2	0,8397	0,0672
MRS-2142	0,6643*	0,0321	TJ -2142	0,6833	0,0513
MRS-2750	0,8690*	0,0387	TJ -2750	0,9940*	0,0979
MRS-2775	0,6993*	0,0528	TJ -2775	0,5193*	0,1881

Kontrol 1= gátló komponens nélkül, Kontrol 2= a vizsgált táplé önmagában (bakteriocin nélkül), MRS/TJ táplé - 2142,-2750, -2775= a vizsgált törzsek nyers bakteriocin oldata (a törzs számával jelölve) az adott tápléből
*Szigifikáns differencia a Kontrol 1-hez képest (P<0,05)

Élesztővel szembeni gátlást vizsgálva is az MRS tápközeg volt a kedvezőbb, a 2142 tejsavbaktérium esetén.

8. táblázat: A *L. plantarum* 2142 törzs nyers bakteriocin oldatának gátló hatása a *C. glabrata*-ra (n=3)

	Átlag	Szórás (SD)
Kontrol 1	0,08000	0,01249
Kontrol 2 MRS	0,23600*	0,07113
Kontrol 2 TJ	0,54733*	0,14692
Bakteriocin MRS	0,19967*	0,04822
Bakteriocin TJ	0,39833*	0,04557

Kontrol 1= gátló komponens nélkül, Kontrol 2= a vizsgált táplé önmagában (bakteriocin nélkül), Bakteriocin= A *L. plantarum* 2142 törzs nyers bakteriocin oldata a vizsgált tápléből

Biogén amin képzés

Az amin szintézist elsődlegesen befolyásolja a hozzáférhető szubsztrátum (aminosav) és a mikroorganizmus aminosav dekarboxiláz, valamint aminosav oxidáz aktivitása. A vizsgálatba vont tejsavbaktériumok hisztidin, ornithin, lizin és tiramin dekarboxiláz aktivitását differenciál táptalajon petri csészében teszteltük Joosten és Northold (1989) leírása szerint.

A táptalaj összetétele a következő: tripton, 0,5 %, élesztő extrakt, 0,5 %, NaCl, 0,5 %, glükóz, 0,1 %, Tween 80[®], 0,05%, MgSO₄, 0,02 %, MnSO₄, 0,005 %, FeSO₄, 0,004 %, CaCO₃, 0,01 %, aminosav, 2,0 %, brómkrezol bíbor, 0,006 %, agar, 2,0 %, pH=5,0.

A vizsgálat menete: a táptalaj 15 ml-ét petri csészébe öntöttük, szilárdulás után a vizsgálandó törzs előszaporított szuszpenzióját a táptalaj felületére cseppentettük, majd 30⁰C-on, 24-48 órát inkubáltuk. A kinövő telep körüli rózsaszín gyűrű (indikátor színváltozás) dekarboxiláz-pozitív baktériumot jelölt.

9. táblázat: Néhány tejsavbaktérium aminosav dekarboxiláz aktivitása

Baktériumok	HDC	ODC	LDC	TDC
Lb. plantarum ATCC 8014	+	+	-	-
Lb. casei subsp. rhamnosus ATCC 11443	+	+	-	-
Lb. pentosus ATCC 8041	-	-	-	+
Lb. sake ATCC 15521	+	-	-	+
Lb. jensenii	-	+	+	-
Lb. plantarum	+	-	-	-
Lb. brevis var. lindneri	+	-	+	-
Lb. fructivorans	-	-	+	-

HDC - hisztidin dekarboxiláz

ODC - ornitin dekarboxiláz

LDC - lizin dekarboxiláz

TDC - tiramin dekarboxiláz

Mint azt a 9.táblázat adatai mutatják egymáshoz közeli rokonságban álló törzsek is jelentősen eltérnek ilyen vonatkozásban.

10. táblázat: Laktobacillus törzsek biogén amin termelése MRS táplevesben való szaporítás során

Baktériumok	Felülűszók biogén amin koncentrációja (µg/ml)							Σ
	PUT	HIST	CAD	SPED	AGM	SPER	TYRM	
Lb. fermentum DT 41	0,50	Tr	Tr	1,45	0,10	0,60	1,85	4,50
Lb. acidophilus N2	Tr	Tr	Tr	2,83	ND	ND	3,42	6,25
Lb. plantarum 2142	Tr	ND	Tr	0,45	ND	0,38	0,54	1,37
Lb. casei-pseudoplantarum 2750	0,22	ND	0,19	0,14	Tr	0,25	0,56	1,36
Lb. casei-casei 2752	Tr	ND	Tr	0,26	ND	0,20	0,98	1,44
Lb. curvatus 2770	0,70	ND	Tr	0,33	0,38	0,67	6,20	8,28
Lb. curvatus 2775	0,26	ND	Tr	0,30	0,43	0,78	6,43	8,2
Lb. plantarum 2739	0,52	0,20	0,86	1,40	1,78	0,90	12,74	18,40

Rövidítések: PUT-putreszcin, HIST-hisztamin, CAD-kadaverin, SPED-spermidin, AGM-agmatin, SPER-spermin, TYRM-tiramin

A peptid tartalomra nézve gazdag MRS tápközegben szaporítva a baktériumokat a felülűszók biogén amin koncentrációját oszlopkromatográfiásan határoztuk meg (Halász et al.). Ezek a koncentráció értékek jó egyezést mutatnak a specifikus aminosav dekarboxiláz aktivitásra végzett teszt eredményeivel. A HDC-negatív törzsek nem termeltek detektálható mennyiségben hisztamint.

A teszt alapján pozitív *L. plantarum* és *L. brevis* var. *lindneri*. HDC aktivitását (µmól His/min) az átalakított hisztidin mértékével kvantitatív módszerrel is meghatároztuk (Lu és Mallett, 1970). Az inkubációs idő előrehaladtával *L. plantarum* esetén határozott HDC növekedést észleltünk (2.8×10^{-2} µmól His/min -ről 15.2×10^{-2} µmól His/min -re), míg *L. brevis* var. *lindneri* esetén pedig csak közeli megduplázódást tapasztaltunk (1.9×10^{-2} µmól His/min -ről 3.6×10^{-2} µmól His/min -re). Ezekhez a HDC értékekhez tartozó hisztamin értékeket is mutatja a 11. Táblázat. Láthatóan a felülűszókban mérhető hisztamin csak mérsékelten követi a HDC aktivitások abszolút értékeit, de az egyes törzseknél a HDC növekedéssel az amin képződés is nő.

11. táblázat: Tejsavbaktérium törzsek hisztidin-dekarboxiláz aktivitása és a tápközeg hisztamin koncentrációjának alakulása 7 napos inkubálás során

Inkubálási idő (nap)	HDC aktivitás (μmol His/perc)		A tápleves hisztamin koncentrációja (μg HIST/ml tápleves)	
	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. brevis var. lindneri</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. brevis var. lindneri</i>
0	$2,8 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$	0,9	1,9
2	$7,6 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$	14,2	2,7
7	$15,2 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-2}$	43,1	3,6

A tápközeg összetétel hatása a LAB törzsek hisztamin termelésére

A HDC aktivitást több faktor is befolyásolhatja. Ezek közül kiemelendő, a megfelelő szubsztrát jelenléte, így kísérleteink során komplex tápközeg hisztidinnel való kiegészítése magasabb HDC aktivitást eredményezett, mint aminosav kiegészítés nélkül. Tekintettel arra, hogy a hisztidin dekarboxiláz enzim kofaktora a piridoxál 5'-foszfát, a HDC aktivitást, így a hisztamin felhalmozódását ez utóbbi jelenléte is jelentősen befolyásolja.

A LAB törzsek hisztamin termelésének tápközeg összetételtől való függését vizsgáltuk három tápközeg és három LAB törzs alkalmazásával. A kísérletben az MRS-en előszaporított sejteket oltottuk (1% oltóanyag) a három vizsgálandó tápközegbe, majd 30°C-on 72 órát inkubáltuk. A mérést centrifugálással (6000/perc, 10 perc) sejtmentesített tápoldatból, tisztítás után végeztük.

Az előkészített minták hisztamin tartalmát kompetitív ELISA teszttel (RIDASCREEN® Hisztamin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Németország) határoztuk meg, a teszt kitéhez mellékelt protokoll szerint. A meghatározás antigén-antitest reakción alapszik. A mikrotiter lyukak hisztaminnal borítottak. Az anti hisztamin antitestek, a standardok, valamint a vizsgálandó oldatok lyukakba való pipettázásával a szabad és immobilizált hisztamin között versengés indul meg az antitest kötőhelyekért. Mosási lépést követően peroxidázzal jelzett antitesteket adagolunk a lyukakba, amelyek kötődnek az antitest-hisztamin komplexekhez, a kötetlen enzim konjugátum eltávolítása mosással történik. Enzim szubsztrátum és kromogén adagolása után az előírt inkubációs idő alatt a kötött enzim konjugátum a színtelen kromogént kékszínűvé alakítja. Végül a reakció leállításához használt 1 M H₂SO₄ oldat hatására a kék színeződé sárgára változik, amelynek színintenzitását 450 nm hullámhosszon

spektrofotometriásan mérjük. A mért abszorbancia értékek és a hisztamin koncentrációk között fordított arányosság áll fenn.

Ezeket az eredményeket foglaltuk össze a 12. táblázatban.

12. táblázat: A tápközeg összetétel hatása LAB törzsek hisztamin termelésére.

Tápközeg	Hisztamin koncentráció a felülúszóban (µg/L)		
	<i>Lb. plantarum</i> 2142	<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2752	<i>Lb. curvatus</i> 2770
MRS-kontrol	1,04	1,04	1,04
MRS	2,10	2,10	2,1
MRS+0,1 % HIS	26,40	>100	∅
TJ-kontrol	∅	∅	∅
TJ	∅	11,50	∅
TJ+0,1% HIS	∅	100	∅
Peptonvíz-kontrol	∅	∅	∅
Peptonvíz	∅	∅	∅
Peptonvíz+0,1% HIS	0,56	1,00	∅

Kontrol – beoltatlan tápközeg, TJ – tomato juice

Az adatokból jól látható, hogy a 2752 törzs produkált magasabb (100µg/L) hisztamin koncentrációt, de csak a hisztidinnel kiegészített MRS és TJ tápközégekben. A *Lb.* 2770 egyik vizsgált táplében sem termelt mérhető mennyiségű hisztamint.

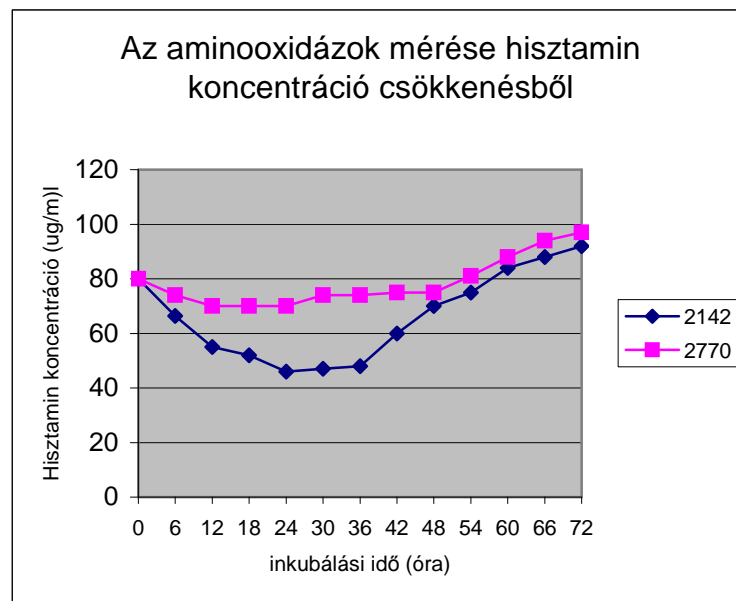
Az MRS tápközegnek már 0,1 % hisztidinnel való kiegészítése is a hisztamin képzést növelte. Ehhez viszonyítva a 0,5 és 1,0 % hisztidin hozzáadás az elérhető maximális hisztamin koncentrációra nem volt hatással, de a maximum érték időben előbb következett be.

Az aminosav dekarboxiláz aktivitás az adott mikroorganizmus növekedési fázisától is függ. A legmagasabb értékek stacioner fázisban voltak detektálhatók.

Aminoxidázok vizsgálata

A hisztamin metabolizmusa monoamino- és diaminoxidáz enzimekkel (MAO és DAO) megy végbe. Ezeknek az enzimeknek a működését indirekt úton, a tápközeghez adagolt hisztamin mennyiségének fogyásával követtük. A tápközeg (MRS) hisztaminnal úgy egészítettük ki, hogy a végkoncentráció 80 µg/ml legyen, ezt követően oltottuk rá a vizsgálni kívánt törzseket (1% oltóanyag koncentrációval), majd 30⁰C-on 72 órán át inkubáltuk. A

hisztamin méréshez centrifugálással (6000 fordulat/perc, 10 perc) sejtmentesített felülúszót használtunk oszlopkromatográfiás tisztítás után. A mért adatok jól szemléltetik, hogy a kiindulási hisztamin koncentráció az inkubálás első 24 órájában jelentősen csökkent eredményezett, a további inkubálási periódusban gyengén növekedett. Az eredmények arra utalnak, hogy a fermentáció kezdeti periódusában az aminoszavak aktívabban működnek, mint a hisztidin dekarboxiláz, azonban ez a helyzet a további inkubáció során változik és a HDC aktivitás nagyobb az aminoszavakénál, vagyis a hisztamin képződés nagyobb, mint az elbontás. Ezt a folyamatot mutatja az 1. ábra.



Proteináz aktivitás

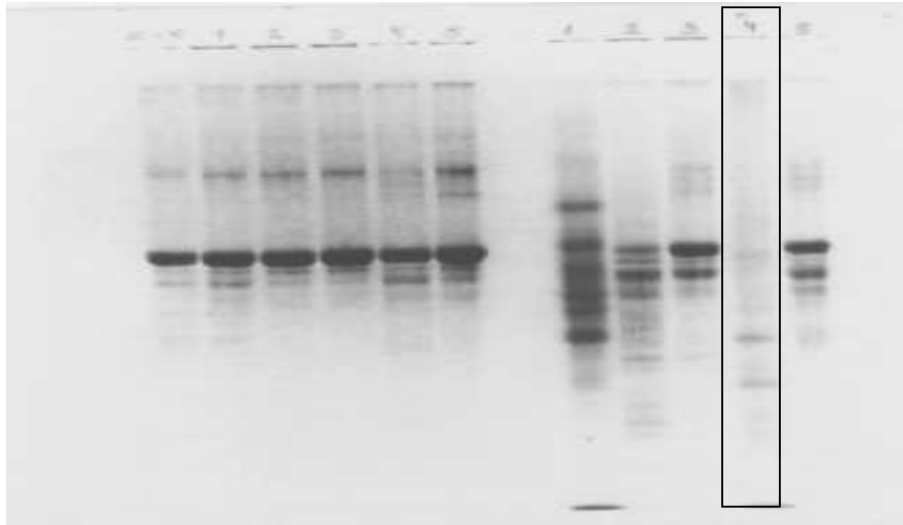
A maximális aminoszavak koncentráció már 24 órás inkubálás után beáll mind MRS, mind pepton + élesztőkivonat tápközegen, ugyanakkor a proteáz aktivitás további jelentős növekedést mutatott.

Az a körülmény, hogy a tápközeg 0.1 % hisztidinnel való kiegészítése nagyobb hisztamin koncentrációt eredményezett, mint az a hisztidin adagolásból következhetett, arra mutat, hogy a peptid kötésben jelenlévő aminoszavak esetében a proteáz aktivitás a meghatározó a hisztamin képződés szempontjából.

Az *L. plantarum* nem specifikus proteáz aktivitása MRS tápközegen 0,12 kilo Novo proteáz U/g 24 óra után és 0,18 kilo Novo proteáz U/g 72 órás tenyészetből.

A proteáz aktivitással való korrelációt mutatja az egyes törzsek össz aminoszavak képzése és α -kazeináz aktivitása is.

2. ábra: α -kazein emésztése LAB proteínázokkal.



1- *Lb. curvatus*, 2- *Lb. acidophilus*, 3- *Lb. casei* subsp. *casei*, 4- *Lb. plantarum*, 5- *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*

Az elektroferogram baloldalán az első oszlop az α -kazein standard, ezt követi a vizsgált öt törzs proteínázával való 6 órás emésztés, a jobboldalon pedig a 24 órás emésztés fehérjemintázata.

Az ábra is jól mutatja, hogy a legnagyobb össz amintermelést eredményező *Lb. plantarum* (18,40 $\mu\text{g/ml}$) bontotta az α -kazeint a legnagyobb mértékben. A zöldséglé fermentációjakor is ez a törzs termelte a legnagyobb mennyiséget aminokból.

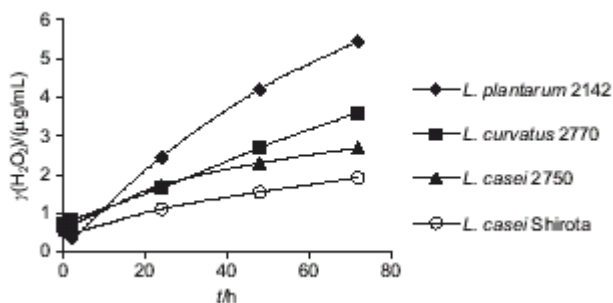
Hidrogén peroxid (H_2O_2) termelés

A tejsavbaktériumok által termelt H_2O_2 antimikrobiális szempontból előnyös, de nagyobb koncentrációban a termelő sejteket valamint a humán bélhámsejteket is károsíthatja. Kutatásaink során az egyes tejsavbaktériumok H_2O_2 termelését vizsgáltuk a szubsztrátum függvényében. A baktérium sejteket de Man Rogosa Sharpe (MRS), paradicsomlé (TJ), csicsóka és cékla alapú szubsztrátumon szaporítottuk. A H_2O_2 szintézist 24 órás sejtekkel határoztuk meg, melyeket a táplétól centrifugálással elkülönítve kétszeres steril foszfát pufferes mosást (1M, pH 6.5) követően, foszfát pufferbe szuszpendáltunk és 5 °C-on inkubálva 0, 2, 24, 48 és 72 óra után határoztuk meg a hidrogén peroxid koncentrációt (részletesen Zalán et al. 2005). A négy vizsgált törzs között szignifikáns különbséget tapasztaltunk H_2O_2 termelésben minden vizsgált tápközeg esetén. A legnagyobb H_2O_2 koncentrációt az *L. plantarum* 2142 képezte

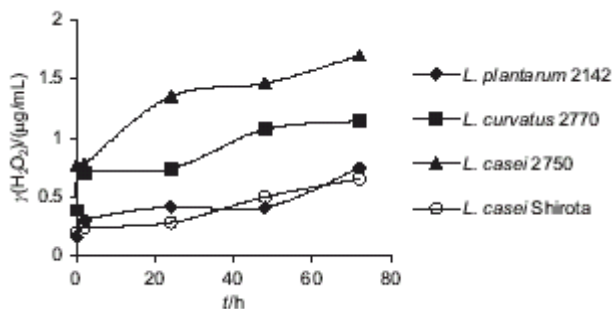
MRS táptalajon (72 óra után 5.5 µg/ml), míg TJ táptalajon az *L. casei* 2750 (72 óra után 1.7 µg/ml). A hidrogén peroxid szintézis és a képződő H₂O₂ tehát jól láthatóan törzs és szubsztrátfüggő, de *L. casei* Shirota minden esetben 0.5 µg/ml H₂O₂ alatti szintet eredményezett. Valamennyi általunk vizsgált törzs lényegesen kisebb mennyiségben termelt hidrogén peroxidot, mint Jaroni és Brashears (2000) által *L. delbrueckii* subsp. *lactis* törzsről közölt 7.5 µg/10⁷ CFU. Ito et al. (2003) *L. casei lactis* subsp. *lactis* A1 törzs esetén 300-380 ppm hidrogén peroxid koncentrációt mért, ami már jelentős baktericid hatással volt *Listeria*, *Yersinia* valamint *E. coli* törzsről.

Az *L. plantarum* 2142 által 24-48 h alatt termelt hidrogén peroxid *L. monocytogenes* és *B. cereus* teszt organizmusokra fejtett ki gátló hatást, de *E. coli*-val szemben nem (Zalán et al. 2005). A tejsavbaktériumok által termelt 0.0.3 mM hidrogén peroxid nem okozott sejtkárosodást *L. plantarum* 2142-re végzett vizsgálatok alapján. A laktobacillus törzsek H₂O₂ termelése és a fermentált cékla pigment összetevőinek változása a fermentáció során jó egyezést mutat, mert 2142-vel következett be a legnagyobb csökkenés a kiindulási értékekhez viszonyítva, míg *L. casei* 2750 ami csak kb. fele H₂O₂-ot termel jobban megőrzi a színanyagot.

3. ábra Tejsavbaktériumok H₂O₂ termelése MRS táptalajon



4. ábra Tejsavbaktériumok H₂O₂ termelése TJ táptalajon



táblázat *L. plantarum* 2142 által termelt H₂O₂ gátló hatása

Cél mikroorganizmus	L. plantarum 2142 inkubációs ideje foszfát- pufferben 5 °C-on				
	0h	2h	24h	48h	72h
<i>L. monocytogenes</i>	±	±	+	+	±
<i>B. cereus</i>	-	±	±	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-

+ erős gátlási zóna (2mm), ± gyenge gátlási zóna (0-2 mm), - nincs gátlási zóna

Irodalom:

Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W.H. (1994): *Trends in Food Sci. and Technol.* **5**, 42-49.

Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Nakajima, H. and Toba, T. (2003): *Curr. Microbiol.* **47**, 231–236

Lu, W. W. and Mallett, M. F. (1970): *Appl. Microbiol.* **19**, 367-369

Jaroni, D. and Brashears, M. M. (2000): *J. Food Sci.* **65**, 1033-1036.

Joosten, H. and Northold, M. (1989): *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2356-2359.

Zalan, Z., Németh, E., Baráth, Á. and Halász, A. (2005): *Food Technol. Biotechnol.* **43** (3), 219-225