

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**NEM TEJALAPÚ PROBIOTIKUS ÉLELMISZEREK
ELŐÁLLÍTÁSI LEHETŐSÉGEINEK
MEGALAPOZÁSA**

Doktori értekezés

KUN SZILÁRD

BUDAPEST
2008

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter,
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Rezessyné dr. Szabó Judit
egyetemi docens
Dr. Hoschke Ágoston
egyetemi tanár
Sör- és Szeszipari Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának
2008. október 7-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot
jelölte ki:**

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Nyeste László, DSc

Szigeti Jenő, CSc

Deák Tibor, DSc

Opponensek

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD

Halász Anna, DSc

Titkár

Magyar Ildikó, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1 BEVEZETÉS	2
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1 FUNKCIONÁLIS ÉLELMISZEREK.....	4
2.1.1 <i>Funkcionális élelmiszerek megjelenése, összetevői</i>	4
2.1.2 <i>Funkcionális élelmiszerek törvényi szabályozása</i>	5
2.1.3 <i>Funkcionális élelmiszerek fogyasztói elfogadottsága és megítélése</i>	7
2.2 PROBIOTIKUMOK.....	8
2.2.1 <i>A bélmikrobióta összetétele</i>	8
2.2.2 <i>A bélmikrobióta fő funkciói</i>	9
2.2.2.1 <i>Metabolizmus</i>	9
2.2.2.2 <i>Sejtszabályozás</i>	10
2.2.2.3 <i>Védőmechanizmus</i>	11
2.2.3 <i>Probiotikumok szerepe és kritériumai</i>	11
2.2.3.1 <i>Biztonság</i>	11
2.2.3.2 <i>Funkcionális tulajdonságok</i>	12
2.2.3.3 <i>Technológiai szempontok</i>	13
2.2.4 <i>Probiotikumok jótékony élettani hatásai</i>	13
2.2.4.1 <i>Laktóz intolerancia enyhítése</i>	14
2.2.4.2 <i>Koleszterinszint csökkentése</i>	15
2.2.4.3 <i>Hasmenés elleni hatékonyság</i>	15
2.2.4.4 <i>Probiotikumok hatása a bélbetegségekre</i>	16
2.2.4.5 <i>Ételallergia és atópiás betegségek tüneteinek csökkentése</i>	17
2.2.4.6 <i>Antikarcinogén és antimutagén hatás</i>	17
2.2.4.7 <i>Immunfunkciók erősítése</i>	18
2.3 BIFIDOBAKTÉRIUMOK.....	19
2.3.1 <i>Morfológia</i>	19
2.3.2 <i>Sejtfal szerkezet</i>	20
2.3.3 <i>Hőmérséklet, pH optimum és oxigén érzékenység</i>	20
2.3.4 <i>Tápanyagszükséglet</i>	21
2.3.5 <i>Metabolizmus</i>	22
2.3.6 <i>Antibiotikum rezisztencia</i>	23
2.3.7 <i>A bifidobaktériumok és a prebiotikumok kölcsönhatása</i>	24
2.3.8 <i>A melanoidinek hatása a bifidobaktériumokra</i>	26
2.4 PROBIOTIKUMOK ANTAGONISTA HATÁSA ÉS BAKTERIOCIN TERMELÉSE.....	26
2.4.1 <i>Bakteriocinek sajátosságai és a szerepük</i>	27
2.4.2 <i>Bakteriocinek bioszintézise</i>	29
2.4.3 <i>Bakteriocinek gátlómechanizmusa</i>	29
2.4.4 <i>Bifidobaktériumok antimikrobás hatása – bakteriocinek termelése</i>	30
2.4.5 <i>Bakteriocinek hasznosítása az élelmiszeriparban</i>	33
2.5 BIFIDOBAKTÉRIUMOK SZÖVETI ADHERENCIÁJA.....	35
2.5.1 <i>In vitro modellek tapadási vizsgálatához</i>	35
2.5.2 <i>Tapadás mechanizmusa</i>	36
2.5.3 <i>A tapadást befolyásoló tényezők - pH, epesav, emésztő enzimek hatása</i>	37
2.5.4 <i>A tapadást elősegítő tényezők – hidrofobicitás, autoaggregáció</i>	38
2.5.5 <i>Bifidobaktériumok tapadó képessége</i>	38
2.5.6 <i>Gasztrointesztinális patogének tapadásának gátlása</i>	40
2.5.7 <i>Tapadás detektálására alkalmas módszerek</i>	41
2.6 ERJESZTETT PROBIOTIKUS TERMÉKEK TERVEZÉSE.....	41
2.6.1 <i>A probiotikumok alkalmazásának feltételei</i>	42
2.6.1.1 <i>A probiotikum életképességét befolyásoló hatások</i>	43
2.6.1.2 <i>A probiotikum és az élelmiszermatrix kapcsolata</i>	44
2.6.1.3 <i>A felhasznált mikrobák kölcsönhatásának szerepe</i>	44
2.6.1.4 <i>A starterkultúrák hatása a termék jellemzőire</i>	45
2.6.2 <i>Növényi eredetű élelmiszerek fejlesztése</i>	45
2.6.2.1 <i>Probiotikus termékek fejlesztéséhez kiválasztott nyersanyagok jellemzése</i>	46
2.6.2.2 <i>Zöldségek szerepe a termékfejlesztésben</i>	48
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	51
3.1 FELHASZNÁLT MIKROORGANIZMUSOK ÉS FENNTARTÁSUK.....	51
3.2 FELHASZNÁLT SEJTKULTÚRÁK.....	52
3.3 FELHASZNÁLT ANYAGOK.....	53
3.3.1 <i>Felhasznált prebiotikus poli- és oligoszacharidok</i>	53

3.3.2	<i>Felhasznált melanoidinek</i>	53
3.4	FELHASZNÁLT TÁPKÖZEGEK.....	53
3.5	FIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATHOZ FELHASZNÁLT MÓDSZEREK.....	56
3.5.1	<i>Vancomycin rezisztencia vizsgálat módszerei</i>	56
3.5.2	<i>Oxigéntolerancia vizsgálat</i>	56
3.5.3	<i>Hidrogén-peroxid minimális gátló koncentrációjának meghatározása</i>	56
3.5.4	<i>Bifidobaktériumok szénhidrát hasznosításának vizsgálata</i>	56
3.5.5	<i>Maillard-reakció termékek bifidobaktériumok szaporodására kifejtett hatásának vizsgálata</i>	57
3.6	BIFIDOBAKTÉRIUMOK ANTIMIKROBÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SORÁN HASZNÁLT MÓDSZEREK.....	57
3.6.1	<i>Kétrétegű spot módszer</i>	57
3.6.2	<i>Agardiffúziós módszer</i>	57
3.6.3	<i>Fehérjetermészetű antimikrobás anyag kimutatási módszere</i>	58
3.7	TAPADÁSI VIZSGÁLATOK MÓDSZEREI.....	59
3.8	ERJESZTÉSI KÍSÉRLETEK.....	61
3.9	MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK MIKROORGANIZMUSOK MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSÁRA.....	62
3.10	ANALITIKAI MÓDSZEREK.....	62
3.10.1	<i>Szénhidrát és szerves sav mennyiségi meghatározása HPLC-vel</i>	62
3.10.2	<i>Karotinoid tartalom meghatározása HPLC-vel</i>	63
4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	64
4.1	BIFIDOBAKTÉRIUMOK FIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATA.....	64
4.1.1	<i>Bifidobacterium törzsek vancomycin rezisztenciája</i>	64
4.1.2	<i>Bifidobaktériumok oxigén toleranciája</i>	66
4.1.3	<i>Hidrogén-peroxid gátló koncentrációjának meghatározása</i>	67
4.1.4	<i>Bifidobaktériumok szénhidrát hasznosítása és a prebiotikumok értékelése</i>	68
4.1.4.1	<i>Alaptápközeg összetételének meghatározása</i>	68
4.1.4.2	<i>Bifidobaktérium törzsek cukorhasznosítása</i>	70
4.1.4.3	<i>Bifidobaktériumok prebiotikus oligo- és poliszacharid hasznosítása</i>	71
4.1.4.4	<i>Prebiotikumok szelektivitásának vizsgálata</i>	72
4.1.5	<i>Maillard-reakció termékek hatásának vizsgálata</i>	75
4.2	BIFIDOBAKTÉRIUMOK ANTIMIKROBÁS HATÁSA.....	76
4.2.1	<i>Antimikrobás hatás kimutatása kétrétegű spot módszerrel</i>	77
4.2.2	<i>Különböző módon kezelt sejtmentes tenyésztések antimikrobás hatása</i>	80
4.2.3	<i>A bifidobaktériumok sejtmentes tenyészlevegőben található antimikrobás fehérjék kimutatása</i>	80
4.2.4	<i>B. longum A4.8 törzs további vizsgálatai</i>	82
4.3	BIFIDOBAKTÉRIUMOK TAPADÁSA.....	84
4.3.1	<i>A detektálási módszerek vizsgálata</i>	85
4.3.2	<i>Különböző Bifidobacterium törzsek tapadóképességének feltérképezése</i>	86
4.3.3	<i>Bifidobaktériumok tapadásának alakulása eltérő kiindulási sejtkoncentrációk esetén</i>	87
4.3.4	<i>Bifidobacterium törzsek és az E. coli Bay100 törzs versengő tapadásának vizsgálata</i>	88
4.4	ERJESZTÉSI VIZSGÁLATOK.....	89
4.4.1	<i>Zöldséglevelek erjeszthetőségének vizsgálata</i>	90
4.4.2	<i>Erjesztési vizsgálatok sárgarépalén</i>	91
4.4.2.1	<i>Natúr sárgarépalevek jellemző mikrobiotájának feltérképezése</i>	91
4.4.2.2	<i>Előkezelési technológiák a sárgarépalevek natív mikrobiotájának csökkentésére</i>	92
4.4.2.3	<i>Bifidobaktériumok növekedésének és anyagcsere tevékenységének vizsgálata</i>	94
4.4.2.4	<i>Léptéknövelési és tárolási kísérletek</i>	97
4.4.3	<i>Erjesztési vizsgálatok csicsóka tápközegben</i>	99
4.4.3.1	<i>Bifidobaktériumok szaporodóképessége csicsóka tápközegben</i>	99
4.4.3.2	<i>Csicsóka tápközeg optimális szárazanyag-tartalma</i>	100
4.4.3.3	<i>Különböző tejsavbaktérium törzsek szaporodásának vizsgálata csicsókalében</i>	101
4.4.3.4	<i>Vegyes kultúras erjesztések</i>	102
4.4.4	<i>A Bb-12 és Shirota törzs szaporodóképessége mono és vegyes kultúras erjesztésekben</i>	104
4.4.4.1	<i>Vegyes kultúras erjesztési technológia léptéknövelése</i>	106
4.4.4.2	<i>Az erjesztett termék formulázása és a tárolás során tapasztalt főbb változások</i>	107
5	ÖSSZEFOGLALÁS	109
6	SUMMARY	113
7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	117
	MELLÉKLETEK	118
	IRODALOMJEGYZÉK.....	119
	ANTIMIKROBÁS HATÁS KIMUTATÁSÁNAK DOKUMENTÁLÁSA.....	136
	TAPADÁSI VIZSGÁLATOK DOKUMENTÁCIÓJA.....	136
	BIFIDOBAKTÉRIUMOK SZAPORODÁSA PASZTÓRÓZOTT ÉS HHP KEZELT RÉPALEVEKBEN.....	138

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC transzport rendszer	ATP-kötő kazetta transzport rendszer
CLA (conjugated linoleic acid)	Konjugált linolsav
Cpm (counts per minute)	Percenkénti beütés szám
DAEC	Diffúzan adheráló <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatogén <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxint termelő <i>E. coli</i>
FDA (Food and Drug Administration)	Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hivatal
FOSHU (Food for Specified Health Use)	Különleges egészségügyi célú élelmiszer
F6PPK	Fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz
GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue)	Gyomor-bélrendszerhez kapcsolódó nyirok szövet
GLA (gamma-linoleic acid)	Gamma linolsav
GnCl	Guanidin hidroklorid
HDL (High Density Lipoprotein)	Nagy sűrűségű lipoprotein
IBD (Inflammatory Bowel Disease)	Gyulladásos bélbetegség
IBS (Irritable Bowel Disease)	Irritábilis bél szindróma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LDL (Low Density Lipoprotein)	Kis sűrűségű lipoprotein
LTS	Lipoteichoinsav
MIC (Minimal Inhibitory Concentration)	Minimális gátló koncentráció
PYG (Peptone-Yeast-Glucose)	Pepton-élesztőkivonat-glükóz tápleves
RBGR (Relative Bacterial Growth Ratio)	Relatív baktérium növekedési arány
SCFA (short-chain fatty acid)	Rövid szénláncú zsírsav
TGF- β (Transforming Growth Factor)	Transzformáló növekedési factor - béta
Th (T-helper)	T-lymphociták szubpopulációja

Mikroorganizmusok nemzetség neveinek rövidítése

<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Eb.</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Le.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Sa.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>

1 BEVEZETÉS

A gazdasági és a társadalmi fejlődés eredményeként megváltozott értelmet nyert a táplálkozás fogalma. Ma már a táplálkozás nem csupán azt jelenti, hogy szervezetünk számára biztosítsuk a létfontosságú tápanyagokat és energiaforrást, hanem a kínálati piacon válogathatunk az élelmiszerek között megjelenésük, élvezeti és tápértékük alapján is. A XX. század végétől a fejlett gazdasággal rendelkező országokban az élelmezés fő célja az, hogy kiegyensúlyozott tápanyag bevitelt szolgáltatson az anyagcseréhez, megakadályozva az egyes komponensekre nézve a hiány, illetve a káros többlet kialakulásának lehetőségét, ezáltal biztosítva a fogyasztók jó közérzetét. Egyes társadalmi rétegek, mint például a fiatalabb nemzedék és az értelmiségiek gondot fordítanak a táplálék beltartalmi értékére, és kialakulóban van az igény egy egészség tudatosabb táplálkozásra.

Az analitikai módszerek fejlődése lehetővé teszi az élelmiszerek pontos kémiai összetételének meghatározását és az egyes komponensek fiziológiai hatásainak értékelését. A fenti koncepcióból kiindulva alkották meg a funkcionális élelmiszerek fogalmát. A funkcionális élelmiszerek olyan élelmiszerek, amelyek a tápértéken kívül rendelkeznek olyan tulajdonságokkal is, amelyek pozitív élettani hatással rendelkező komponensei révén bizonyítottan pozitív élettani hatást gyakorolnak a szervezetre.

A funkcionális élelmiszerek kutatása és fejlesztése az egyik legdinamikusabban fejlődő területe az élelmiszer-feldolgozásnak. Ahhoz, hogy a mindennapi élelmiszerek csoportján belül e termékek elkülöníthetők legyenek, tudományos érvek szükségesek, amelyek bizonyítják az egészségjavító élettani hatást. E bizonyítékok lehetőséget teremtenek arra vonatkozóan, hogy ezen élelmiszereken feltüntethetők olyan állítások, amelyek tájékoztatják a fogyasztókat az egészségi hatásokról. Az egyik legrégebben fogyasztott funkcionális élelmiszerek a probiotikumokat tartalmazó tejtermékek, amelyek még ma is uralják a probiotikumok piacát. Az élelmiszer nem jelenthet veszélyt a fogyasztóra nézve.

Az élelmiszerbiztonság annak a biztosítása, hogy az elfogyasztott élelmiszer ne okozzon kárt az emberi szervezetben sem rövid, sem hosszú távon, ha azt a fogyasztó a rendeltetési célnak megfelelően készíti el és fogyasztja. Az élelmiszerbiztonságnak ki kell terjedni azon fogyasztói rétegekre is, akik valamilyen táplálkozással összefüggő rendellenességben szenvednek. Számukra is elérhetővé kell tenni a probiotikus termékeket, hogy ne kelljen lemondaniuk a probiotikumok nyújtotta egészségügyi előnyökről. A jövő funkcionális élelmiszerének egyénre szabottnak kell lennie és ki kell, hogy elégítse annak genetikai és biokémiai igényét. Ilyen genetikai eredetű egészségi probléma lehet a tejérzékenység, amelynek oka a laktóz intolerancia, vagy a tejfehérje allergia lehet. E fogyasztói csoportok csak korlátozott mértékben, illetve egyáltalán nem fogyaszthatnak tejet, illetve tejtermékeket.

A fenti motiváció által vezérelve választottam doktori kutatásaim témájaként a nem tejalapú probiotikus termékek előállítási technológiájának fejlesztését, hogy e különleges táplálkozási

igényekkel rendelkező fogyasztói rétegnek se kelljen lemondani a probiotikumok kínálta egészségi előnyökről.

A kidolgozandó technológiához különböző növényi eredetű nyersanyagokat választottam. A technológia fejlesztés számos alap- és alkalmazott kutatási feladat megoldását igényli.

Célkitűzések:

- Bifidobaktérium törzsek fiziológiai tulajdonságainak tanulmányozása
 - Vancomycin és hidrogén-peroxid érzékenységük vizsgálata
 - Rangsorolásuk oxigén toleranciájukra nézve
 - Szénhidrátok hasznosításának feltérképezése
 - Maillard-reakcióból származó vegyületek hatásának értékelése
- Bifidobaktérium törzsek antimikrobás hatásának kimutatása és az ebben szerepet játszó komponensek meghatározása
- Bifidobaktérium törzsek bélhámsejtekhez történő *in vitro* adherenciájának vizsgálata szövettenyészetek alkalmazásával
- Különböző növényi nyersanyagokból előállított levek bifidobaktérium törzsekkel való erjeszhetőségének meghatározása
- Kíméletes előkezelési technológiák összehasonlító elemzése az eredeti mikrobapopuláció csökkentésére
- A laktofermentáció környezeti paramétereinek optimalítása a maximális bifidobaktérium sejtszám elérésére
- Fermentációs technológiák kidolgozása növényi alapú probiotikus termék létrehozásához
- Vegyes kultúras fermentációk lehetőségének vizsgálata bifidobaktérium törzs és tejsavbaktériumok társításával
- Vegyes kultúras fermentációs technológia kidolgozása és léptéknövelése
- A laktofermentációval előállított fermentátum formulázása és tárolási stabilitásának meghatározása

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Funkcionális élelmiszerek

2.1.1 Funkcionális élelmiszerek megjelenése, összetevői

A funkcionális élelmiszer fogalom szülőhazája Japán. Az 1980-as évek elején elsőként indítottak szisztematikus és nagyszabású kutatási programokat ezen élelmiszerek fejlesztése érdekében. Ekkor indult el a funkcionális élelmiszerek máig töretlen, dinamikus fejlődése, míg 1995-ben 7-10 milliárd USA dollár (több, mint a felét a japán piac adta), 2000-ben már több mint 15 milliárd USA dollár volt a becsült értéke világvizonylatban [GIBSON & WILLIAMS, 2000]. A funkcionális élelmiszerek dinamikus növekedését mutatják a 2003-as adatok is, ahol a világ legnagyobb regionális piacait hasonlították össze: Japán 11,7 milliárd USA dollárt, alig lemaradva az amerikai piac 10,5 milliárd USA dollárt, az európai piac pedig ennél valamivel kevesebb piaci értéket ért el. Európa négy meghatározó piacának a részesedése, illetve piaci értéke a következőképpen alakult: Egyesült Királyságban 2,6 milliárd, Németországban 2,4 milliárd, Franciaországban 1,4 milliárd, és Olaszországban 1,2 milliárd USA dollár [BECH-LARSEN & SCHOLDERER, 2007]. Ez évenként a prognosztizált adatok figyelembevételével (2010-re 40-50 milliárd USA dollár piaci értéket becsülnek) 10-15%-os piaci növekedést jelent az élelmiszeripar egyéb területein tapasztalt 2-3%-os évi növekedéssel szemben [VERBEKE, 2005]. A növekvő piac eredményeként, illetve a fogyasztók egyre nagyobb igénye révén a funkcionális élelmiszerek óriási választéka jelent meg az élelmiszeripar különböző területein: üdítőitalok, mint pl. energia és sport italok; gabonaalapú és bébi ételek; sütőipari készítmények; édességek; kenhető krémek, mint pl. vajkrém; tejtermékek elsősorban joghurtok és fermentált tejtermékek; hústermékek. Ezenkívül még az állateledelek, takarmányok piacán is megjelentek a funkcionális komponenseket tartalmazó termékek [GIBSON & WILLIAMS, 2000].

A főbb funkcionális élelmiszer összetevőket az 1. táblázatban mutatom be. E hatások nem mindegyike igazolt klinikai vizsgálatokkal. Ahhoz, hogy humán vizsgálatokban az egészségi hatásokat tudományosan dokumentálják, a következtetéseket széleskörű, randomizált, kettős vak és placebo kontrollált tanulmányok alapján szükséges levonni.

A funkcionális összetevők áttekintése után felmerülhet az a kérdés, hogy egy élelmiszer hogyan tehető, illetve hogyan válhat funkcionálissá. Ennek a módját 1999-ben ROBERFROID fogalmazta meg öt pontban:

- A fogyasztóra káros fiziológiai hatást kifejtő, ismert és azonosított komponensek eltávolítása az élelmiszerből (pl. genetikai módosítással az allergén fehérjék eltávolítása, kis laktóztartalmú, vagy laktózmentes tej előállítása laktózérzékenyek számára).
- Jótékony fiziológiai hatású összetevők koncentrációjának növelése az élelmiszerben, olyan koncentráció szint eléréséig, amellyel a várt hatások elérhetők. Dúsítás történhet nyomelemmel, vitaminnal, rostanyagokkal. Minden esetben figyelembe véve a táplálkozási irányelveket, a beviteli határértékeket.

- Olyan komponensek hozzáadása az élelmiszerhez, amelyek általában nincsenek jelen az élelmiszerben, de jótékony hatásuk bizonyított (pl. antioxidánsok, pre- és probiotikumok alkalmazása).
- Feleslegben bevitt, ezért egészséget károsító hatású tápkomponens jótékony hatású összetevővel (pl. zsírok helyettesíthetők cikória inulinnal) történő helyettesítése.
- Biofelhasználhatósági fok javítása, vagy olyan módosított komponensek alkalmazása, amelyek jótékony hatással vannak szervezetünkre (pl. fitinsav gátló hatásának kiküszöbölése a kalcium felszívódásában) [ROBERFROID, 1999/a].

1. táblázat A funkcionális élelmiszer összetevők főbb osztályai [HOLM, 2003]

Funkcionális élelmiszer összetevők	Példák	Prognosztizált egészségügyi hatás
Probiotikumok	Tejsavbaktériumok Bifidobaktériumok	Javítják a bélrendszer mikroflóráját és működését, szabályozzák a bélműködést, erősítik az immunrendszert, csökkentik a koleszterinszintet, gátolják a bél kórokozóit és csökkentik a rák kialakulásának kockázatát
Prebiotikumok	Oligoszacharidok, rezisztens keményítő, pektinek	Ugyanaz, mint a probiotikumoknál, de fokozzák a Ca és a Mg felszívódását is (csökkentik a csontritkulás kialakulásának veszélyét)
Vitaminok	Folsav, B ₆ , B ₁₂	A kardiovaszkuláris betegségek csökkent kockázata
Ásványi anyagok	Ca, Mg, Zn	Csontritkulás csökkent kockázata Immunrendszer erősítése
Antioxidánsok	Tokol típusú vegyületek (pl. E-vitamin), C-vitamin, karotinoidok, flavonoidok, polifenolok	Csökkentik az érlemezsedés kockázatát, gátolják a rák kialakulását, mérséklék a DNS oxidatív károsodását, késleltetik az öregedést, gyulladásgátlók
Fehérjék, peptidek, aminosavak	Tripeptidek a tejfehérjékből	Csökkentik a vérnyomást és befolyásolhatják a fizikai funkciókat
Zsírsavak	Omega-3 zsírsavak, CLA (konjugált linolsav), GLA (gamma-linolsav)	Csökkentik a cardiovascularis betegségek kockázatát, mérsékelik az ízületi gyulladás tüneteit, a klimaxos problémákat, redukálják a rák kockázatát
Fitokemikáliák (növényi eredetű vegyületek)	Fitoszterinek, béta-glükán, izoflavonok, lignanok	Csökkentik a szérum koleszterint, szabályozhatják a hormon-függő betegségeket és a hőhullámokat

2.1.2 Funkcionális élelmiszerek törvényi szabályozása

A funkcionális élelmiszerek fejlesztését, rendszerező analizisét, továbbá fiziológiai szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatát (molekuláris szinten is) a japán kormány kutatási programok keretében komolyan támogatta abból a célból, hogy az egészségügyi gondoskodás költségei csökkenjenek. Hosszú döntési folyamat eredményeként létrehozták a kiemelkedő

hasznossággal/előnyvel rendelkező élelmiszerkategóriát a FOSHU-t (foods for specified health use), amely pontosan meghatározta azon élelmiszerek körét, amelyek e kategóriába sorolhatók [SANDERS, 1998]. A FOSHU termékekkel kapcsolatos elvárásokat a japán élelmiszertörvény fogalmazta meg, mely szerint: az élelmiszernek bizonyított egészségügyi és fiziológiai hatással kell rendelkeznie, illetve e hatásoknak meg kell nyilvánulnia. Meg kell határozni a hatásért felelős komponensek fizikai és kémiai tulajdonságait. Továbbá a hatóanyagoknak természetes eredetűnek kell lennie, hogy az élelmiszert a normális étrend részeként lehessen fogyasztani [ROBERFROID, 2000].

Funkcionális élelmiszer, úgy ahogy Japánban ismert nem létezik sem az Amerikai Egyesült Államokban sem Európában, mert nincs pontos törvényi szabályozás speciálisan ezekre a termékekre. Az Amerikai Egyesült Államokban az élelmiszeripari termékekkel foglalkozó szerv (Food and Drug Administration (FDA)) négy élelmiszerkategóriát alakított ki: (1) hagyományos (konvencionális) élelmiszerek, a legnagyobb kategóriát alkotja, mindent magába foglal, amit a másik három kategória nem; (2) speciális étrendnél használt élelmiszerek; (3) gyógyélelmiszerek (medical foods); (4) étrendkiegészítők. Azt, hogy a funkcionális élelmiszer mely kategóriába tartozik, elsősorban az határozza meg, hogy milyen célra használják. BERNER és O'DONNELL szerint (1998) a funkcionális élelmiszereket az előbb említett kategóriák mindegyikébe be lehet sorolni. Az ilyen termékeket előállító cég a gyógyélelmiszer kategóriába helyezi el a saját készítményeit, ugyanis ezekre nézve nem kötelező a táplálkozási érték jelölése. Ugyanakkor ezen élelmiszerek fogyasztása csak orvosi felügyelet mellett történhet.

Ezzel szemben Európában már különbséget tettek a gyógyhatású termékek és a különleges táplálkozási célra használt élelmiszerek között. Az Európai Unióban a funkcionális élelmiszerek azok, amelyek egészségjavító hatással rendelkeznek és a forgalomba hozatalukat az élelmiszerjelölésre vonatkozó rendeletek (79/112/EEC) szabályozzák [STANTON *et al.*, 2001; EC DIRECTIVE, 1978]. Európában azoknak a cégeknek, amelyek funkcionális élelmiszert kívánnak bevezetni, különféle törvényi előírásokat kell figyelembe venniük, amik a termék engedélyezését, a címkén szükséges táplálkozási információkat és a termékkel kapcsolatban megengedett funkcionális és egészségügyi állításokat szabályozzák. Mindezt gyakran úgy, hogy az EU tagállamokban nem összeegyeztethetőek a szabályozások, mivel más-más egészségügyi célokat fogalmaztak meg a tagországok. Az első szabályozás, amit 2000-ben alkotott az Európai Parlament és az Európa Tanács megtiltotta, hogy az élelmiszerhez megelőző, illetve humán betegséget kezelő és gyógyító tulajdonságokat társítsanak a termékkel kapcsolatos ismertetőkből. Hosszas egyeztetéseket követően 2003. július 16-án az Európai Bizottság előterjesztette a COM/2003/0424 számú rendelkezést azokról a táplálkozási és egészségügyi állításokról, amelyek élelmiszereken, köztük étrendi kiegészítőknél szerepelhetnek [COMMISSION of the EC, 2003]. A rendelkezés végső változatát 2006. december 20 -án fogadták el. A rendelkezés fő elvei világosak. Az első egy jóváhagyott egészségügyi hatásokat tartalmazó követelmény lista, melynek végső változatát az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság fogja nyilvánosságra hozni, a rendelkezés elfogadását követő három éven belül. Megkülönböztetést tesznek majd azon egészséggel kapcsolatos állítások, amelyekre már elégséges és vitathatatlan tudományos

bizonyítékok vannak és azon újszerű állítások között, amelyekre jelenleg még nincsenek ilyen megállapítások. Ez utóbbiak esetében egyedi tudományos értékelésre és értékesítés előtti jóváhagyásra lesz szükség. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóságnak értékelnie kell minden ilyen állítást és csak azok engedélyezhetők EU szinten, amelyek igazolhatók. A második elv, hogy bizonyos típusú egészséggel kapcsolatos állítások egyáltalán nem megengedettek a termékről szóló közlésekben. Ez vonatkozik minden olyan állításra, ami nem pontos és közérthető, vagy tudományosan nem igazolható. Néhány élelmiszer esetében – azok táplálkozás-tani profilja okán – nem tehető majd semmilyen egészséggel kapcsolatos állítás. A Hatóság ezen élelmiszerek listáját a rendelkezés elfogadását követő 24 hónapon belül teszi majd közzé [BECH-LARSEN & SCHOLDERER, 2007].

2.1.3 Funkcionális élelmiszerek fogyasztói elfogadottsága és megítélése

Noha a fogyasztói elfogadottságot rendszerint döntő tényezőként említik a funkcionális élelmiszerek sikeres forgalmazásával kapcsolatban, mégis meglepően kevés kutatás készült ebben a témában. Központi kérdésük e kutatásoknak a fogyasztók általános egészségügyi beállítottsága, ami az életkor és a nem függvénye. A nők kissé egészségtudatosabbak, mint a férfiak, míg a középkorúak és idősebbek lényegesen egészségtudatosabbak, mint a fiatalok [MENRAD, 2003; VERBEKE, 2005; URALA & LÄHTEENMÄKI, 2007]. A többváltozós elemzések az alábbiakat mutatták ki:

1. A nők egészséggel kapcsolatos nagyobb tudatossága mögött az áll, hogy felelősséget éreznek családtagjaik jóléte iránt, ami kapcsolódik a nők domináns szerepéhez, mint fő élelmiszer beszerzők. Továbbá, a középkorú és idősebb fogyasztók egészségtudatosabbak, mert náluk vagy a közvetlen társadalmi környezetükben élőknel már nagyobb eséllyel állapítottak meg életmódból adódó betegséget, mint a fiatalabbaknál. Ez a helyzet segít kiküszöbölni az „optimista előítéletnek” nevezett jelenséget, ami azt jelenti, hogy az emberek általában hajlamosak azt gondolni, hogy ezek a betegségek csak másokat érintenek, őket nem.
2. A fogyasztók jobban elfogadják azokat a funkcionális összetevőket, amelyekről jól megalapozott és széles körben elfogadott egészséget szolgáló kép(zet)ük van, mint olyanokat, amik szokatlanok számukra, illetve csak orvosi vagy táplálkozás-tani ismeretekkel rendelkezők számára ismertek. Sokkal könnyebb fogyasztókkal elfogadtatni olyan funkcionális élelmiszereket, amikről tudják, hogy számukra hasznos vegyületet tartalmaz (pl. kalcium, C vitamin vagy omega-3 zsírsav), mint egy olyat, ami a közvélemény számára szinte teljesen ismeretlen komponest hordoz (pl. szelén vagy xilit).
3. A fogyasztók nem mindig érzékelik az élelmiszer-matrix és a funkcionális összetevő közötti kapcsolat jelentőségét. A fő oka ennek az, hogy a fogyasztó mellékszere számát, ha egy élelmiszer olyan összetevővel van dúsítva, ami a hordozó élelmiszerral nem összeegyeztethető érzékszervi várakozást sugall. Például, ha egy gyümölcsjoghurt halolajból kivont omega-3 zsírsavval van dúsítva [LUCKOW & DELAHUNTY, 2004]. Ez hozzáadódik ahhoz az általános megfigyeléshez, hogy csak nagyon kevés fogyasztó

lenne hajlandó olyan funkcionális élelmiszert venni, aminek az íze rosszabb, mint a nem-funkcionális megfelelőjé. Általában a fogyasztó a funkcionális élelmiszert elsősorban, mint élelmiszert értékeli. A jótékony (funkcionális) hatás lehet, hogy hozzáadott értéket képvisel, de másodlagos szempont az élelmiszer érzékszervi tulajdonságai mögött.

2.2 Probiotikumok

Az élő baktériumok ember által történő fogyasztásáról az első feljegyzés több mint 2000 éves. Ennek ellenére a probiotikumokkal kapcsolatos tudományos alapokat első ízben csak a 20. század elején a Pasteur Intézetben munkálkodó Metchnikoff fogalmazta meg [RASTALL *et al.*, 2000]. Metchnikoff a kaukázusi pásztorok hosszú átlagéletkorát összefüggésbe hozta az általuk nagy mennyiségben és rendszeresen fogyasztott joghurttal (savanyú tejjel). Azt a hipotézist állította fel, hogy a normál bélflóra képes kedvezőtlen hatásokat kifejteni a gazdaszervezetre, viszont a „savanyú tej” fogyasztásával e hatások megakadályozhatók. Megállapította, hogy a joghurt tejsavbaktériumai gátolják a káros rothasztó, toxintermelő bélbaktériumok tevékenységét és ezzel hozzájárulnak az egészségmegőrzéshez és a jó közérzet biztosításához.

A probiotikum szó a görög „életért” kifejezésből származik. A probiotikum kifejezést először LILLY és STILLWELL használta 1965-ben, de egy kissé más értelemben: „A probiotikum egy olyan mikroorganizmus, mely serkenti más mikroorganizmusok növekedését”. PARKER szerint (1974) : „A probiotikumok mikroorganizmusok és azok alkotórészei, melyek hozzájárulnak a bél kedvező mikrobiális egyensúlyának kialakításához”. FULLER (1989) kiegészítette ezt a definíciót: „A probiotikumok élő mikrobiális élelmiszer összetevők, melyek jótékony hatással vannak a gazdaszervezetre azáltal, hogy javítják a bél mikrobiális egyensúlyát”. Egyes kutatók [SALMINEN, 1996; SCHAAFSMA, 1996] tovább bővítették a definíciót és végső jelentését GOMES és MALCATA fogalmazták meg 1999-ben: „Élő mikrobiális élelmiszer alkotórészek, melyek jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségi állapotára”.

A probiotikumok túlnyomó többsége természetes tagjai a bélmikrobiotának. Minden egészséges felnőtt ember 1-2 kg aktív mikrobatömeget hord a testében. Ebből következik, hogy a bélmikrobiota összetétele jelentős hatást gyakorol az emberi szervezet egészségi állapotára. Mielőtt a probiotikumok által kifejtett hatásokat részletezném, a bélrendszer szervezetben betöltött szerepét, funkcióit mutatom be.

2.2.1 A bélmikrobióta összetétele

A gyomor-bélrendszer mikro-életkönyezete körülbelül 10^{14} baktériumsejtet tartalmaz, amelyek körülbelül 30 nemzetség mintegy 400-500 fajához tartoznak és nagyon komplex ökológiai rendszert alkotnak [NAGY, 1998].

Az emésztőcsatorna különböző részein a mikrobióta összetétele eltérő. A gyomorban a baktériumok száma 10^3 sejt/g, a vékonybélben 10^4 - 10^6 sejt/g és ez a vastagbélben több mint 10^{11} - 10^{12} sejt/g-ra nő. A vastagbél baktérium populációja jelentősen eltér a vékonybélben találhatóától. Az anaerob baktériumok száma 10-1000-szer több mint az aeroboké vagy fakultatív aeroboké. A vastagbél mikrobiotáját a felső szakaszban túlnyomóan fakultatív anaerobok alkotják

(*Enterobacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* fajok), de az alsó szakaszt szigorúan anaerobok uralják (pl: *Bacteroides*-ek, *Bifidobacterium*-ok, *Eubacterium*-ok, *Peptococcus*-ok, *Fusobacterium*-ok és *Clostridium*-ok) [SALMINEN *et al.*, 1998/c].

Az élet folyamán azonban a bélmikrobiota összetétele jelentősen változik. A gyomor-bélrendszer születéskor steril, majd ezután megindul a baktériumok kolonizációja. A megtelepedő baktériumok összetétele függ a szülés és a táplálás módjától, illetve egyéb környezeti tényezőktől (fejlett vagy fejlődő ország, kórterem stb.). Az újszülött bélcsatornájában először fakultatív anaerob mikroorganizmusok (*Escherichia coli* és a *Streptococcus*-ok) telepednek meg, amelyek elsődlegesen az anya vaginális fekális mikrobiotájából származnak. Ezek az úttörő szervezetek kialakítják a számukra kedvező életkörülményeket, miközben a környezet anaerobbá válik és megjelennek az anaerob tulajdonsággal rendelkező baktériumok. Az így kolonizálódó baktérium fajokat elsősorban a csecsemő táplálási módja határozza meg. A szoptatott csecsemőknél a bifidobaktériumok vannak túlsúlyban, míg a tápszerrrel táplált csecsemők sokkal összetettebb bélmikrobiotával rendelkeznek (*Clostridium*-ok, *Bacteroides*-ek, *Bifidobacterium*-ok és *Streptococcus*-ok). Az életkor előrehaladtával a mikrobiota változáson megy át, amelynek következményeként a *Bifidobacterium*-ok száma csökken, a *Lactobacillus*-ok, *Enterococcus*-ok, enterobaktériumok, *Clostridium*-ok száma pedig nő [FRANKS *et al.*, 1998; PERDIGÓN *et al.*, 2003].

Kutatások szerint egy-egy egyénben a vastagbél mikrobiotájának összetétele állandó annak ellenére, hogy új fajok és baktériumok kerülnek a bélcsatornába. A bélrendszer biotáját ökológiai törvények is szabályozzák.

2.2.2 A bélmikrobiota fő funkciói

2.2.2.1 Metabolizmus

A bélmikrobiota anyagcserével kapcsolatos feladata a nem-emészthető táplálék összetevők és a hámréteg által termelt endogén nyálka lebontása. A mikrobiológiai közösség változatossága anyagcsere tevékenysége révén lehetőséget ad a különböző biokémiai folyamatok megvalósulására. Ennek eredményeként a felszabaduló energiát és az abszorbeálható anyagokat egyrészt a gazdaszervezet veszi fel, másrészt a baktériumok hasznosítják. A vastagbélben a mikrobiológiai tevékenység fő energiaforrását a nem-emészthető szénhidrátok – a poliszacharidok széles köre (rezisztens keményítő, cellulóz, hemicellulóz, pektin, növényi gumik), az oligoszacharidok, a nem abszorbeálódott cukrok – valamint a cukoralkoholok szolgáltatják. Az anyagcsere utak végső termékeiként a rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) (elsősorban acetát, propionát, butirát) képződnek [CUMMINGS & ENGLYST, 1987].

A peptidek és a fehérjék metabolizmusa során szintén termelődnek rövid szénláncú zsírsavak. Ezzel egy időben azonban toxikus anyagok is szintetizálódnak, mint például ammónia, aminok, tiolok és indolok [MACFARLANE *et al.*, 1986].

A vakbélben és a jobboldali (proximalis) vastagbélben a fermentáció nagyon intenzív és ezzel együtt nagyobb mennyiségben keletkeznek rövid szénláncú zsírsavak, ezért itt a pH enyhén savas

(pH= 5-6) és gyors baktérium szaporodás jellemző. Ezzel ellentétben a baloldali (distalis) vastagbélben a képződő szubsztrátok koncentrációja kicsi, semleges pH uralkodik, rothasztó-bomlasztó anyagcsere és gyenge baktérium szaporodás figyelhető meg [FOOKS *et al.*, 1999].

A bél mikroorganizmusai részt vesznek a vitaminok szintézisében és a kalcium, magnézium, vas abszorpciójában is. A vakbélben történő ionabszorpciót a szénhidrátok fermentációja és a rövid szénláncú zsírsavak (különösen ecetsav, propionsav és vajsav) képződése javítja. A rövidszénláncú zsírsavak fontos szerepet töltenek be a gazdaszervezet fiziológiájában. A vajsav a telepképződéshez szükséges energia fő forrása a bélben. Az ecetsavat és a propionsavat a vérkapuban találjuk, és végül a máj vagy a perifériás szövetek és részben az izom metabolizálja. Az ecetsavnak és a propionsavnak a glükóz anyagcsere szabályozásában is szerepe lehet (glükogenezis): ezeknek a rövid szénláncú zsírsavaknak az abszorpciója révén kisebb vércukorszint jöhet létre a glükóz fogyasztást vagy étkezést követően. Ez a biokémiai válasz hasonló az inzulin hatására bekövetkező vércukorszint csökkenéshez [CUMMINGS *et al.*, 1987].

2.2.2.2 Sejtszabályozás

Hámsejtek szaporodása és differenciálódása

A jelenlévő mikroorganizmusok nagymértékben befolyásolják a hámsejtek differenciálódását. Ebben a folyamatban talán a rövid szénláncú zsírsavaknak van a legfontosabb szerepük. Mind a három már említett rövid szénláncú zsírsav fokozza a hámsejtek szaporodását és differenciálódását mind a vastag mind a vékonybélben *in vivo* körülmények között. Mindemellett a vajsav *in vitro* esetben gátolja a sejtek szaporodását és stimulálja azoknak a sejteknek a differenciálódását, amelyek daganatos eredetűek, azaz támogatja a sejtek kórosból nem-kóros fenotípussá történő átalakulását [FRANKEL *et al.*, 1994].

Kölcsönhatás a bélbaktériumok és a gazdaszervezet immunrendszere között

A bélnyálkahártya a fő érintkezési felület az immunrendszer és a külső környezet között. A bélrendszerrel kapcsolódó nyirokszövetek tartalmazzák az immunkompetens sejtek legszélesebb körét az emberi testben. A gazdaszervezet és a baktériumok közötti kölcsönhatás, amely a nyálkahártya felületén alakul ki, jelentősen hozzájárul az immunrendszer fejlődéséhez. Csíramentes környezetben nevelt állatoknál a nyálkahártya limfoid sejtjeinek mennyisége és a vérkeringésben lévő immunglobulinok koncentrációja kicsi, a tüsző struktúra szegényes. Közvetlenül a belső mikrobiota kifejlődése után a hámrétegen belüli limfociták száma nagymértékben megnő, az immunglobulint termelő sejtek keletkezése mind a tüszőben, mind a lamina propriában (nyálkahártya kötőszöveti réteg) felgyorsul és ezzel együtt a vér immunglobulin tartalma is megnövekedik [UMESAKI *et al.*, 1993].

A mikrobákkal szembeni immunválasz lehet öröklött vagy szerzett tulajdonság. Nemcsak a fehérvérsejtek, mint a neutrofilok és makrofágok, amelyek képesek fagocitálni és elpusztítani a patogéneket, közvetítenek öröklött immunreakciókat, hanem a bélrendszer hámsejtjei is. E sejtek a mediátorok széles spektrumának szintézisével koordinálják a gazdaszervezet reakcióit, és jelzéseket adnak a hámrétegen lévő alapsejteknek. Az öröklött immunrendszernek meg kell különböztetni a potenciális patogéneket és a jótékony baktériumokat, a már meglévő korlátozott számú receptorok által. Ha például nem patogén baktériumokat gyulladásban lévő nyálkahártyán

inkubáljuk, akkor azonnali citokin válaszreakciók képződnek, amelyek jelzések formájában eljutnak az alapszövethez és a lamina propria limfociták fenotípusában változásokat idéznek elő [GUARNER & MALAGELADA, 2003].

2.2.2.3 Védőmechanizmus

A bélrendszerben megtelepedett baktériumok feladata, hogy megakadályozzák egyrészt az exogén mikrobák megtelepedését, másrészt a patogének szövetekbe történő betörését. A jelenlévő baktériumok közötti egyensúly megfelelő stabilitást nyújt hasonló egyedekből álló mikroba populációkban normális körülmények között. Antibiotikus terápia hatására ez az ökológiai egyensúly megbomlik és olyan fajok is elszaporodhatnak, amelyek esetlegesen potenciális kórokozó képességgel rendelkeznek (pl. *Clostridium difficile*) [LEE *et al.*, 2003].

A baktériumok versengenek a különböző tápanyagokért és küzdenek az ökológiai helyük fenntartása érdekében. A gazdaszervezet annyi tápanyagot szolgáltat, amennyire a baktériumoknak szüksége van, és amelyről a baktériumok visszajelzést adnak. Ez a szimbiózis megakadályozza a tápkomponensek túltermelését, amely más versengő, esetleg patogén mikrobák megtelepedését elősegítheti. Azok a baktériumok, amelyek antimikrobás anyagokat, ún. bakteriocineket termelnek, gátolhatják a velük versengő mikrobák élettevékenységét [SERVIN & COCONNIER, 2003].

2.2.3 Probiotikumok szerepe és kritériumai

A probiotikus tulajdonsággal rendelkező mikroorganizmusok fogyasztásával lehetőség nyílik a bélmikrobiota aktivitásának serkentésére, ezáltal az immunrendszer erősítésére. A probiotikumok számos jótékony fiziológiai hatással rendelkeznek: a laktóz intolerancia enyhítése, a fertőzésekkel szembeni ellenálló képesség elősegítése, az immunrendszer funkcióinak stimulálása, a szérum koleszterin szint csökkentése, a rákos megbetegedéseket indukáló fekáli enzimek aktivitásának csökkentése. A legtöbb probiotikus mikroorganizmus a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* nemzetségből származik, de a *Saccharomyces*, a *Lactococcus*, az *Enterococcus* és a *Streptococcus* nemzetségen belül is vannak probiotikus tulajdonsággal rendelkező fajok [SAARELA *et al.*, 2002/a; ISOLAURI *et al.*, 2004].

Ahhoz, hogy egy mikroorganizmus megkapja a probiotikus státuszt, számos kritériumnak kell megfelelnie, amelyek elméleti alapja három pontban foglalható össze.

2.2.3.1 Biztonság

A biztonság elsődleges fontosságú tényezőként jelentkezik a probiotikus tulajdonsággal rendelkező törzsek alkalmazásakor. Az emberi fogyasztásra szánt törzsek esetén preferálják, hogy humán eredetűek legyenek és egészséges humán béltraktusból izolálják őket. A humán eredet jelentőségét az utóbbi években már vitatják, mert több olyan forgalomban lévő, sikeresen alkalmazott törzs van (pl. *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Lactobacillus salivarius* CPM-7), amelyről nem bizonyítható, vagy nem rendelkezik humán eredettel [DE VUYST *et al.*, 2004]. Fontos kritérium, hogy a korábbi nyilvántartásokban sem szerepelt patogén tulajdonságokkal rendelkező törzsként (nem hordoz virulencia faktorokat), betegségekkel kapcsolatosan nem

merült fel a szerepe, illetve immundeficiens szervezetben sem viselkedett patogénként. A *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek okozta fertőzések száma nagyon ritka és szerepüket a szívbelhártya-gyulladás és bacteriaemia kialakulásában csupán 0,05-0,4 százalékra becsülik [SAXELIN *et al.*, 1996; BORRIELLO *et al.*, 2003]. Például Finnországban, ahol a probiotikus termékek fogyasztása jelentős, felmérést készítettek, hogy négy éves periódus alatt hogyan változott a bacteriaemias esetek száma. Azt tapasztalták, hogy a laktobacillusok okozta fertőzések száma állandó szinten mozog, 10-20 eset évenként, amely a négy évre levetítve 0,2%-os előfordulást jelent. Laktobacillusokkal (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*) és a bifidobaktériumokkal (*Bifidobacterium dentium*) összeköthető fertőzések kialakulásának hátterében legtöbbször legyengült szervezet és súlyos betegségek állnak. Például Husni és munkatársai 45 páciens bevonásával megfigyelték, hogy az esetek 40%-nál rák, 38%-nál friss műtét és 27%-nál diabetes mellitus állt a háttérben [SALMINEN *et al.*, 1998/b; SAARELA *et al.*, 2002/b]. Nincs publikált bizonyíték arra, hogy a probiotikumok fogyasztása, amelyek *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzseket tartalmaztak, növelték a fertőzések kialakulásának veszélyét a nem tökéletesen működő immunrendszerű pácienseknél. Ezzel kapcsolatban klinikai kísérletekben is vizsgálták a probiotikumok biztonságát olyan egyéneknél, akik valamilyen immunrendszeri betegségben (pl. HIV fertőzésben) szenvednek és azt állapították meg, hogy e csoportok számára is biztonságos a probiotikumok fogyasztása [WAGNER & BALISH, 1998; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2000; ISHIBASHI & YAMAZAKI, 2001]. BORRIELLO és munkatársai (2003) szerint az elfogyasztott probiotikus laktobacillusok és bifidobaktériumok nem jelentenek nagyobb fertőzési veszélyt, mint maguk a kommenzalista törzsek az emberi bélrendszerben. Egyéb potenciális veszélyfaktorokat is megfogalmaztak a probiotikus baktériumokra nézve. Így elvárás, hogy ne okozzanak D-tejsav acidózist a vékonybélben, amely szénhidrát felszívódási zavarokat okozhat; ne legyen hialuronidáz és zselatináz aktivitásuk, amelyek az extracelluláris mátrix fehérjéket károsítják (ilyen aktivitást nem tapasztaltak laktobacillusoknál és bifidobaktériumoknál); ne fejtsenek ki túlzott nyálka (mucus) lebontást; ne legyen vagy csekély legyen a biogén amin termelésük; ne hozzanak létre másodlagos epesavakat, amelyek nagyobb hidrofóbicitással rendelkeznek, mint az elsődleges epesavak és toxikusak a májsejtekre, a gyomorra és a bél nyálkahártyára (kevés információ létezik arról, hogy a laktobacillusok és a bifidobaktériumok rendelkeznek 7 α -dehidroxiláz aktivitással, amely előidézi a másodlagos epesavak termelődését); ne hordozzanak átadható antibiotikum rezisztencia géneket, nehogy az átvegyék a potenciális patogénekre [OUWEHAND & SALMINEN, 2003].

A probiotikusnak vélt törzseknek a probiotikus tulajdonságaikat, illetve metabolikus aktivitásukat a laboratóriumi (*in vitro*) és az állatkísérletek mellett klinikai vizsgálatokkal is igazolni kell.

2.2.3.2 Funkcionális tulajdonságok

(1) Alapvető tulajdonságnak tekintik a túlélőképességet, vagyis a testfolyadékokkal, a gyomorsavval, az epesavval és az emésztőenzimekkel szembeni fokozott ellenállóképességet, hogy minél nagyobb számú életképes probiotikus baktérium érje el az intesztinális szakaszt.

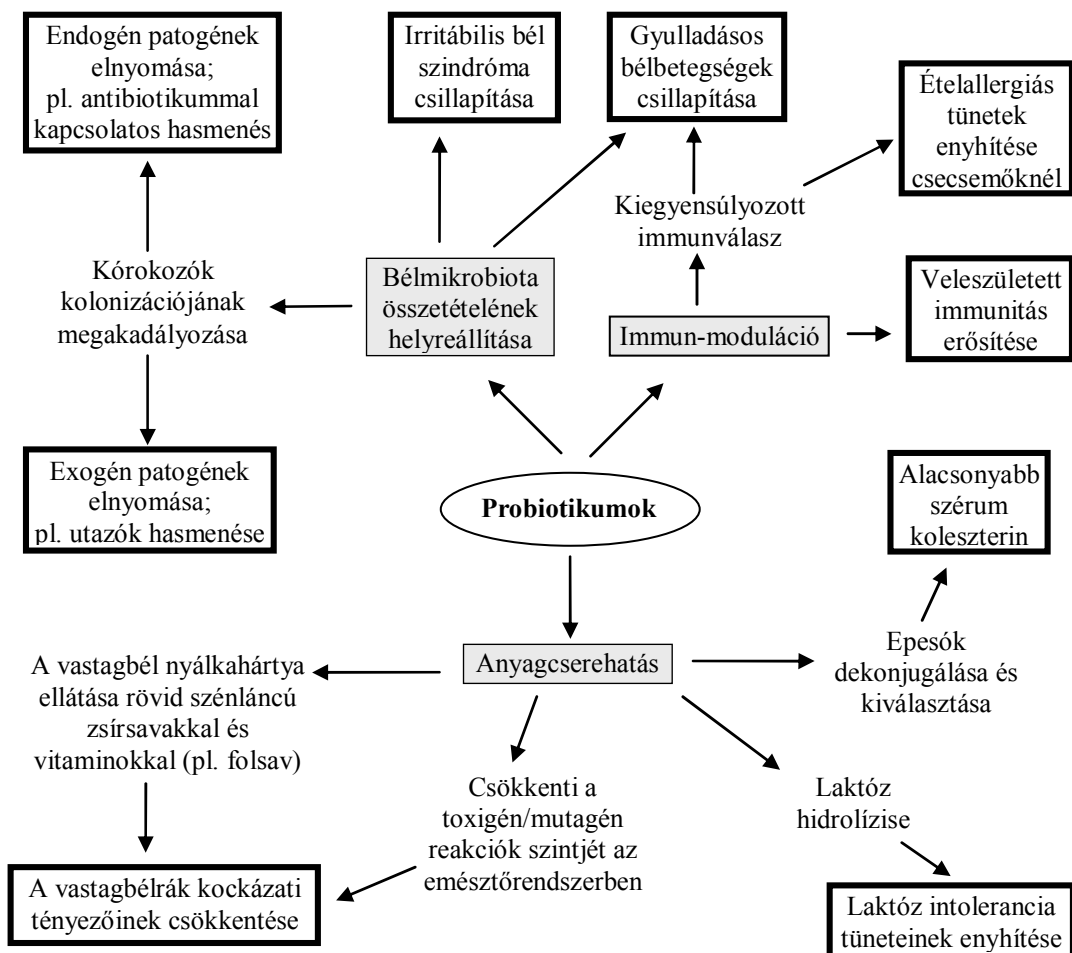
OUWEHAND és SALMINEN (1998) szerint viszont van néhány megfigyelés, hogy a nem élő probiotikumok is kiválthatnak jótékony egészségi hatásokat. STEWART-TULL (1980) a sejtfalat alkotó peptidoglikánnak erőteljes immunstimuláló hatást tulajdonít. (2) Tapadó és kolonizációs képesség szerepe. Hasonlóan a humán eredethez, e képességek elsősorban az emberi bélrendszerben történő kolonizáció fontosságát szintén vitatják. Ezzel szemben számos kutató a probiotikus törzsek humán bélsejtekhez történő tapadását és az azt követő kolonizációt a probiotikus hatás kifejeződés előfeltételének tartják. A bélnyálkahártyán való megtapadással ugyanis lehetővé válik a törzs számára, hogy a béltraktus lakója legyen, az intesztinális körülmények között szaporodjon és anyagcserét folytasson. Tapadás révén kölcsönhatás alakul ki a nyálkahártya felszínével és a GALT (gut associated lymphoid tissue) rendszerrel, ezáltal a megtapadt probiotikum képes modulálni az immunrendszert és helyreállítani a nyálkahártya védőgát funkcióját [TUOMOLA & SALMINEN, 1998; SERVIN & COCONNIER, 2003]. Mindamellett megállapították, hogy a legtöbb alkalmazott probiotikus törzs képes legalább ideiglenesen megkötődni a bélrendszerben [ALANDER *et al.*, 1997]. (3) Az előző funkcióhoz csatlakozva, fontos tulajdonságként említik az immunrendszer védelmi funkciójának erősítését. (4) Ahhoz, hogy a probiotikumok hatással legyenek a bélmikrobiota összetételére, alapvető elvárás, hogy e törzsek antagonistá aktivitást mutassanak a patogén baktériumokkal (pl. *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium*) szemben antimikrobás anyagok (pl. SCFA, hidrogén-peroxid, bakteriocin) és/vagy versengés útján történő kirekesztés révén [SERVIN & COCONNIER, 2003]. (5) Ezek mellett még kritériumként adják meg az antigenotoxikus aktivitást, a karcinogén anyagok képzéséért felelős enzimek termelésének visszaszorítását.

2.2.3.3 Technológiai szempontok

Az itt megfogalmazott elvárások elsősorban a gyártók számára kívánatos tulajdonságokat összegzik: (1) megfelelő szaporodóképesség az adott tápközegben; (2) a probiotikumok a fogyasztó igényeit kielégítő érzékszervi tulajdonságot kölcsönözzenek a terméknek; (3) életképesség megőrzése mind a gyártási, mind a tárolási folyamat során; (4) fágrezisztencia; (5) genetikai stabilitás az élelmiszer-feldolgozás körülményei között [SAARELA *et al.*, 2000; HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; GRAJEK *et al.*, 2005].

2.2.4 Probiotikumok jótékony élettani hatásai

Elégséges bizonyíték áll rendelkezésre, ami azt a nézetet támogatja, hogy a *Lactobacillus*-ok és a *Bifidobacterium*-ok fogyasztása képes visszaállítani a bél mikrobiális populációjának normális egyensúlyát, ezáltal a szervezet immunrendszerét befolyásolni. A probiotikus baktériumok jótékony hatásai (1. ábra) törzshöz kötődnek és nem faj vagy nemzetség specifikusak. Fontos megjegyezni, hogy önmagában egy törzs nem tudja az összes jótékony hatást nyújtani, és egy bizonyos fajnak sem képes erre minden törzse [SHAH, 2007].



1. ábra Probiotikumok szervezetre kifejtett kedvező hatásai [SAARELA *et al.*, 2002/a]

2.2.4.1 Laktóz intolerancia enyhítése

A probiotikus mikroorganizmusok azon tulajdonsága, hogy a laktóz felszívódási zavarait enyhíti, a legszélesebb körben elfogadott jótékony egészségi hatás. A világ felnőtt lakosságának kb. 2/3-a szenved laktóz intoleranciában, ez főleg Ázsia és Afrika lakóit érinti, Európában csupán 2%-ra tehető az érintettek száma [TUOHY *et al.*, 2003]. A laktáz enzim hiánya vagy elégtelen működési aktivitása miatt a laktóz intoleranciás egyéneknél a laktóz nem bontódik le glükózzá és galaktózzá, ezért tejfogyasztás után hasmenés és diszkomfort érzés (felfúvódás, hányinger) alakul ki. MARTEAU és munkatársai (1990) megfigyelték, hogy a laktóz érzékenyek jobban tolerálják a laktózt a joghurtban, mint ugyanannyi mennyiségű laktózt a tejben. Ezt egyrészt a probiotikus baktériumok β -D-galaktozidáz aktivitásának (az epesavak hatására lizált sejtekből származó β -D-galaktozidáz is hatással van), másrészt a bélmikrobiota megfelelő módosulásának, harmadrészt pedig a tranzit idő lecsökkenésének tulajdonították. JIANG és munkatársai (1996) a *Bifidobacterium longum* törzs laktóz intolerancia enyhítésében kifejtett pozitív hatásáról számoltak be.

2.2.4.2 Koleszterinszint csökkentése

A magas koleszterinszint kapcsolatban áll a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának megnövekedett kockázatával. Egyesek szerint igen, mások szerint nem képesek a probiotikus baktériumok a koleszterin asszimilálására [LOVEGROVE & JACKSON, 2000]. A szérumban a koleszterinszint csökkenéséhez az epesók dekonjugálása vezet. A dekonjugációs reakció felszabadítja a molekula aminosav részét és a dekonjugált epesav ennek következtében csökkenti a koleszterin újrafelszívódását azáltal, hogy megnöveli a széklettel történő kiválasztódását. Számos *in vitro* tanulmányban vizsgálták a különböző probiotikumok epesav dekonjugáló képességét. GRILL és munkatársai (1995) vizsgálataikban *B. longum* törzsszel kapcsolatosan kapták a legnagyobb dekonjugációs képességet, más vizsgálatok pedig a *Lactobacillus* fajoknak tulajdonítanak ilyen képességeket. KLAVER és VAN DER MEER (1993) szerint a koleszterin eltűnése abból a táptalajból, amiben laktobacillusok és bifidobaktériumok szaporodtak, nem az asszimiláció, hanem a bakteriális epesav dekonjugáz aktivitása miatt történt. TAHRI és munkatársai (1995) viszont nem értettek egyet ezzel az eredménnyel, mivel az eltávolított koleszterin egy részét megtalálták a sejtkivonatban és ennek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a koleszterin asszimiláció és az epesav dekonjugáz aktivitás megnyilvánulása szimultán történhet. Mások szerint a baktérium képes a sejtfalán megkötni a koleszterint [HOSONA & TONO-OKA, 1995]. *In vivo* eredményeket is találtam az irodalomban. TARANTO és társai (1998) állat kísérletben vizsgálták, hogy a probiotikum milyen hatást gyakorol a vér koleszterinszintjére. A vizsgálathoz *Lactobacillus reuteri* törzset használtak, mely a hiperkoleszterolémiás egérben 7 nap alatt a teljes koleszterin szintet 38%-kal, a trigliceridek mennyiségét 40%-kal csökkentette és a HDL:LDL arányt 20%-kal növelte. HOMMA kísérleteiből (1988) kiderül, hogy 10^9 élő sejt/g tartalmú fermentált tejtermék fogyasztásától a koleszterinszint 3 g/L-ről 1,5 g/L-re csökken.

2.2.4.3 Hasmenés elleni hatékonyság

Az antibiotikumok okozta hasmenés terápiájában, amelyet gyakran a béltraktusban honos *Cl. difficile* megnövekedett sejtszáma okoz, jelentős szerepe van a probiotikumoknak. ISOLAURI és munkatársai (2004) kedvező hatásáról számoltak be a *Clostridium* okozta hasmenés kezelésében.

A rotavírus az egyik leggyakoribb okozója a gyermekkori akut hasmenéseknek. Probiotikumok fogyasztásával csökkenthető a hasmenés gyakorisága. Megfigyelték, hogy a *Bifidobacterium bifidum* és *Streptococcus thermophilus* kúra hatására a rotavírus okozta hasmenés időtartama lerövidült [SAAVEDRA *et al.*, 1994]. Hasonló hatást tapasztaltak *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* és *Lb. reuteri* keverék kultúra fogyasztása során. Ismert tény az is, hogy az anyatejjel táplált csecsemők esetében kevesebb a hasmenés előfordulása, mint a tápszerrel táplált csecsemőknél, mivel az előbbiek bélmikrobiotájának 90%-át a bifidobaktériumok alkotják, míg az utóbbiaknál már igen összetett a vastagbélben rezidens baktériumközösség. Az utazók hasmenésének megelőzésében is, amelyet elsősorban az enterotoxikus *E. coli* okoz, jelentős szerepet tulajdonítanak a probiotikumoknak. Például

Egyiptomba utazó dán turistáknak 10^9 tke(telepképző egység)/nap mennyiségben adtak *Lb. acidophilus*, *B. animalis*, *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* és *Str. thermophilus* kultúrát tartalmazó készítményt, amely révén csökkent a hasmenések gyakorisága [SHAH, 2007]. Számos publikációban kifejtik a *Lactobacillus rhamnosus* GG és a *Lb. acidophilus* törzsek hasmenés megelőzésében betöltött szerepét [HILTON *et al.*, 1997; SALMINEN *et al.*, 1998/a].

2.2.4.4 Probiotikumok hatása a bélbetegségekre

A fekélybetegség hátterében az esetek kb. 50-60%-ában *H. pylori* fertőzés áll. Ezenkívül a nem megfelelő étrend, vitaminhiány, acetyl-szalicilsav tartalmú gyógyszerek tartós vagy rövid ideig tartó használata is fekélybetegség kialakulásához vezet. Humán kísérletek első eredményei azt mutatják, hogy *H. pylori* kolonizálódását és aktivitását probiotikus tejtermékek rendszeres fogyasztásával vissza lehet szorítani [WANG *et al.*, 2004]. A probiotikum nem tudja elpusztítani a patogént, de elnyomja növekedését és csökkenti a gyulladást a gyomorban. A *H. pylori* elleni terápiában sikeresen alkalmazzák a *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus gasseri* OLL2716, *Lb. casei* Shirota és az *Lb. acidophilus* kultúrákat [SHAH, 2007; HAMILTON-MILLER, 2003]. Az IBD (inflammatory bowel disease) magába foglalja a fekélyt okozó vastagbélgyulladást (ulcerative colitis) és a Crohn betegséget. Az IBD oka ismeretlen, de összefüggésben van a bélmikrobiota megváltozásával. A probiotikumok ellensúlyozzák a gyulladás kialakulását, azáltal, hogy fokozzák az antigének lebomlását, csökkentik a gyulladást közvetítők kiválasztását, segítik a bélmikrobiota egészséges egyensúlyának helyreállítását és stabilizálják a bélfunkciókat [MERCENIER *et al.*, 2003; OUWEHAND *et al.*, 2002]. A VSL-3 keverék egy olyan probiotikus készítmény, amely 4 laktobacillus, 3 bifidobaktérium és egy *Str. thermophilus* törzset tartalmaz. E készítmény jelenlétében a lipopoliszacharidok gyulladást előidéző hatása az interleukin (IL) 12 termelődésének elnyomásával csökken, miközben fokozódik az IL-10 képződése [HART *et al.*, 2004]. (Az IL-10 szabályozásában elsősorban a bifidobaktériumok vesznek részt.) GIONCHETTI és munkatársai (2000) által közzé tett publikációban arról számoltak be, hogy a VSL-3 probiotikum készítménnyel kezelt 20 IBD beteg 85 %-a tünetmentessé vált a 9 hónapos kúrát követően.

Az IBS (irritable bowel syndrome) egy olyan bélbetegség, amit a nyálkahártya krónikus vagy kiújuló gyulladása okoz, és az iparosított városok lakosságának 15-20%-át érinti. Az IBS nem szervi betegség, kialakulása gyakori a gyomor- és bélhurut, valamint az antibiotikumos kezelés után. Hasonlóan az IBD-hez megváltozik a bélmikrobiota összetétele, növekedik a fakultatív anaerob organizmusok, mint a *Klebsiella* spp. és az *Enterococcus*-ok száma, valamint csökken a laktobacillus és bifidobaktérium törzsek mennyisége [MERCENIER *et al.*, 2003]. Különböző jelentésekből kiderül, hogy az élő *Lb. acidophilus* sejtek hasznosak lehetnek ilyen esetekben [MARTEAU *et al.* 2001; NOBAEK *et al.*, 2000]. Hasonló sikerekről számoltak be az *Enterococcus faecium*, a *Lactobacillus plantarum* és vegyes kultúrák (VSL-3) esetében is. Szükség van azonban további tanulmányokra nagyszámú, jól definiálható páciens csoportok vizsgálatával, hogy minél jobban megértsük a probiotikumok bélbetegségekre gyakorolt hatását.

2.2.4.5 Ételallergia és atópiás betegségek tüneteinek csökkentése

Számos újabb tanulmány foglalkozik azzal, hogy milyen szerepet játszik a bélmikrobiota az élelmiszer-allergia és az atópiás betegségek megelőzésében és gyógyításában, beleértve az atópiás ekcémát, az asztmát és egyéb allergiákat [RAUTAVA *et al.*, 2005; MATRICARDI, 2002]. Azoknál a gyermekeknél, akiknél atópiás betegséget fedeztek fel abnormális volt a bélmikrobiota, de ez az egyensúlyhiány probiotikumok alkalmazásával kiküszöbölhető volt. A vizsgálatok szerint az atópiás családok gyermekeiben a probiotikumok adásával szignifikánsan kevesebb volt az atópiás dermatitis, aminek a magyarázata az, hogy a probiotikumok hatására az allergén expozícióra Th1 sejt immunválasz alakult ki, IL-2, IL-12 és γ -interferon citokinek túlsúlyával, elnyomva a Th2 immunválaszt és az IL-4, IL-5 citokin termelést. A TGF- β is segíti a Th1 válasz kialakulását és a nyálkahártya védelmében nagy szerepet játszó IgA-kiválasztás növekedését.

Klinikai kísérletekben vizsgálták, hogy a *Lb. rhamnosus* GG-vel kiegészített tápszer adásával hogyan változik az ekcéma súlyossága tehéntej allergiában és atópiás ekcémában. Megállapították, hogy a tápszer adásával csökkent a csecsemőknél a szérumban IgE szint és csökkent az intesztinális gyulladás mértéke [KAALIOMAKI *et al.*, 2001]. A *Lactobacillus* fogyasztása kivédi a neutrofil granulociták tej ivása után bekövetkező aktiválódását tejallergiás egyéneknél [PELTO *et al.*, 1998].

2.2.4.6 Antikarcinogén és antimutagén hatás

Számos közvetett, de meggyőző bizonyíték van arra, hogy a probiotikus mikrobák képesek megelőzni vagy késleltetni a rákos megbetegedések kialakulását, amelyek összefüggésbe hozhatók az intesztinális mikrobiota összetételének megváltozásával és ezzel együtt a rothasztó, káros mikrobák előtérbe kerülésével [LEAHY *et al.*, 2005]. Ezen emésztőrendszerben előforduló mikrobák közül számos termel olyan enzimeket, amelyek karcinogén anyagokat hoznak létre. Ilyenek például a β -glükuronidáz, a β -glükozidáz, a nitroreduktáz, ureáz, amelyek a prekarcinogén anyagokat karcinogénné konvertálják. Kísérletekkel megerősítették, hogy a *Bifidobacterium*-ok és a *Lactobacillus*-ok nemcsak nem termelnek ilyen enzimeket, hanem néhány törzs például a *Lb. acidophilus* és a *Bifidobacterium* fajok a prekarcinogén anyagok átalakításáért felelős enzimek aktivitását a rövid szénláncú zsírsavak termelése által gátolják, így csökkentve a tumor kifejlődésének kockázatát [GOMES & MALCATA, 1999]. A *B. longum* és a *B. breve* törzsekkel végzett kísérletek alátámasztották azt is, hogy e két törzs megakadályozza a karcinogén anyagok indukálta DNS károsodást [POOL-ZOBEL *et al.*, 1996].

A *Lactobacillus*-ok és a *Bifidobacterium*-ok nem termelnek mutagén hatású alifás amino vegyületeket, kénhidrogént, nitrátokat, fenolokat, N-nitrozo, krezol, indol vegyületeket. LANKAPUTHRA és SHAH (1998) 9 *Bifidobacterium* törzs élő és holt sejtjeinek antimutagén aktivitását vizsgálta az Ames TA-100 teszt szerint egy mutáns *Salmonella* Typhimurium (His⁻: hisztidin igényes) indikátor organizmus segítségével 8 különböző mutagénnel ill. promutagénnel szemben. Az élő bifidobaktérium sejtek minden esetben nagyobb mértékű antimutagenitással rendelkeztek, mint a holt sejtek. Az antimutagenitás jellege és mértéke törzsfüggőnek bizonyult.

Az összes vizsgált élő bifidobaktérium törzs nagymértékű aktivitást mutatott 2-nitrofluorén ellen, hét törzs aktivitása meghaladta a 90 %-ot. Hat törzs mutatott jelentős (>40%) antimutagén aktivitást N-metil,N'-nitro,N-nitrozoguanidinnal szemben. *Bifidobacterium pseudolongum* és *Bifidobacterium thermophilum* élő sejtjei erős antimutagén aktivitást (>60%) fejtettek ki az aflatoxinB-re. A fermentációs termékek antimutagén hatásait is feltérképezték. Minden törzs termelt tejsavat, ecetsavat és piruvátot. *B. breve* és *B. pseudolongum* fajok kivételével minden vizsgált törzs termelt butirátot is. A butirát rendelkezett a legnagyobb antimutagén aktivitással mind a 8 mutagénnel ill. promutagénnel szemben. Utána az ecetsav következett, míg a legkisebb aktivitást a piruvát, majd a tejsav mutatta. Az antimutagén mechanizmus még tisztázatlan, de összefüggésben lehet mind magával a probiotikus sejttel (megkötik a mutagén anyagokat), mind az általa termelt savakkal [LO *et al.*, 2002].

2.2.4.7 Immunfunkciók erősítése

A gasztrointesztinális nyálkahártya a szervezet legnagyobb kiterjedésű immunológiai szerve, amely védőgátat képez a belső környezet és a táplálékból származó folyamatos antigén, illetve mikroorganizmus stimuláló hatása között. A probiotikumok úgy hatnak az immunrendszerre, hogy serkentik az IgA-termelést és helyreállítják a citokin egyensúlyt azáltal, hogy a Th1 vagy Th2 immunválasz irányába tolják el azt [HA *et al.*, 1999; MARIN *et al.*, 1998]. Magzatok esetében ún. Th2 dominancia van jelen, később – a születést követően – fejlődik ki a Th1 jellegű immunválasz, melynek kialakulásában az egyik jelentős tényező a baktériumok sejtfalának lipopoliszacharid-komponense. Fontos, hogy a Th2 és Th1 típusú sejtek között egyfajta harmonikus egyensúly alakuljon ki: ha ez nem következik be, allergiás betegségek (Th2 túlsúly), vagy autoimmun kórképek (Th1 túlsúly) léphetnek fel. Túlérzékenység esetén az adott antigén Th2 dominanciájú citokin termelést vált ki (eredményeként IgG helyett IgE keletkezik). A probiotikumok viszont képesek megváltoztatni a citokin egyensúlyt, Th1 irányba tolván el azt [TULASSAY, 2004; MATTILA-SANDHOLM *et al.* 1999]. A probiotikumok fokozzák a fagocitózist, emellett növelik egyes felszíni molekulák, mint pl. komplementreceptorok kifejeződését a makrofágokon [COLOMBEL *et al.*, 1987]. (A fagocitáló sejtek mutatják be a megfelelően előkészített antigént a specifikus immunválaszért felelős T- és B-sejtek számára.) Vizsgálatok azt mutatják, hogy a tejsavbaktériumok bekerülve a szervezetbe, annak specifikus védekezését erősítik a fertőzések és rákkeltő hatások ellen [YAMAZAKI *et al.*, 1985; ISOLAURI *et al.*, 2001; GILL, 1998]. Állatkísérletek során azt tapasztalták, hogy a *B. animalis* kölcsönhatásba lépett a Peyer plakkok immunsejtjeivel és a vastagbéllel, a *B. longum*-mal fermentált tejet fogyasztó egerek tüdejéből vett aktivált makrofágok mennyiségében pedig szignifikáns növekedés történt. Számos törzs, mint pl. *Lb. casei* Shirota, *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* GG, *Lb. johnsonii* La-1, *Bifidobacterium bifidum* BB-12, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve* immunmoduláló hatásáról jelentek meg közlemények [HE *et al.*, 2002; MATSUZAKI, 1998; SCHIFFRIN *et al.*, 1995].

Az IgA kiválsztódás a bélben kivédi az enteropatogén fertőzéseket, az antitestek meggátolják a kórokozók megtapadását a nyálkahártyán és megkötik az allergiát kiváltó élelmiszer-fehérjéket, valamint a karcinogén anyagokat [PERDIGÓN *et al.* 2003].

2.3 Bifidobaktériumok

Az elmúlt húsz évben óriási érdeklődés indult meg a *Bifidobacterium* nemzetség fajai és törzsei iránt a kereskedelem és ebből következően a tudomány részéről is. A *Bifidobacterium* nemzetség története Henry Tissier francia gyermekorvos azon megfigyelésével kezdődött (1899-1900-ban), hogy az egészséges csecsemők bélrendszerében egyébként előforduló szabálytalan Y formájú baktériumok hiányoztak a hasmenésben szenvedő csecsemőknél. Tissier ekkor ezt a 'bifid' morfológiájú, gázt nem termelő, anaerob mikroorganizmust *Bacillus bifidus*-nak nevezte el. Orla-Jensen 1924-ben a *Bifidobacterium* nemzetséget külön taxonómiai csoportként azonosította. Javaslatát csak 50 évvel később fogadták el, és az *Actinomycetaceae* családon belül létrehozták a *Bifidobacterium* nemzetséget. Ezt megelőzően sokáig a *Lactobacillus* nemzetségen belül, mint *Lb. bifidus* fajként tartották számon. Jelenleg, több mint 30 faj tartozik a *Bifidobacterium* nemzetségbe. Megtalálhatók melegvérű állatok emésztőrendszerében, humán szervezetben (emésztő- és nemi szervrendszer) és szennyvízben. Általában a *B. breve* és a *B. infantis* a csecsemőkben, a *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* az újszülöttekben és a felnőttekben, míg a *B. adolescentis* csak a felnőttekben fordul elő. A bélmikrobiota összetétele az életkortól és a táplálkozási szokásoktól, valamint az egészségi állapottól is függ. Állatoknál gazda specifikus fajokat figyeltek meg, mint például a nyúlban: *B. magnum*, *B. cuniculi*; kismalacban: *B. suis*; csirkében: *B. pullorum*, *B. gallinarum*. Tizenkettő *Bifidobacterium* fajt izoláltak szennyvízből – *B. minimum* és *B. subtile* fajok csak itt fordulnak elő –, amelyek a víz fekáliás szennyezettségét jelzik, mint indikátor mikroorganizmusok [BIAVATI *et al.*, 2000; VENTURA *et al.*, 2004; O'SULLIVAN & KULLEN, 1998]. Három fajnak: *B. dentium*, a *B. inopinatum* és a *B. denticolens* tulajdonítanak patogén tulajdonságot; gennyesedést, valamint fogszuvasodást okoznak. A legújabb kutatások szerint a *B. denticolens*-t, a *B. inopinatum*-ot új nemzetséghez sorolták, így elnevezésük *Parascardovia denticolens* és *Scardovia inopinatum* lett [JIAN *et al.*, 2002].

2.3.1 Morfológia

A bifidobaktériumok filogenetikailag a Gram-pozitív baktériumok actinomicéta csoportjába tartoznak, magas guanin-citozin tartalommal rendelkeznek (54-67 mol%). A sejtek alakja különféle lehet; rövid, vékony, szabályos, kokkoid szerű vagy hosszú pálca gyenge görbülettel vagy kidudorodással, különféle elágazással, csúcsos, vékony, kettéágazó, bunkós bot alakú, állhat egy sejtből vagy lehet láncolat. A telepek sima felületűek, domborúak, ép szélűek, színük krémszínűtől fehérig változhat, fénylők és lágy konzisztenciájúak [SCARDOVI, 1981].

A *Bifidobacterium* nemzetséget más baktériumoktól legegyszerűbben a fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz (F6PPK) enzim jelenlétének kimutatásával lehet megkülönböztetni [GAVINI *et al.*, 1996]. A tejsavbaktériumoktól a G+C% alapján a 16S rRNS szekvenálás segítségével – a bifidobaktériumokat a nagy G+C tartalmú (>55%) baktériumokon belül az *Actinomyces* elágazáshoz, míg a laktobacillusokat a kis G+C tartalmú ún. *Clostridium* elágazáshoz sorolják –, vagy az α -galaktozidáz enzim jelenlétének kimutatásával is elkülöníthetők. Faji szinten molekuláris-biológiai módszerekkel (ribotipizálás, fajspecifikus PCR technikák) vagy

hagyományos módszerekkel (sejtfehérjék poliakrilamid gél elektroforetikus mintázata alapján, fermentációs vagy enzimes tesztek) különíthetők el [VENTURA *et al.*, 2004; WARD & ROY, 2005].

2.3.2 Sejtfalszerkezet

Vastag peptidoglükán (murein) réteggel rendelkeznek, mely poliszacharidokból, fehérjékből és teichoinsavból áll. A murein tetrapeptideit alkotó aminosavak különbözőek az egyes fajok és/vagy törzsek között. Általában L-alanin, D-glutaminsav, L-ornitin és D-alanin alkotja a tetrapeptideket, de ornitin helyett lizin is előfordulhat egyes törzseknél. A szomszédos tetrapeptidek között létrejövő keresztkötések száma is törzsenként eltérő lehet. A poliszacharidok komponensei: glükóz, galaktóz és gyakran ramnóz – minőségi és mennyiségi különbségek figyelhetők meg fajtól, törzstől és a körülményektől függően. A lipoteichoinsav (LTS) kötések alakít ki poliszacharid láncokkal, ez fontos szerepet játszik a sejt bélfalhoz történő rögzülésekor. A fehérjék és az LTS határozzák meg a sejt felületének hidrofób jellegét [BIAVATI *et al.*, 2000; ARUNACHALAM, 1999]. A *Bifidobacterium* és a *Lactobacillus* nemzetségek közötti eltérések poliglicerin foszfolipidekben és aminoacil foszfolipidekben rejlenek [SCARDOVI, 1981]. LAUER és KANDLER (1983) a *Bifidobacterium*-ok sejtfalának murein típusai alapján végzett faji besorolást.

2.3.3 Hőmérséklet, pH optimum és oxigén érzékenység

A bifidobaktériumok szaporodási hőmérséklet optimuma 37-41°C között van. 20°C alatti és 46°C feletti hőmérsékleten már nem képesek szaporodni. Ez alól kivételt képez a *B. thermacidophilum*, amelynek a maximális szaporodási hőmérséklete 49,5°C [DONG *et al.*, 2000], és a *B. psychraerophilum*, amely még 4°C-on is mutat szaporodó képességet [SIMPSON *et al.* 2004]. A bifidobaktériumok szaporodásához szükséges optimális pH érték 6,5-7,0 közötti. pH=5,0 alatt, illetve pH=8,0 felett nem, vagy csak igen kismértékű szaporodást jegyeztek fel [SCARDOVI, 1981]. MATSUMOTO és munkatársai szerint (2004) a *B. lactis* és *B. animalis* törzsek képesek túlélni, ha pH=3,5-nek teszik ki azokat.

A bifidobaktériumok szigorúan anaerob mikroorganizmusok, de a különböző fajok és törzsek oxigén toleranciája eltérő [SIMPSON *et al.*, 2005; BEERENS *et al.*, 2000; MEILE *et al.*, 1997]. Néhány törzs tolerálja az oxigén jelenlétét pl. *B. lactis*, *B. aerophilum*, *B. psychraerophilum* gyenge kataláz vagy NADH oxidáz/peroxidáz aktivitásuknak köszönhetően, amely megakadályozza a hidrogén-peroxid szintézist. Mivel viszont a bifidobaktériumok kataláz negatívak – kivéve a *B. indicum* és a *B. asteroides* – nem képesek a hidrogén-peroxidot a kataláz enzimmel bontani, így az utóbbi hatás állhat a háttérben [SCARDOVI, 1981; VENTURA *et al.*, 2004]. AHN és munkatársai (2001) érdekes megfigyelésről számolnak be. Az oxigén stressznek kitett *B. longum* esetén találtak egy fehérjét „Osp”, amely megnövekedett kifejeződést mutatott az oxigén-toleráns törzsben.

A bifidobaktériumok a glükózanyagcsere során a NAD-ot NADH-vá redukálják. Molekuláris oxigén jelenlétében a NADH-oxidáz H₂O₂-vé redukálja az oxigént. A hidrogén-peroxid kiszabadul a sejtől és a NADH-peroxidáz vízzé redukálja. Ha ez utóbbi enzim aktivitása nem

elég nagy, a hidrogén-peroxid nem bomlik le és toxikussá válik a bifidobaktériumokra. A hidrogén-peroxid pusztító hatása a fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz enzim inaktiválásán alapul [ARUNACHALAM, 1999].

TALWALKAR és KAILASAPATHY (2004) beszámolt arról, hogy 1969-ben első ízben de Vries és Stouthamer vizsgálta a bifidobaktériumok oxigén érzékenységét gátlási zóna nagyságának mérésével, amely akkor keletkezett, mikor a baktériumok oxigén jelenlétében mély agarkultúrában nőttek. A törzseket három kategóriába sorolta az oxigén tolerancia mértéke és a hidrogén-peroxid képződés szerint. Ezután többen is vizsgálták a bifidobaktériumok oxigén érzékenységét kvalitatív módon, pl. agaron, állandó vagy részben rázatott táplevesben. Néhány törzs oxigén toleranciájának kvantitatív értékelését először TALWALKAR és munkatársai (2001) írták le, Relatív Baktérium Növekedési Arány (RBGR, Relative Bacterial Growth Ratio) módszerét alkalmazva. Az RBGR ugyanazon törzs aerob és anaerob körülmények között történő növekedésének aránya, amely egy számszerűsíthető indexet ad a törzs oxigén toleranciájára. Vizsgálatukban a *B. lactis* és a *B. infantis* törzsek jó oxigén toleranciát, a *B. breve*, a *B. bifidum*, és a *B. pseudolongum* törzsek gyenge toleranciát mutattak.

SHIMAMURA és munkatársai (1992) az enzimes mechanizmus hátterét kutatták a *Bifidobacterium*-ok oxigén érzékenységének meghatározására. Méréseik során azt az összefüggést találták, hogy a NAD-oxidáz és a NAD-peroxidáz aktivitás egyenesen arányos az oxigéntoleranciával. Például a *B. infantis*, a *B. breve* és a *B. longum* törzsek, amelyek nagyobb oxigéntoleranciát mutattak, nagyobb enzimaktivitásokkal rendelkeztek, mint a *B. adolescentis*, amely oxigénre érzékeny. Minden törzs akkumulált hidrogén-peroxidot aerob körülményeken, de nem tapasztaltak jelentős korrelációt az oxigén növekedésre kifejtett gátló hatása és a H₂O₂-ra való érzékenység között. A *B. adolescentis* a vizsgált törzsek közül a legérzékenyebb volt az oxigénre, a hidrogén-peroxidra viszont kevésbé. TALWALKAR és KAILASAPATHY (2003) is hasonló következtetéseket vontak le a vizsgálataik során. Kísérleteikben különböző oxigénkoncentráció (0, 5, 10, 15, 20 %) hatását tanulmányozták, és azt figyelték meg, hogy mind a NAD-oxidáz és mind a NAD-peroxidáz aktivitás nő az oxigénkoncentráció növelésével. A bifidobaktérium törzsek közül a *B. longum* 55815 törzsnél tapasztalták a legnagyobb NAD-oxidáz és a NAD-peroxidáz aktivitást. Továbbá tanulmányozták a szuperoxid dizmutáz (szuperoxid gyökök (O₂⁻) átalakítását katalizálja H₂O₂-dá) szerepét, de nem találtak összefüggést az aktivitása és az oxigén érzékenység között.

2.3.4 Tápanyagszükséglet

A *Bifidobacterium*-ok szénforrás (mono- és diszacharidok) mellett karbonátot és bikarbonátot is igényelnek. Zsírsavakat nem használnak fel effektív szénforrásként.

Nitrogénforrásként hasznosítják az ammónium sókat (glutamát dehidrogenáz, glutamin szintetáz aktivitás révén), kivételt képeznek ez alól a *B. suis*, a *B. choerinum*, a *B. cuniculi* és a *B. magnum* fajok, melyek nem képesek szerves nitrogénforrás nélkül szaporodni. Azok a fajok, amelyek képesek a szerves nitrogén nélküli szaporodásra, jelentős mennyiségű aminosavat választanak ki

a táptalajba, mint a treonint (a *B. bifidum* esetén detektálták), valint, alanint, aszparaginsavat (pl. a *B. adolescentis*, a *B. animalis* és a *B. infantis* fajokra jellemző).

A szaporodásukhoz a cisztein-HCl létfontosságú, mint redoxpotenciál csökkentő vegyület, nem váltható ki metioninnal, homociszteinnel, vagy hasonló vegyületekkel [BIAVATI *et al.*, 1991; BIAVATI *et al.*, 2000].

A *Bifidobacterium*-ok számára a vitaminok közül csak a biotin és a kalcium-pantoteát esszenciális, de emellett még piridoxint (B₆) és folsavat (B₉) is felhasználhatnak növekedésükhöz. A bifidobaktériumok a riboflavin kivételével képesek B-vitaminokat (tiamint (B₁), piridoxint (B₆), folsavat (B₉), nikotinsavat, B₁₂ vitamint) és emellett K vitamint szintetizálni [SCARDOVI, 1981; TAMINE *et al.*, 1995]. Például a *B. breve* és a *B. infantis* törzsek nagy mennyiségű nikotinsavat és biotint szintetizálnak, a *B. bifidum* pedig B₁, B₉ és nikotinsav termelésével emelkedik ki.

A bifidobaktériumok szaporodóképességét stimulálhatjuk növekedési és bifidogén faktorok segítségével, amelyek között alapvető különbségek vannak, mind természetüket, mind funkciójukat tekintve. A növekedési faktorok azok, amelyek a bifidobaktériumok szaporodását *in vitro* támogatják, de nem jutnak el a vastagbélig, mint pl. treonin, élesztőkivonat, pepton, dextrin, maltóz, β-glicerinfoszfát. A bifidogén faktorok olyan szénhidrát-összetevők, amelyek túlélnek a gazdaszervezet metabolizmusát és eléri a vastagbelet vagy a cecumot, ahol a bifidobaktériumok, mint energiaforrást használhatják fel. Ilyenek pl. az N-acetilglükózamin tartalmú szacharidok, a frukto-oligoszacharidok, a laktoferrin, a laktulóz, a laktoszukróz, a xylo-oligoszacharidok és a transzgalakto-oligoszacharidok stb. [MODLER, 1994].

2.3.5 Metabolizmus

A bifidobaktériumok szacharolitikus baktériumok, minden törzse erjeszti a glükózt, a galaktózt és a fruktózt. A bifidobaktériumok szénhidrátanyagcsere útja különbözik mind a homo-, mind a heterofermentatív baktériumokétól. Az aldoláz és a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimek hiánya kizárja a glikolízist és a hexóz-monofoszfát utat. A bifidobaktériumok fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz enzimet termelnek, amely a bifidus út első enzime, a fruktóz-6-foszfátot acetilfoszfáttá és eritróz-4-foszfáttá hasítja. A cukor lebontás végterméke az ecetsav és a tejsav, általában 3:2 mól arányban szén-dioxid képződése nélkül. (Szén-dioxid csak glükonát bontásakor termelődik.) A 3:2 arány gyakran eltolódik, ugyanis a piruvát foszforilitikus hasítása hangyasavra és acetil foszfátra, valamint az acetil foszfát etanolra történő redukciója gyakran megváltoztatja a fermentáció egyensúlyát az ecetsav, hangyasav és etanol javára. Kis mennyiségben borostyánkősavat is termelnek. Vajsav és propionsav termelésük nem jellemző [SCARDOVI, 1981; BIAVATI *et al.*, 2000; DEGNAN & MACFARLANE, 1994].

TRINDADE és munkatársai (2003) egy szacharóz hasznosításért felelős gén csoportot azonosítottak és jellemeztek a *B. lactis* törzs esetén. Ez a csoport három génből áll: szacharóz-foszforiláz (ScrP), amely glükóz-1-foszfátot és fruktózt eredményez; GalR-LacI típusú transzkripció regulátor (ScrR); szacharóz transzporter (ScrT).

A szénhidrát fermentáció másik kulcs enzime a β -galaktozidáz, amely mind a hidrolitikus, és mind a transzgalaktozilációs reakciókat katalizálja. A hidrolitikus aktivitásának a tejben lévő laktóz tartalom csökkentésében, a transzgalaktozilációs aktivitásának a galakto-oligoszacharidok szintézisében van szerepe [VENTURA *et al.*, 2004].

2.3.6 Antibiotikum rezisztencia

Számos publikáció foglalkozik a bifidobaktériumok antibiotikum rezisztenciájával, illetve érzékenységgel, amelyekből kiderül, hogy ez erősen törzsfüggő tulajdonság. A bifidobaktérium törzsekre a legnagyobb gátló aktivitást a β -laktám antibiotikumok fejtik ki. Általában a penicillin G és az amoxicillin esetében mérik a legkisebb gátló koncentrációt (MIC), amely a bifidobaktérium törzsekre már hat [KHEADR *et al.*, 2004; MOUBARECK *et al.*, 2005]. A bifidobaktériumok még érzékenyek lehetnek cephalosporin-ra, bacitracin-ra, chloramphenicol-ra, clindamycin-re, nitrofurantoin-ra, tetracyclin-re, pirlimycin-re és novobiocin-ra. A bifidobaktérium törzsek többsége rezisztens kanamycin, neomycin és streptomycin, nalidixin sav, polymixin B, gentamycin és metronidazol antibiotikumokkal szemben. A kanamycin-t és a neomycin-t széles körben használják a bifidobaktériumok izolálásához tápközegek szelektív tételére [TEMMERMAN *et al.*, 2002].

KHEADR és munkatársai (2004) által elvégzett vizsgálat jól mutatja a törzsek közötti különbséget. Erythromycin, chloramphenicol, tetracyclin, pirlimycin és novobiocin antibiotikumok vizsgálata során megállapították, hogy a csecsemőből származó bifidobaktériumok sokkal érzékenyebbek voltak a chloramphenicol-ra és a tetracyclin-re, mint a kereskedelmi forgalomban lévő törzsek. Ezzel ellentétben volt néhány olyan kereskedelmi törzs, mely érzékenyebb volt a pirlimycin-re, mint a csecsemő eredetű izolátumok. A novobiocin esetében viszont a csecsemő eredetű izolátumok nagyobb érzékenységet mutattak, mint a kereskedelmi törzsek.

Az antibiotikumok közül a vancomycin-t emelném ki, amelynek a gátló hatása kiemelkedően fontos, mert az egyik az utolsó antibiotikumok közül, amely széles hatásspektrummal rendelkezik a klinikai fertőzéseket okozó többféle gyógyszerre rezisztens patogénekkal szemben. A vancomycin a glikopeptid antibiotikumok közé tartozik, amely a sejtfalat alkotó peptidoglükán szintézisét gátolja azáltal, hogy komplexet képez a karboxilcsoport végén lévő D-alaninnal és így megakadályozza a transzglykolizációs reakciót. A laktobacillusok többsége rezisztens a vancomycin-nel szemben, mert rendelkeznek vancomycin rezisztencia génnel, de ez kromoszómáisan kódolt, ezáltal nem átadható [SALMINEN *et al.*, 1998/b; REYNOLDS, 1989]. A bifidobaktériumok rezisztenciájával kapcsolatban eltérő eredményeket találhatunk. CHARTERIS és munkatársai, (1998), illetve KHEADR és munkatársai (2004) közleményeikben arról számolnak be, hogy a bifidobaktériumok rezisztensek a vancomycin-nel szemben, míg mások [MOUBARECK *et al.*, 2005; TYNKKYNEN *et al.*, 1998] a vancomycin gátló hatását írják le. ZHOU és munkatársai (2005) csak *B. lactis* Bb-12 törzs esetében detektáltak rezisztenciát.

2.3.7 A bifidobaktériumok és a prebiotikumok kölcsönhatása

A prebiotikumok olyan nem-emészthető élelmiszer-összetevők, melyek szelektíven támogatják a jótékony baktériumok szaporodását és aktivitását a vastagbélben, ezáltal elősegítik az emberi szervezet egészségének megőrzését [GIBSON & ROBERFROID, 1995]. Ezek általában oligoszacharidok, melyek egyszerű cukor monomerekből épülnek fel, melyek száma 3 és 10 között változhat. Ide tartozhatnak bizonyos fehérjék, peptidek és lipidek is. A szervezetben kémiai szerkezetük miatt nem metabolizálódnak, illetve nem szívódnak fel, a gyomor és az emésztőrendszer felső részének enzimeit nem hatnak rá, érintetlenül jutnak el a vastagbélbe [BROWN *et al.*, 1998; MODLER, 1994]. A prebiotikumok szelektíven fokozzák, illetve serkentik azoknak a baktériumoknak (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) szaporodását a vastagbélben, amelyek a prebiotikumokat monomerekre hidrolizálják és ezeket szaporodásukhoz felhasználják. E mechanizmus révén a prebiotikumok kedvezően befolyásolják a bélmikrobiota egyensúlyát. Azon prebiotikus oligoszacharidokat, melyek elsősorban a bifidobaktériumokat támogatják, bifidus vagy bifidogén faktoroknak tekintik [GOMES & MALCATA, 1999]. A prebiotikumok számos élelmiszerben előfordulnak, ilyenek például a csicsóka- és cikóriagyökér, a vörös-, pór- és fokhagyma, az articsóka, a bab, a borsó, létezik még a zabpehelyben, a búzában, a banánban, a tejben és az érett sajtokban is. Itt kell megemlítenem az anyatej szerepét, amelyben a laktóz után az oligoszacharidok vannak legnagyobb koncentrációban jelen, melyeknek egy része erősen bifidogén hatású, ezáltal segíti a *Bifidobacterium* túlsúly kialakulását a csecsemő vastagbélében.

A prebiotikus hatással rendelkező összetevőkkel kapcsolatban is megfogalmazódtak elvárások, a tudomány, illetve az élelmiszeripar részéről. (1) Az emésztőrendszer felső szakaszában ne hidrolizálódjanak és ne szívódjanak fel; (2) szelektíven fermentálják a vastagbélben honos jótékony baktériumok; (3) indukáljanak olyan folyamatokat, melyek jótékonyan befolyásolják a bélmikrobiota egyensúlyát, illetve a gazdaszervezet egészségét; (4) vízzeloldhatóak legyenek; (5) ne kössék meg az ásványi anyagokat, így ne okozzák azok kiürülését; (6) az élelmiszerekben nemkívánatos érzékszervi elváltozásokat ne okozzanak; (7) fizikailag stabilak legyenek és kedvező állományt biztosítsanak a terméknek [FOOKS *et al.*, 1999; MUSSATTO & MANCILHA, 2007; MANNING & GIBSON, 2004].

A szervezetre kifejtett hatásait *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is igazolni kell. Számos klinikai vizsgálatban bizonyították a prebiotikumok hatására bekövetkezett vastagbél-működés változásait: csökkent a székrekedés és a hasmenés előfordulása [GIBSON & WANG, 1994/a; CUMMINGS & MACFARLENE, 2002]. A vastagbélben történő fermentációjuk révén fokozódik a rövid szénláncú zsírsavak termelődése, amely pH csökkenést eredményez, és ezáltal gátlódnak a kórokozó baktériumok, mint pl. *Clostridium perfringens*, *E. coli*. Továbbá a rövid szénláncú zsírsavak révén nő az ionizált kalcium és magnézium abszorpciója. A prebiotikumok a vastagbélbe jutva ozmotikus hatásuknál fogva vizet szívnak vissza a béllumenbe, így a nagyobb mennyiségű folyadékban több ion oldódik és szívódik vissza. Ez csökkenti a csonttritkulás kockázatát, és fokozhatja a csont szilárdságát. Hasonló hatás tételezhető fel a vas, a magnézium és a cink esetében is [NEESER & GERMAN, 2004; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2001].

A bélnyálkahártya receptoraihoz való kötődésben versengést alakít ki a patogén és a jótékony mikrobák között. A jótékony bélmikroorganizmusok tevékenységének serkentésével közvetlenül stimulálja az immunválaszt (pl. növeli az antitest koncentrációt, a makrofág aktivitást). A frukto-oligoszacharidok csökkentik a triglicerid szintézisét a májban, emellett serkentik az inzulin képződését. A fermentáció során vajsav is termelődhet, ami pedig gátolja az apoptózist és véd a bélrák ellen [ISOLAURI *et al.*, 2004].

Ma már számos élelmiszeripari termékben használnak prebiotikum kiegészítést, főleg tejtermékekben és csecsemőtápszerekben. Ezekon kívül még sok alkalmazás lehetséges, pl. italokban, tésztákban, sütőipari termékekben, zsiradékokban, szószokban, húсарukban, reggeli cereáliákban, levesekben, süteményekben, desszertekben. Egyre nagyobb a szinbiotikus termékek térhódítása, ahol a prebiotikumot és probiotikumot egyesítik egy termékben. Egyrészt a probiotikus baktériumoknak jobb túlélési esélyt biztosítanak, másrészt szinergista hatásuk révén kedvezőbb élettani előnyök érhetők el [HOLZAPFEL, 2002]. Prebiotikus összetevőt háromféle módszerrel állíthatnak elő különböző alapanyagokból: növényekből történő extrakció és tisztítás, a poliszacharidok enzimes lebontása és cukrokból történő enzimes szintézis segítségével.

A prebiotikumok csoportosításának legáltalánosabb módszere a kémiai szerkezetük alapján történő besorolásuk [CRITTENDEN & PLAYNE, 1996]. A következő prebiotikus hatású oligo- és poliszacharidokat különböztetjük meg (2. táblázat).

2. táblázat A főbb prebiotikum csoportok és kémiai felépítésük

Oligoszacharidok	Molekulaszerkezet
Galakto-oligoszacharidok (TOS)	$(\text{Ga})_n\text{-Gu}$
Frukto-oligoszacharidok (FOS)	$(\text{Fr})_n\text{-Gu}$
Gentio-oligoszacharidok	$(\text{Gu})_n$
Izomalto-oligoszacharidok	$(\text{Gu})_n$
Izomaltulóz (vagy palatinóz)	$(\text{Gu-Fr})_n$
Laktulóz (LA)	Ga-Fr
Laktoszukróz	Ga-Gu-Fr
Ciklodextrinek	$(\text{Gu})_n$
Malto-oligoszacharidok	$(\text{Gu})_n$
Szója-oligoszacharidok (sztachióz és raffinóz)	$(\text{Ga})_n\text{-Gu-Fr}$
Xylo-oligoszacharidok	$(\text{Xy})_n$

(Ga: galaktóz; Gu: glükóz; Fr: fruktóz, Xy: xilóz)

Az utóbbi években került előtérbe a rezisztens keményítő szerepe, mint prebiotikus hatású összetevő. Számos kísérlet bizonyította, hogy nem emésztődik a vékonybélben és támogatja a probiotikus baktériumok szaporodását a vastagbélben [FERGUSON *et al.*, 2000].

Európában és Japánban leggyakrabban az inulint és a frukto-oligoszacharidokat használják funkcionális élelmiszerekben. A frukto-oligoszacharidok mellett a xylo-oligoszacharidokat emelném ki, amelyek szerepe egyre nő, mert olcsó alapanyagokból előállíthatók és kémiaiilag stabil vegyületek.

2.3.8 A melanoidinek hatása a bifidobaktériumokra

A Maillard-reakció egy bonyolult, többirányú változás, amely végbemehet mind az élelmiszerekben, mind a humán szervezetben. A nemenzimes barnulás során a monoszacharidok, általában a redukáló szénhidrátok, szabad aminocsoporttal reagálva – megfelelő körülmények között – többlépcsős reakcióból álló átalakuláson mennek keresztül és ennek révén aromakomponensek és barna színű pigmentek keletkeznek.

A Maillard-reakció termékeinek biológiai aktivitásáról eltérő közleményeket találhatunk. Egyes szerzők *in vitro* tanulmányaikban káros hatásokat (mutagén, karcinogén, citotoxikus) tulajdonítanak ezeknek a termékeknek [YEN *et al.*, 1993; VAGNARELLI *et al.*, 1991], míg mások antioxidáns, antimutagén aktivitást tapasztaltak [CHEVALIER *et al.*, 2001; BORELLI *et al.*, 2002; WAGNER *et al.*, 2002]. A vizsgálatokból az is kiderült, hogy összefüggés van a molekulatömeg és a toxicitás mértéke között, azonban nem találtak kapcsolatot a kémiai szerkezet és a toxikus hatás jellege között.

A nemenzimes barnulási folyamatnak azért van nagy jelentősége, mert minden élelmiszerben lejátszódhat megfelelő reakció körülmények között és csak egyes élelmiszer-technológia folyamán előnyös (pl. kávépörkölés, kenyérsütés), más esetben (pl. szárított és piritott élelmiszerek) viszont hátrányos a szín- és az aromaváltozás. Melanoidinek naponta jelentős mennyiségben jutnak az emberi bélrendszerbe, ezzel szemben azonban kevés információnk van a vastagbélben történő metabolizmusukról, illetve a bélmikrobiotára kifejtett hatásukról.

AMES és munkatársai (1999) szerint a melanoidinek háromféle hatást fejthetnek ki a bélmikrobiotára: (1) toxikus hatást, (2) tápanyagként szolgálhatnak a bélbaktériumok számára, (3) a fém ionok megkötésével korlátozhatják azok biofelhasználhatóságát. Kísérleteikben glükóz+lizinből készített szintetikus melanoidinek erjeszthetőségét vizsgálták. Eredményeik alapján nőtt az összanaerob szám, szignifikánsan változott a *Clostridium*-ok, a *Bacteroides*-ek és a *Bifidobacterium*-ok száma a 24 órás erjesztési idő alatt. Nem tapasztaltak növekedést laktobacillusok esetén. A Maillard termékek patkány modellben történő etetése a laktobacillusok számának növekedését okozta, míg az *Enterococcus*, a *Coliform* és a *Clostridium* koncentrációra nem volt hatással (nem vizsgálták a *Bifidobacterium* számot) [GERRARD, 2006]. O'BRIEN és MORRISSEY (1989) szerint a Maillard-reakció termékeknek a bélmikrobiotára gyakorolt hatása hasonló lehet, mint a laktóznak és más gyengén emészthető szénhidrátoknak. A vastagbélben lebomlott melanoidinek ezen felül szerepet játszhatnak az egyéb étrendi komponensek megkötésében és/vagy felszabadításában.

2.4 Probiotikumok antagonista hatása és bakteriocin termelése

A fermentált élelmiszerek készítéséhez alkalmazott tejsavbaktériumok (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* és *Leuconostoc*) számos törzse mutat erőteljes antagonizmust más baktériumokkal szemben, köztük saját nemzetségük képviselőivel, illetve nem rokon romlást okozó mikroorganizmusokkal és patogénekkal szemben. A tejsavbaktériumok mellett számos bifidobaktérium törzsről is bizonyították, hogy gátolják más mikroorganizmusok szaporodását [BIAVATI *et al.*, 2000]. Antagonista hatást tapasztaltak számos kórokozóval

szemben: *Listeria*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Shigella* és *Vibrio cholerae* [GIBSON & WANG, 1994/b].

A gátlást sok esetben szerves savak (elsősorban tejsav és ecetsav), hidrogén-peroxid, vagy az anyagcsere során keletkező melléktermékek okozzák. Néhány esetben azonban kimutatták, hogy a gátlásért bakteriosztatikus vagy baktericid hatással rendelkező fehérjék (bakteriocinek) lehetnek a felelősek [VANDENBERGH, 1993; SERVIN, 2004; MAKRAS & DE VUYST, 2006]. A klasszikus definíció szerint, amit Tagg és munkatársai fogalmaztak meg 1976-ban, a bakteriocinek mikroorganizmusok széles köre által termelt fehérjék, amelyek baktericid hatásúak korlátozott számú közeli rokon törzssel szemben [HARLANDER, 1993]. A bakteriocinek közül néhány széles hatásspektrumot mutat, bár a legtöbb csak a Gram-pozitív mikroorganizmusok számára gátló hatású [DABA *et al.*, 1991].

2.4.1 Bakteriocinek sajátosságai és a szerepük

A bakteriocint a tejsavbaktériumokon és a *Bifidobacterium* nemzetséghez tartozó egyes törzseken kívül még számos baktérium (*Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* és *Carnobacterium*) termel, adott fajon belül akár több tíz vagy akár több száz különböző típust [RILEY & WERTZ, 2002]. A bakteriocinek lehetnek kicsi, néhány ezer dalton molekula méretű fehérjék, vagy összetett szerkezetűek, amelyek 10^6 Da-nál is nagyobb méretű alegységből állnak szénhidrát vagy lipid ligandumokkal. Általában kationok (túl sok lizil és arginil csoporttal rendelkeznek), 12-45 aminosavból álló, poláros és apoláros részeket tartalmazó molekulák. Többnyire vizes oldatban nem alkotnak egységes szerkezetet, de egyes oldószerekben (pl. trifluoretanol) vagy anionos foszfolipid membránnal α -hélix szerkezetet alakítanak ki. Néhány peptid diszulfid híd vagy kovalens kötése folytán hurok szerkezetet alkot [MOLL *et al.*, 1999]. A bakteriocinek heterogenitását tükrözi, hogy aktivitásuk optimális feltételei, hatásmechanizmusuk, szintézisük optimális körülményei és genetikai alapjuk igen különbözőek. A bakteriocin termelő törzsek immunitást fejlesztettek ki saját gátló hatásukra nézve, és az immunitásért felelős gének általában a termelésért felelős génekhez kapcsolódnak.

Elsőként 1925-ben az *E. coli* által termelt antimikrobás hatású anyagot, a kolicint izolálták. Majd 1928-ban fedezték fel a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* által termelt nizin, amelynek használatát a WHO (World Health Organization) 1964-ben engedélyezte (az EU-ban és az Egyesült Államokban GRAS státuszt kapott), mint természetes élelmiszer-tartósítót [MONTVILLE & KAISER, 1993; HANSEN, 1993]. A nizin egy pentaciklikus peptid (34 aminosav alkotja), ami három szokatlan aminosavat tartalmaz: dehidroalanint, lantionint és β -metil-lantionint, molekulatömege pedig 3510 Da. Az α -kimotripszin inaktíválja, de ellenáll a pronázsnak, a tripszinnek és savas körülmények között a hő hatásának (100°C, 10 perc). A nizin hatásos a Gram-pozitív patogénekkel szemben és meggátolja a *Clostridium* és *Bacillus* spórák kicsírázását. Használják spóráképző mikroorganizmusok ellen ömlesztett sajtokban, konzervekben és melegítópultban tartott sütőipari termékekben, tej eltarthatóságának növelésére, pasztörözött sonka,

kolbászok előállításánál és módosított atmoszférába csomagolt friss húsok *Clostridium botulinum* elleni védelmére [HANSEN, 1993; VANDENBERGH, 1993].

Különböző tejsavbaktériumok által termelt bakteriocineknek fontos szerepük van, mint antimikrobás anyagoknak az élelmiszerek biológiai tartósításában [DAESCHEL, 1993]. E bakteriocinek három vagy négy fő csoportba oszthatók [CLEVELAND *et al.*, 2001; GARNEAU *et al.*, 2002; MOLL *et al.*, 1999]. Az osztályokat a 3. táblázatban mutatom be. A IV. osztály azokat a bakteriocineket tartalmazza, amelyek nagy komplexeket alkotnak más makromolekulákkal. Azonban ilyen típusú bakteriocint még nem határoztak meg, így jó ok azt hinni, hogy ez a típusú bakteriocin egy "műtermék", és a bakteriocinek kationos és hidrofób tulajdonsága eredményezi az ilyen komplex szerkezet létrejöttét [JIMENEZ-DIAZ *et al.*, 1995].

3. táblázat Bakteriocinek csoportosítása és jellemzői

Osztályok	Tulajdonságok	Példák
I. osztály (lantibiotikumok)	Riboszómáisan szintetizált peptidek, amelyek post-transzlációs módosuláson mennek keresztül. Kis molekulatömegűek (<5 kDa), és molekulán belül lantionint, β -metil-lantionint (tioéter gyűrűk) tartalmaznak.	
<i>Ia</i>	Megnyúlt, kationos, pórusokat létrehozó peptidek. <i>Ib</i> típushoz képest flexibilis molekulák.	Nizin A, Nizin Z, Epilancin, Subtilin
<i>Ib</i>	Enzim inhibitorok és immunológiailag aktív peptidek. Gömb szerkezetűek, semleges vagy negatív töltéssel rendelkeznek.	Mersacidin
II. osztály	Kis molekulatömegű hőstabilis peptidek (< 10 kDa), lantionineket nem tartalmaznak. Kizárólag nem-módosított aminosavak alkotják. Riboszómáisan szintetizálódnak, mint inaktív prepeptid, amely az N-terminális vezér peptidjének (szekvenciájának) a poszt-transzlációs hasadásával aktiválódik.	
<i>IIa</i>	Listeria-aktív peptidek. N-terminális végükön azonos aminosav szekvencia-részletet tartalmaznak (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys).	Pediocin PA-1, Leucocin A, Sakacins A és P
<i>IIb</i>	Két különböző peptidből épülnek fel. A teljes aktivitásuk eléréséhez mindkét peptidre szükség van.	Thermophilin 1, Plantaracin K
<i>IIc</i>	A sejtek általános szekréción rendszer által kiválasztódó bakteriocinek.	Divergicin A, Enterocin P
<i>IId</i>	II. osztályba tartozók, melyek egyik csoportba sem sorolhatók.	Carnobactericin A, Acidocin 8912
III. osztály	Nagy molekulájú (>30 kDa), hőre érzékeny proteinek.	Helveticin J, Acidophilucin A
IV. osztály	Összetett bakteriocin, amely lipid és szénhidrát részeket hordoz.	

2.4.2 Bakteriocinek bioszintézise

A bakteriocineket gyakran tévesen egy csoportba sorolják az antibiotikumokkal. Az antibiotikumok a bakteriocinokkal szemben másodlagos anyagcseretermékek és nem riboszómálisan szintetizált anyagok [CLEVELAND *et al.*, 2001]. Ámbár számos antibiotikum, mint a vancomycin aminosavakból épül fel, de enzimesen szintetizálódnak. A bakteriocinek termelésének génjei általában operonban szerveződnek. A legjobban tanulmányozott operonok a lantibiotikumok operonjai, amelyekben számos homológ gén található [KLAENHAMMER, 1993; ENTIAN & DE VOS, 1996].

A bakteriocin termelést kódoló gének leggyakoribb esetben a plazmidon helyezkednek el, mint például a kolicin vagy az epidermin [SCHNELL *et al.*, 1988], vagy a kromoszómán található [ALTENA *et al.*, 2000; DIEP *et al.*, 1996], mint például a szubtilin [BANERJEE-HANSEN, 1988] vagy nukleáz pyocinok esetében. Viszont az is előfordulhat, hogy a gének mind a plazmidon, mind a kromoszómán (pl. *Serratia marcesens* bakteriocinjai) helyezkednek el [RILEY & WERTZ, 2002]. Újabban kimutatták, hogy transzpozonon is előfordulhatnak, mint például a lactacin 481 [DUFOUR *et al.*, 2000]. Jellemzően 8-12 gén kódolja a Gram-pozitív bakteriocint, míg 2-3 a kolicint. A termelés szabályozása tipikusan a növekedési fázis alatt és/vagy *quorum sensing* szabályozással valósul meg [RILEY & WERTZ, 2002; NÓGRÁDY *et al.*, 2000]. A termelő törzsek génjeiben kódoltak a szerkezeti peptidek [RAUCH & DE VOS, 1992], azok a fehérjék, amelyek aktivitásért [ENGELKE *et al.*, 1992] és a szabályozásért [KLEIN *et al.*, 1993] felelősek, illetve a transzport fehérjék [KLEIN *et al.*, 1992]. Továbbá azok a fehérjék, amelyek biztosítják a termelő törzs számára az immunitást [ENGELKE *et al.*, 1994; KLEIN & ENTIAN, 1994]. Például a plantaricin rendszer génjei többféle bakteriocint kódolnak, amelyek megosztoznak a szállító és a szabályozó rendszereken, ennek ellenére minden egyes bakteriocinnek meg van a maga hozzárendelt immunitási rendszere [DIEP *et al.*, 1994]. Az immunitás fehérjét kódoló gén általában a bakteriocin szerkezeti génjével azonos operonban helyezkedik el és gyakran közvetlenül mellette található. A lantibiotikumok immunitását vizsgálva kezdetben azt gondolták, hogy egy gén kódolja az immunitás fehérjét, mint pl. *nisI* nizin vagy *spaI* a subtilin esetében. Azonban úgy tűnik, hogy ezen bakteriocinokkal szembeni immunitást több fehérje együttes hatása eredményezi [KLEIN & ENTIAN, 1994].

A bakteriocinek legnagyobb részét az ABC transzportrendszer juttatja a sejten kívülre. Ez alól kivételt képez néhány II. osztályba tartozó bakteriocin, amelyeket a sejtek szekréciós-rendszere választ ki [NES *et al.*, 1996].

2.4.3 Bakteriocinek gátlómechanizmusa

Számos bakteriocin hatása abban nyilvánul meg, hogy az érzékeny baktériumok citoplazma membránján pórusokat alakít ki, míg egyesek a fogékony sejtek esszenciális enzimeinek aktivitását gátolják [SERVIN, 2004]. A membránban létrejött pórusok révén megváltozik a transzmembrán potenciál és/vagy a pH gradiens, aminek eredményeképpen a sejtanyagok (molekulák, ionok) kiáramlanak a sejtől [McAULIFFE *et al.*, 2001]. Egyes esetekben megfigyelték azt is, hogy a bakteriocinek hatására gátlódott a DNS és az RNS szintézis, illetve a

fehérjeszintézis [CLEVELAND *et al.*, 2001]. A bakteriocinek aktivitását gyakran hasonlítják a bakteriofágok talpi részének, vagy a szexpilusoknak és az ún. kompetencia faktoroknak a hatásához, amelyek ugyancsak a sejtfallal, illetve a citoplazma membránnal lépnek specifikus kölcsönhatásba. Feltételezik, hogy a sejtfelület anionos polimerjei (mint a teichoinsav és LTS) és a kationos bakteriocinek között jön létre a legelső kölcsönhatás [MOLL *et al.*, 1999; GARNEAU *et al.*, 2002]. Ez fontos szerepet játszik a II. osztályba tartozó bakteriocinek többségénél, melyek nagy része nem képes pórusok kialakítására. A bakteriocin molekulák csak egy kritikus szám után lépnek kapcsolatba a membránnal, amibe beilleszkednek, és egy éket alakítanak ki. Ideiglenesen tönkremegy a membrán az intenzív foszfolipid mozgás következtében, megnő az áteresztőképesség, kiáramlanak a sejtanyagok és megszűnnek a sejt életfunkciói [MOLL *et al.*, 1999; EIJSINK *et al.*, 2002]. A pórusokat létrehozó bakteriocinek esetén a hidrofób rész úgy épülhet be a membránba, hogy a bakteriocin molekula merőlegesen behatol a membránba és ott kialakít egy egész membránt áthidaló ioncsatornát [DRIESSEN *et al.*, 1995].

A bakteriocinek minimális gátló koncentrációját (MIC) jelentősen befolyásolja az adott törzs foszfolipid összetétele és a környezet pH-ja [CHEN *et al.*, 1997/a,b].

2.4.4 Bifidobaktériumok antimikrobás hatása – bakteriocinek termelése

Számos tanulmányban foglalkoztak a bifidobaktériumok által termelt fehérjetermészetű anyag gátló hatásával, illetve, hogy milyen szerepet kap e baktériumok által kifejtett gátlásban, de még mindig hiányosak és olykor ellentmondóak a rendelkezésre álló ismeretek [MEGHROUS *et al.*, 1990; GIBSON & WANG 1994/b; MAKRAS & DE VUYST, 2006]. Egyes vélemények szerint csak a savtermelésnek köszönhető a gátló hatás. Ezt az álláspontot képviseli IBRAHIM és BEZKOROVAINY (1993) is, akik bifidobaktérium típus törzsek felülűszójának antagonista hatását vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy míg azok a felülűszók, melyek pH-ját nem változtatták, minimálisra szorították az *E. coli* növekedését, ezzel szemben a semlegesített felülűszók csak csekély mértékben vagy egyáltalán nem fejtettek ki gátlást. O'RIORDAN és FITZGERALD-nak (1998) sem sikerült gátlóanyagot kimutatni a sejtmentes felülűszóban, viszont spot módszer alkalmazásával, ahol bifidobaktérium szuszpenziót használtak, tapasztaltak gátlást. Az aktivitást mutató törzsek majd mindegyike gátolta a *Clostridium tyrobutyricum*, *Lactobacillus innocua*, *Staphylococcus aureus* fajokat, néhány törzs gátolta a *Lb. acidophilus-t*, illetve a *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus-t*. A gátlás szignifikánsan csökkent, mikor pH beállított táptalajt használtak. Vizsgálataik alapján két törzs esetében (*B. infantis* NCFB 2255, *B. breve* NCFB 2258) tapasztalták antibakteriális összetevők jelenlétét, de a gátlás nem volt stabil. Azonban meg kell jegyezni, hogy GIBSON és WANG már 1994-ben számos olyan bifidobaktérium felülűszójában detektált gátló aktivitást, amelyek szerepeltek O'RIORDAN és FITZGERALD (1998) kísérleteiben. A kapott különbségek talán a tápközeg vagy más környezeti körülményekkel magyarázhatók. Továbbá O'RIORDAN és FITZGERALD (1998) úgy véli, hogy egy indukciós faktor szükséges a gátlóanyag termelés beindításához és ennek hiánya okozhatta a felülűszónál tapasztalt negatív eredményt.

GIBSON és WANG (1994/b) kísérletében *B. infantis* semlegesített felülúszóját adták PYG (peptone yeast glucose) leveshez, melyet aztán 1 ml indikátor törzzsel oltottak be. Az inkubálás alatt mérték a sejtnövekedést 650 nm-en és gátlást figyeltek meg: *Bacteroides fragilis*, *E. coli*, *Cl. perfringens* törzsekkel szemben. Továbbá azt is vizsgálták, hogy a *B. infantis* törzs által termelt anyagcseretermékek hogyan befolyásolják a vizsgált *Cl. perfringens* és az *E. coli* törzsek szaporodását. Ennek a vizsgálatnak a megvalósítására két membrán kapcsolt kemosztátot használtak, vagyis a két bioreaktor között egy szemipermeabilis membránt (0,2 µm pórusméretű) helyeztek el. Az első esetben csupán pH=7,0-es, míg a második esetben pH=5,3-as tápközeggel táplálták a tesztörzseket tartalmazó kemosztátot, végül a harmadik esetben pH=5,3 értéken szabályozott bifidobaktérium kultúra sejtmentes tenyésztésével táplálták a második tesztörzseket tartalmazó kemosztátot. Mind a *Cl. perfringens* és az *E. coli* sejtkoncentráció csökkent, amikor a pH-t 7-ről 5,3-ra csökkentették, és további gátlást tapasztaltak, amikor a bifidobaktériumok sejtmentes tenyésztésével történt a betáplálás. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a bifidobaktériumok szintetizálnak valamilyen gátló komponenst. Ezután *B. infantis* kultúra felülúszójából metanol-aceton extrakcióval vonták ki a bioaktív anyagot, majd különböző módszerekkel tisztították (Sephadex gélszűrés, TLC), melynek során megállapították, hogy az aktivitással rendelkező frakciók közül a legnagyobb aktivitással bíró frakció nem tartalmazott ecet- és tejsavat, így az antimikrobás hatás más anyagcseretermékeknek tulajdonítható.

LIÉVIN és munkatársai (2000) és TOURÉ és munkatársai (2003) az eredményes spot módszer után koncentrált felülúszót alkalmaztak a további gátló hatás kimutatására. LIÉVIN és munkatársai (2000) *Sa. Typhimurium* ellen mutatták ki fagyasztva szárítással 2,5-szeresére koncentrált *Bifidobacterium* spp. CA1 és F9 törzsek (csecsemő izolátumok) felülúszóinak antibakteriális hatását. Továbbá bizonyították, hogy a két bifidobaktérium törzs (CA1, F9) antimikrobiális anyagot választ ki a táplevesbe. A felülúszók fehérje frakcióját ammónium-szulfátos kicsapással távolították el, majd a lipid frakciót kloroform-metanol extrakcióval nyerték ki, mely aktivitást mutatott. A fehérjetermészetű antimikrobiális komponens molekula tömege kisebb, mint 3500 Da-ra becsülték.

TOURÉ és munkatársai (2003) amikor a felülúszót tízszeresére koncentrálták, akkor három csecsemőből származó (RBL 67, RBL 68, RBL 70) és négy törzsgyűjteményből származó (*B. animalis* 27536, *B. adolescentis* 15704, *B. bifidum* 15696, *B. infantis* 15697) bifidobaktérium esetében tapasztaltak gátló aktivitást több *Listeria monocytogenes* törzsnél. (Összesen 34 csecsemőből izolált és 10 törzsgyűjteményből származó bifidobaktériumot vizsgáltak.) A gátló hatás akkor sem tűnt el a csecsemőből származó izolátumok koncentrált felülúszója esetében, amikor 100°C-on 5 percig hőkezelték, ám amikor pronáz-E-vel, illetve proteináz-K-val kezelték, a gátló hatás megszűnt. A lizozimes kezelés nem volt hatással az aktivitásra. Ezek után az RBL 67, RBL 68, RBL 69, RBL 70, RBL 85 és a *B. infantis* 15697 törzsek liofilizált felülúszójából metanol-aceton extrakcióval vonták ki az antimikrobiális anyagot. Az extraktumok antagonista hatását szintén agardiffúziós módszerrel vizsgálták, melynek során kiderült, hogy e törzsek hőstabilis, fehérjetermészetű, antimikrobiális komponenst termelnek, mely komponensek metanol-aceton extrakcióval kinyerhetők.

GAGNON és munkatársai (2004) kétrétegű spot módszer módosításával vizsgálták a tíz törzsgyűjteményből és öt csecsemőből származó bifidobaktérium törzs *E. coli* O157:H7 ellen kifejtett gátló hatását. A módszer során nátrium-bikarbonáttal kiegészített MRS agart alkalmaztak, amely révén a gátlási zónák mérete ugyan csökkent a kiegészítés nélkülihez viszonyítva, de nem tűntek el, ami azt jelenti, hogy nem a savtermelés az egyetlen faktor, ami felelős a gátlásért.

COLLADO és munkatársai (2005) 24 általuk izolált *Bifidobacterium* törzs szűrését végezték el a lehetséges fehérjetermészetű gátlókomponens kimutatására. A kísérleteikben LIÉVIN és munkatársai (2000), TOURÉ és munkatársaihoz (2003) hasonlóan koncentrált felülűszókat használtak. Hat *Bifidobacterium* törzs (BIR-0304, BIR-0307, BIR-0312, BIR-0324, BIR-0326, BIR-0349) mutatott a vártnál szélesebb gátlóspektrumot a Gram-pozitív (pl. *Ec. faecium*, *L. monocytogenes*, *St. aureus*, *Cl. difficile*, *Brochotrix thermosphacta*), Gram-negatív baktériumokkal (pl. *Sa. Typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *H. pylori*) és élesztővel (*Candida albicans*) szemben. A Gram-negatív baktériumokkal és élesztővel szembeni gátlás nem általános jellemzője a Gram-pozitív baktériumból származó antimikrobiális összetevőnek. A hat törzs antagonista aktivitását bakteriocin típusú molekulával hozták összefüggésbe, amely aktív volt pH=3 és 10 között, stabil maradt 100°C-on 10 percig történő hőkezelés után, továbbá α -amilázzal és lipáz A-val kezelve megtartotta aktivitását, de proteinázokkal (tripszin, proteináz K, proteáz A, pepszin, cathepsin) kezelve inaktívvá vált. A BIR-0304, BIR-0307 BIR-0326 és BIR-0349 jelzésű *Bifidobacterium* törzsek által termelt komponens molekulatömege kevesebb, mint 10 kDa volt, amely jellemző az I. és a II. osztályban lévő bakteriocinekre, míg BIR-0312, BIR-0324 törzsek esetében a molekulatömeg 10 és 30 kDa között volt. A molekulatömeget tekintve felmerülhet az a kérdés, hogy az utóbbi két törzs által termelt antimikrobás peptidok és a III. osztályba tartozó bakteriocinek között van-e valami összefüggés, de ezt a cikk szerzői nem tartják valószínűnek. Ezt támasztja alá a törzsek bakteriocinjának hőstabilitása is, ugyanis a III. osztályba hőlabilis peptidok találhatóak.

Az általam bemutatott példák alapján (továbbiakat is lehetne még említeni: FUJIWARA *et al.*, 1997, 1999; LEE *et al.*, 2003; TREJO *et al.*, 2006) levonható az a következtetés, hogy a *Bifidobacterium*-ok antagonista hatásában részt vesznek az általuk termelt fehérjetermészetű komponensek. Azonban csak két irodalmi adat van, ahol a gátló komponenst (bakteriocint) konkrétan megnevezték. 1984-ben ANAND és munkatársai izolálták a "bifidin",-t, azt a *B. bifidum* NCDO 1452 által termelt bakteriocint, mely gátolta az *E. coli*, *Bacillus cereus*, *St. aureus*, *Micrococcus flavus*, *Pseudomonas fluorescens* növekedését. Majd YILDIRIM-nek és JOHNSON-nak (1998) sikerült kimutatniuk egy, a *B. bifidum* NCFB 1454 által termelt inhibitort, melyet bifidocin B-nek neveztek el. Meg kell jegyezni, hogy valójában a bifidocin B az egyetlen, olyan bifidobaktérium által termelt bakteriocin, amelyet sikerült kitisztítani, jellemezni és gátlóhatását bizonyítani a *Listeria*, az *Enterococcus*, a *Bacillus*, a *Lactobacillus* és a *Pediococcus* fajokra. Gram-negatív baktériumokra nézve nem mutat gátló hatást.

Bifidocin B

Az aktivitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a *B. bifidum* NCFB 1454 törzs antimikrobiális anyag (bifidocin B) termelődése az exponenciális szakasz vége felé indult be, és a maximális aktivitását (3200 AU/ml) a késő logaritmikus és a korai stationer fázisban érte el 12-18 óra elteltével. (18-72 órás inkubálás elteltével a felére csökkent a bakteriocin aktivitása. Ennek egyik lehetséges okaként az időközben aktivizálódott endogén extracelluláris proteázokat nevezték meg.) Az antimikrobiális anyagot 70%-os ammónium-szulfátos kicsapással nyerték ki felülúszóból, majd a kapott bifidocin B preparátumot dializálták desztillált vízzel szemben. Gélelektroforézissel (SDS-PAGE) kimutatták, hogy a gátlóanyag tömege 3,3 kDa körül lehet. Plazmid DNS izolálás során megállapították, hogy a bifidocin B-t termelő sejt két plazmiddal rendelkezik, az egyik 8 kb, a másik 17 kb nagyságú. Olyan mutánsokat hoztak létre akriflavin segítségével, melyek elvesztették bakteriocin-termelő képességüket (Bac⁻), de immunisak maradtak vele szemben. A mutáció során elvesztették a 8 kb-nyi plazmidot, így feltételezhető, hogy ezen a plazmidon helyezkednek el a bifidocin B termelést kódoló gének [YILDIRIM *et al.*, 1999]. Aminosav szekvencia vizsgálat kimutatta, hogy a bifidocin B 36 aminosavat tartalmazó polipeptid láncból áll, és pontosan 4432,9 Da a molekulatömege. Ezek alapján a bifidocin B-t a bakteriocinek II. csoportjába sorolták.

A bifidocin B preparátum megőrizte aktivitását -20°C-on vagy -70°C-on 1 vagy 3 hónapig. Ellenállt a hőkezelésnek (90°C, 15 min), aktív volt pH=2-10 között. Savas körülmények között viszont stabilabb, mint lúgos tartományban. Nem tartalmaz lipid és szénhidrát részeket, ezeknek nincs szerepe az inhibícióban, mivel lipázzal, amilázzal, dextranázzal, cellulázzal ill. szerves oldószerekkel végzett kezelés nem okozott észlelhető aktivitásvesztést. Protein természetű lehet, ugyanis tripszin, α -kimotripszin, papain, proteáz és pepszin aktivitásvesztést eredményezett.

A bifidocin B kötődését vizsgálták *Lb. plantarum* sejtekhez. Kiderült, hogy kötődése a *Lb. plantarum* sejtekhez pH függő (maximális rögzülés pH=5,0-7,0), de a hőmérséklettől (0-95°C) és az időtől független. Továbbá oldószeres és enzimes vizsgálatokkal kimutatták, hogy csak a Gram-pozitív törzsek sejtjeivel jött létre az adszorpció. Ennek oka az lehet, hogy csak a Gram-pozitív baktériumok rendelkeznek LTS-sel, amelynek szerepe van a bakteriocin kötődésében. Ez azt is igazolja, hogy miért nem mutat a bifidocin B gátló hatást Gram-negatív baktériumok ellen.

2.4.5 Bakteriocinek hasznosítása az élelmiszeriparban

A bakteriocinek felhasználása az élelmiszeriparban kétféleképpen lehetséges. Egyik lehetőség a bakteriocintermelő tenyészet hozzáadása nem fermentált termékhez, illetve ilyen starterkulturák felhasználása a fermentált élelmiszer előállításánál. A tejsavbaktériumokat széles körben használják fermentált tej- és hústermékek, illetve zöldség készítmények előállítására. A bakteriocin termelő törzsek pedig növelhetnék ezeknek a termékeknek a biztonságát, mivel többről is kimutatták, hogy gátló hatással van olyan Gram-pozitív patogénekre, mint a *L. monocytogenes*, a *St. aureus* és a *Cl. botulinum*. Másik lehetőség, hogy a fermentációval termeltetett bakteriocint a tisztítás után konzerválószerként adják az élelmiszerhez, hogy gátolják

az élelmiszer eredetű patogéneket és a romlást okozó mikroorganizmusok tevékenységét. Számos bakteriocin ellenáll az élelmiszer előállításban használatos viszonylag nagy hőmérsékletek inaktiváló hatásának, és működésképes széles pH tartományban. A bakteriocint általában inaktiválják az emberi emésztőrendszerben található proteolitikus enzimek, és így lebontódik, mint bármely más fehérje. A bakteriocinek nem mérgezőek, szagtalanok, színtelenek és íztelenek [DAESCHEL, 1993; HARLANDER, 1993; CLEVELAND *et al.*, 2001].

A bakteriocinek más tartósítási eljárásokkal együtt is használhatók. Például a szén-dioxid, a nagy hidrosztatikus nyomás vagy a pulzáló elektromos mező és a bakteriocin kombinálása szinergens hatást mutatott a csökkenteni kívánt baktériumokra nézve [ALPAS & BOZOGLU, 2000; POL *et al.*, 2000; NILSSON *et al.*, 2000].

Mivel a bakteriocinek hatásosságát nagyban befolyásolja az élelmiszer mátrix, minden egyes élelmiszer rendszerre szükséges meghatározni a bakteriocin tartósítás hatékonyságát. (Például a zsírok csökkentik, míg a nátrium-klorid, szerves savak növelik a bakteriocinek gátló hatását.) Értékelni kell az oldhatóságot, a stabilitást, az érzékszervi hatást, a hő- és a pH toleranciát, a gátolt mikroorganizmusok típusát és számát, minden egyes bakteriocinre, minden élelmiszerben a különböző tárolási körülmények között [HARLANDER, 1993].

Annak ellenére, hogy a nizin az egyetlen elfogadott illetve engedélyezett bakteriocin, nagy érdeklődés van az élelmiszeripar részéről más hasonló tulajdonságokkal bíró és széles spektrumú gátló hatást mutató bakteriocinek iránt. Az irodalomban már javaslatot tettek számos más bakteriocin élelmiszeripari alkalmazására. Ezeket CLEVELAND és munkatársai (2001) összegezték, amelyet a 4. táblázatban mutatok be.

4. táblázat Bakteriocinek, mint természetes élelmiszertartósítók javasolt alkalmazásai

Bakteriocin	Alkalmazás	Hatás
Pediocin AcH	A termelő <i>Lb. plantarum</i> WHE92 törzset a Munster sajt felületére permetezték az érlelési periódus elején	A permetezés megakadályozta a <i>L. monocytogenes</i> szaporodását
Enterocin 4	A termelő <i>Ec. faecalis</i> törzset starterkultúráként alkalmazták a Manchego sajt gyártása során	A törzs gátolta a <i>Listeria monocytogenes</i> Ohio szaporodását, viszont a <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A törzsét nem
Linocin M-18	A termelő <i>Brevibacterium lines</i> törzset starterkultúráként alkalmazták a rúzsflórával érő sajt érlelése során	10 ² sejtszám csökkenést okozott a bakteriocin a <i>Listeria ivanovi</i> és a <i>L. monocytogenes</i> esetében
Piscicolin 126	A piscicolin 126 használata a <i>L. monocytogenes</i> szaporodásának megakadályozására, fűszeres sonka pástétomban	Sokkal hatásosabb volt, mint a kereskedelmi forgalomban elérhető bakteriocinek
Lactocin 705	Lactocin használata marhahúsban <i>L. monocytogenes</i> szaporodásának gátlására	Gátolta a <i>L. monocytogenes</i> növekedését a húsban
Pediocin AcH	A pediocin termelő <i>Pediococcus acidilactici</i> törzs felhasználása <i>L. monocytogenes</i> gátlására	<i>Pediococcus acidilactici</i> (Ped ⁺) starterkultúra alkalmazása erőteljesen csökkentette a <i>L. monocytogenes</i> csíraszámát a csirke kolbász gyártása során
Pediocin	Pediocin operon kifejezése a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> törzsben	Bor valamint sütőipari termékek tartósítására potenciálisan alkalmas
Pediocin AcH	Pediocin preparátum hozzáadása nyers csirkéhez	28 napig, 5 °C-on gátolta a <i>L. monocytogenes</i> törzs növekedését
Pediocin PA-1	<i>P. acidilactici</i> (Ped ⁺) törzs alkalmazása starterkultúráként kolbász érlelése során	Jelentősen hozzájárult a <i>L. monocytogenes</i> törzs növekedésének gátlásához

2.5 Bifidobaktériumok szöveti adherenciája

A probiotikus törzsek bélnyálkahártyához történő tapadását a kialakuló jótékony egészségi hatás egyik szelektív kritériumának tartják, mivel az immunrendszer modulálása elsősorban a kolonizáló baktériumok és az immunsejtek szoros kapcsolata révén jön létre. A probiotikus baktériumok optimális funkcióinak ellátásához tehát fontos a nyálkahártya felszínéhez történő tartós vagy ideiglenes tapadás. Ámár a nemtapadó baktériumok is kifejtnek jótékony hatásokat a bélrendszeren való áthaladás során, de csak a megtapadt baktériumoktól számíthatunk valódi egészségjavító hatásokra [BENGMARK, 1998; OUWEHAND *et al.*, 2000]. A tapadás során a baktérium egy specifikus epitóp molekulával rendelkezik, amely hozzákötődik az epithel sejtek felületén lévő specifikus receptorokhoz.

2.5.1 *In vitro* modellek tapadási vizsgálatához

A probiotikus törzsek tapadási tulajdonságait nehéz *in vivo* tanulmányozni, ezért különböző *in vitro* modelleket alkalmaznak a tapadó képesség vizsgálatára. A legszélesebb körben alkalmazott modell az intesztinális nyálka (mucus), amelyet preparált humán intesztinális szövetekből, székletből vagy ileostomias folyadékból izolálnak, és a humán bélhámsejtvonalakon alapuló modell [VESTERLUND *et al.*, 2005/b].

A bélnyálkának kettős szerepe van: a nyálkahártyát védi a bizonyos mikroorganizmusoktól, miközben kezdeti tapadási helyeket nyújt, tápanyagforrás és mátrix, amelyen a baktériumok szaporodni tudnak. A nyálka réteg viszonylag vékony (legfeljebb 400 μm) és egy dinamikusan változó állapotot mutat, mivel egyrészt a kehelysejtek állandóan szintetizálják, másrészt folyamatosan lebontódik a bélben. Ennélfogva azok a baktériumok, amelyek képesek a nyálkához tapadni, de nem képesek elérni a bélhámsejteket, a lebomló nyálkával együtt eltávolodnak a nyálkahártya felszínétől és kimosódnak a béltartalommal. Részben ez magyarázza a legtöbb probiotikus baktérium ideiglenes megtelepedését a bélben [KIRJAVINEN *et al.*, 1998]. A nyálka alkotórészei a víz (90-95%), a mucin (~5%), és a lipidek, szabad fehérjék, sók. A mucin a nyálka fő szerves komponense, glikoproteinekben gazdag, fehérjetartalma 20% és szénhidrátartalma 70-80% [JUNTUNEN *et al.*, 2001].

A humán intesztinális sejtvonalakat (például Caco-2, HT-29) sikeresen és eredményesen használják a baktériumok kolonizációs képességének felderítésére *in vitro* modellként. Ezek a sejtvonalak képviselik azokat a sejt fenotípusokat (hámsejt, kehelysejt), amelyek megtalálhatók az emberi bélnyálkahártyában. Mind a Caco-2, mind a HT-29 sejtvonalak az enterocytikus differenciálódás tipikus jellemzőit mutatják. A differenciálódás révén kettő egyértelműen megkülönböztethető terület alakul ki: az apikális membrán és a tight junction-nal tagolt bazolaterális membrán. Ezeknek a területeknek a szerkezete lényegesen eltér fehérje és lipid összetételük miatt. Például az apikális felület (kefeszegély) peptidázokat, diszacharidokat, a bazolaterális régió néhány peptid receptort (amelynek a bél hidroelektrosztatikus szekréciójának irányításában van szerepe) és a tight junction pedig specifikus fehérjéket tartalmaz [GOPAL *et al.*, 2001].

2.5.2 Tapadás mechanizmusa

A bifidobaktériumok és az intesztinális sejtek kölcsönhatásáról számos közleményben beszámoltak (későbbiekben leírok néhány példát), de a tapadás mechanizmusáról még mindig keveset tudunk. A tejsavbaktériumok, elsősorban a *Lactobacillus*-ok esetén több konkrét eredményt találunk a tapadás során kialakult kapcsolatról. A baktériumtapadás kezdetben két felület között kialakult nonspecifikus fizikai kölcsönhatáson alapul, amely ezután specifikus kölcsönhatássá alakulhat a tapadó molekula és a járulékos receptor között [KIRJAVAINEN *et al.*, 1998].

A tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok is különböző felületi elemet tartalmazhatnak, amelyeknek szerepe lehet a bélhámsejtekkel alkotott kölcsönhatásukban. A tejsavbaktériumok tapadási folyamatában a következő tényezők, komponensek vehetnek részt: passzív erők, elektrosztatikus kölcsönhatás, hidrofóbicitás, térbeli erők, LTS, fehérjék, szénhidrátok és specifikus szerkezetek, mint például a lektinnel borított külső, felszíni nyulványok.

Lb. plantarum 104R sejt felületéről tapadást elősegítő fehérje molekulát izoláltak, amelynek a molekulatömegét is meghatározták (29 kDa). *Lb. johnsonii* La-1 törzs Caco-2 sejtekhez történő tapadásáért az LTS felelős, amelyet a sejt falból és a tenyészet felülűszójából is kimutattak. *Lb. animalis* és *Lb. fermentum* sejt felületén lektin-típusú protein szerkezet van, továbbá a *Lb. animalis* sejt falában még ribitol teichoinsavat is detektáltak. Hat különböző *Lb. johnsonii* és *Lb. gasseri* törzsből aggregációt-elősegítő faktor fehérjét azonosítottak, amelyek elhelyezkedése a sejt felületén van és összetétele, tulajdonságai alapján meglehetősen hasonló az S-layer fehérjéhez [SERVIN & COCONNIER, 2003].

BERNET és munkatársai (1993) az általuk vizsgált bifidobaktériumok közül a *Bifidobacterium breve* 4 törzs tapadási mechanizmusát vizsgálták a Caco-2 sejt vonalhoz történő tapadási kísérletekben. Megfigyelték, ha a tenyészet felülűszóját kicserélték friss táplevessel, csökkent (kb. 50%-kal) a baktérium tapadása az intesztinális szövettenyészetbe. Továbbá, ha tripszinnel vagy pronázzal kezelték a baktérium tenyészetet, akkor teljesen megszűnt a törzs tapadóképessége. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a *B. breve* 4 tapadásában egy labilis fehérjeszerű komponens vehet részt, amely mind a felülűszóban, mind a baktériumsejt felületén megtalálható. A tapadásnak ez a mechanizmusa úgy tűnik, hogy különbözik a laktobacillus törzsekétől, amelyek egy fehérjeszerű komponenst választanak ki a tapadáshoz. Hasonló eredményeket kaptak ZHONG és munkatársai (2004) is, akik *Bifidobacterium adolescentis* 1027 törzs tapadási aktivitását vizsgálták. Az általuk izolált fehérje hatását tesztelték enterotoxigenikus, enteropatogén *E. coli* és *Cl. difficile* tapadásának gátlására. OP DEN CAMP és munkatársai viszont (1985) azt a véleményüket fogalmazták meg, hogy egyes bifidobaktériumok intesztinális sejtekhez történő tapadásában a sejt falukban található LTS által közvetített hidrofób kölcsönhatás játszhat fontos szerepet. Megfigyelték, hogy specifikus és reverzibilis a bifidobaktérium LTS kötődés a vastagbél szöveti sejtjeihez. Az LTS a molekula lipid részének észterkötésű zsírsavain keresztül kötődik, mivel a deacetilezett LTS nem mutatott kötődési aktivitást és az albumin is hatásosan gátolta a kötődést. A kötődés specifikusa és a lipid rész fontossága miatt a bélnyálkahártya receptorai nagy valószínűséggel zsírsavkötő helyel

rendelkező fehérjék és glikoproteinek lehetnek. A jó tapadást mutató *Streptococcus*-ok LTS-jához viszonyítva a bifidobaktérium LTS-ben nagyobb az olajsav arány (24% helyett 40%), de ez nem befolyásolja a tapadási aktivitást. (A *Streptococcus* esetén bebizonyosodott, hogy a hámsejten lévő fibronectin, mint membrán receptor vesz részt a kötődésben. A fibronectin képes az LTS megkötésére zsírsavkötő helyeinek köszönhetően.)

BIBILONI és munkatársai (1999) Caco-2 sejtvonalhoz történő tapadási vizsgálataik alapján, amelyekben a baktérium sejteket tripszinnel, kimotripszinnel, kémiai ágensekkel (LiCl, GnCl (guanidin hidroklorid)), nátrium-metaperiodáttal és hővel kezelték, arra a következtetésre jutottak, hogy a sejtfalhoz kapcsolódó glikoproteinek vagy szénhidrát láncok meghatározó szerepet töltenek be a tapadás mechanizmusában. GUEIMONDE és munkatársai (2007) is hasonló kísérletet végeztek, amelyben a lipáz, proteináz K, nátrium metaperiodát és a hőkezelés hatását vizsgálták az általuk alkalmazott *B. bifidum* törzsek tapadó képességére a humán intesztinális nyálkához (mucus). Megfigyeléseik alapján azt a megállapítást tették, hogy a szénhidrátoknak nagyobb szerepük van a tapadásban, mint a fehérjéknek, mert a proteináz és a hőkezelés kisebb csökkenést okozott, mint a nátrium metaperiodátos kezelés. 100°C-on 10 percig történő hőkezelés rávilágított arra, hogy a tapadási faktorok között termolabilis komponensek vannak.

Összegzésként megállapítható hogy a tapadás mechanizmusa jelentősen függ az adott törzs tulajdonságaitól, szerkezetétől, illetve attól, hogy rendelkezik-e a tapadásban résztvevő faktorial, és az kifejeződik-e.

2.5.3 A tapadást befolyásoló tényezők - pH, epesav, emésztő enzimek hatása

Az alacsony pH és az epesavak hatását a probiotikus mikroorganizmusok életképességére már széles körben tanulmányozták, viszont e faktorok hatása a probiotikumok tapadási képességére kevesebb figyelmet kapott. OUWEHAND és munkatársai (2001) a pH és az epesav hatása mellett vizsgálták az emésztőenzimek szerepét is a különböző törzsek tapadó képességére. *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. casei* Shirota, *Lb. johnsonii* La-1, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705 és *B. lactis* Bb-12 tapadóképességének változását térképezték fel a lizozim, 1% epesav, 10% epesav, pepszin, amiláz, lipáz, kimotripszin, tripszin, pankreatin és pH=1,5 kezelés során. A különböző törzseknél eltérő hatásokat figyeltek meg a kezelésekre hatására. A pankreatin, amiláz és a pH=1,5 kezelés kivételével mindegyik kezelésnél kisebb-nagyobb csökkenést tapasztaltak a törzsek tapadási aktivitásában. A pankreatin hatására a *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. johnsonii* La-1, *Lb. rhamnosus* Lc705 és a *B. lactis* Bb-12 törzsek tapadási képessége nem változott a bélnyálkához, míg az alacsony pH esetén az *Lb. johnsonii* La-1 törzsnél szignifikáns (27,3%→42,2%), a *B. lactis* Bb-12 kultúrájánál kisebb (10%→13,7%) növekedést tapasztaltak a tapadási százalékban. Érdekes, hogy az amilázos kezelés mindegyik törzsnél növelte a tapadási arányt, a legnagyobb mértékben *Lb. johnsonii* La-1 törzsnél, a legkisebb mértékben pedig *Lb. casei* Shirota kultúrájánál. A pH és az amiláz által kifejtett növekedés hátterében valószínűleg az áll, hogy a savas kezelés hatására megváltozhatnak a sejt felszínének tulajdonságai, és így

kifejeződésre juthatnak a tapadásért felelős komponensek; az amiláz pedig hidrolizálhatja a sejthártya α -1,4 glikozidos kötéseit és így új tapadási helyek jöhetnek létre.

RIEDEL és munkatársai (2006) bifidobaktérium törzseknél figyelték meg, hogyan hat a pH a baktériumok tapadására Caco-2 sejttenyészethez, ha azt pH=7-ről pH=4,5-re tolják el a tapadás során. Statisztikailag szignifikáns különbséget a nyolc bifidobaktérium törzs közül háromnál találtak. Egyedül a *Bifidobacterium longum* NCC 2705 törzs esetén detektáltak pH=4,5-nél szignifikánsan nagyobb tapadást, mint pH=7-nél. *Bifidobacterium bifidum* NCC189 és S17 törzseknél pedig fordított esetet tapasztaltak. A többi öt törzs közel azonos tapadást mutatott a két különböző pH értéken. Tehát ebben az esetben is megmutatkozott a tapadó képesség törzs- és fajspecifikussága.

Szerzett epesav rezisztenciával rendelkező bifidobaktérium törzsek (*B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum*) általában nagyobb tapadást mutatnak a humán bélnyálkához, mint az eredeti törzsek mind epesav nélkül, mind epesav jelenlétében. Szembetűnő, hogy az epesav nélküli tapadási rendszerben a törzsek 1,4 – 4-szer nagyobb tapadást produkáltak, mint az eredeti törzsek. GUEIMONDE és munkatársai (2005) hipotézise szerint az epesavak megváltoztathatják a sejthártya hidrofób komponenseit, de az is lehetséges, hogy az epesavak kölcsönhatásba lépnek a bélnyálkán vagy baktériumon lévő receptor molekulákkal.

2.5.4 A tapadást elősegítő tényezők – hidrofobicitás, autoaggregáció

A sejtfelszín hidrofobicitása és az intesztinális nyálkahártyához történő tapadó képesség között nem találtak egyértelmű összefüggést sem a probiotikus sem a vizsgált bifidobaktériumok között [OUWEHAND *et al.*, 1999; GUEIMONDE *et al.*, 2005]. Néhány *Lactobacillus* esetén WADSTROM és munkatársai (1987) figyelték meg bizonyos összefüggést a hidrofobicitás és az adhézió között. DEL RE és munkatársai (1998; 2000) pedig arról számoltak be, hogy a hidrofobicitás mérésére több módszer is létezik és valószínű ezért nincs egyértelmű, pontosan meghatározott definíciója a baktérium hidrofobicitásnak. Ezen okok miatt más összefüggést kerestek, amellyel esetleg egy előzetes szelekció is végezhető a potenciálisan tapadó baktériumok között. Első ízben *Bifidobacterium suis* törzsek, majd tizenhárom *B. longum* aggregációs képességét vizsgálva kimutatták, hogy az autoaggregáció szoros kapcsolatban van a tapadó képességgel. PÉREZ és munkatársai 1998-ban szintén leírták ezt az összefüggést, amikor *B. bifidum* törzsek aggregációs és tapadási képességét vizsgálták.

2.5.5 Bifidobaktériumok tapadó képessége

A *Lactobacillus*-okhoz hasonlóan a *Bifidobacterium*-ok tapadó képessége is törzs- és fajspecifikusságot mutat. BERNET és munkatársai (1993) is megállapították, hogy nem minden *Bifidobacterium* törzs rendelkezik ezzel a képességgel, számos törzsük gyengén vagy nem kötődik bélhámsejtekhez. Az általuk vizsgált 13 törzsből összesen három törzs *B. breve* 4, *B. longum* 16 és *B. infantis* 1 fejtett ki jelentős mértékű tapadó képességet a Caco-2 bélhámsejthez, míg a *B. breve* 5 és 25, *B. longum* 18 és 22, és a *B. bifidum* 7 és 8 jelzésű törzsek gyengén tapadtak. Továbbá megállapították, hogy a bifidobaktériumok tapadásához nem

szükséges kalcium. RIEDEL és munkatársai (2006) által vizsgált bifidobaktériumok szintén törzsfüggő tapadó képességet mutattak a Caco-2 sejtvonalhoz. Kettő *B. bifidum* kultúránál jó tapadást, *B. lactis*, *B. longum*, *B. adolescentis* esetén közepes, a *Bifidobacterium infantis longum* törzsnél pedig gyenge tapadási aktivitást detektáltak. DEL RE és munkatársai (2000) 13 *B. longum* törzset vontak be tapadási vizsgálataikba. A törzsek tapadó képességénél nagy változatosságot tapasztaltak, nyolc törzs mutatott különböző mértékű tapadást, amelyből három kiemelkedett, a többi öt törzs esetén nem detektáltak tapadást. Továbbá megfigyelték, hogy a törzsek tapadásának fontos tényezője azok autoaggregációs képessége és hidrofóbicitása is. HE és munkatársai (2001/a) 24 *Bifidobacterium* spp. vizsgálata során nem találtak szignifikáns különbséget a taxonómiai fajok (*B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*) humán bélnyálkához történő tapadási képessége között, ami szintén arra utal, hogy a tapadás az egyes törzsek sajátos tulajdonsága. A tesztelt törzsek tapadási mértéke 0,5 és 9,3% között változott.

A bifidobaktériumok közül ki kell emelnem a *B. lactis* Bb-12 probiotikus tulajdonságokkal rendelkező törzset, amelyhez az előbb említett, de más közleményekben is relatív nagy tapadási aktivitást társítanak. A törzs tapadási aktivitása megközelíti a legjobb tapadási képességgel rendelkező *Lactobacillus* törzsekét, mint például *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. casei* (Fyos), *Lb. johnsonii* La-1 [KIRJAVAINEN *et al.*, 1998; OUWEHAND *et al.*, 2000; JUNTUNEN *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2001/a]. Továbbá *B. lactis* Bb-12 tapadó képességének fokozódását figyelték meg, ha *Lb. rhamnosus* GG vagy *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* törzsszel együtt alkalmazták [OUWEHAND *et al.*, 1999].

Az izolált bifidobaktériumok tapadó képessége a kor előrehaladtával fokozatosan csökken. HE és munkatársai (2001/b) vizsgálataiból, amelyekben felnőttekből (30-40 éves) és idősebb emberekből (70 év fölött) izolált bifidobaktériumok tapadását vizsgálták intesztinális nyálkához, kiderült, hogy a felnőttekből izolált bifidobaktériumok (*B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*) nagyobb tapadást mutatnak, mint az idősebből izoláltak (*B. adolescentis*, *B. longum*). Az idősebb egyénekből származó *Bifidobacterium* biota csökkent tapadási aktivitását főként a kevésbé tapadó, túlsúlyban lévő *B. adolescentis* faj okozza. Másrészt a kor előrehaladtával az intesztinális nyálka (mucus) néhány tulajdonságát elveszíti, amely szükséges az endogén baktériumok tapadásához, illetve a bifidobaktériumok tapadásának támogatásához. Más tanulmányokban, ahol a csecsemő és felnőtt preparált nyálkához vizsgálták a probiotikus törzsek kötődését, csak csekély (nem szignifikáns) különbséget tapasztaltak a törzsek tapadó képessége között a különböző eredetű intesztinális nyálkához [KIRJAVAINEN *et al.*, 1998]. Számos publikáció foglalkozik a probiotikumok és a bifidobaktériumok tapadási aktivitásának változásával allergiában, ulcerative colitis-ben, vagy egyéb bélbetegségekben szenvedő pácienseknél. Megállapításaik rávilágítanak arra, hogy az egyes törzsek eltérő tapadó képességet mutatnak a különféle bélbetegségek esetén, vagyis a tapadás mértéke egy adott törzs esetén függ az egyén egészségi állapotától [HE *et al.*, 2001/c; VON WRIGHT *et al.*, 2002; OUWEHAND *et al.*, 2003].

2.5.6 Gasztrointesztinális patogének tapadásának gátlása

A jótékony bélmikrobiota egyik fontos funkciója, hogy a patogén baktériumok kolonizációjával szemben védő hatást fejtsen ki a gasztrointesztinális szakaszban. A laktobacillusok tapadása és a patogének versengő kizárása, illetve kirekesztése az intesztinális szakaszról jól dokumentált. Ezzel szemben a bifidobaktériumok hatásának felderítése a patogén baktériumok tapadására kutatási stádiumban van. BERNET és munkatársai (1993) által kiválasztott törzsek (*B. breve* 4, *B. infantis* 1, *B. longum* 4 és 16) mindegyike gátolta a patogének (DAEC (diffúzan adheráló *E. coli*), EPEC (enteropatogén *E. coli*), ETEC (enterotoxint termelő *E. coli*), *Sa. Typhimurium*) tapadását és betörését a Caco-2 hámsejtbe. A gátlás mértéke függött a bifidobaktériumok koncentrációjától, nagyobb koncentráció nagyobb gátlást hozott létre. A legjobb tapadást mutató *B. breve* 4 törzs 10^8 tke/ml koncentrációban 50%-os gátlást fejtett ki mindegyik patogénre. A gátlási mechanizmusra vonatkozóan két hipotézist állítottak fel a szerzők, az egyik a patogének kizárása a specifikus kötőhelyekért történő versengéssel, a másik a baktérium biofilm kialakulása, amely meggátolja, hogy az enterovirulens mikroorganizmusok hozzáférjenek a bélnyálkahártya felszínéhez. GAGNON és munkatársai (2004) az általuk izolált *B. bifidum* RBL 71 és RBL 460, és *B. pseudolongum* típusú törzsek antagonista hatását figyelték meg az *Escherichia coli* O157:H7 törzs tapadására és növekvő sejtszámuk (10^6 - 10^7 - 10^8 tke/lyuk) jelenlétében fokozatosan növekvő gátlást tapasztaltak. Az *E. coli* tapadásának csökkenése azonos nagyságrendű volt, attól függetlenül melyik bifidobaktérium törzssel együtt tesztelték. 10^8 tke/lyuk bifidobaktérium koncentráció több mint 50%-os gátlást mutatott. Ugyanakkor a Caco-2 sejtenyészeten megtapadt bifidobaktérium koncentráció is csökkent az *E. coli* O157:H7 törzs jelenlétében. Kb. 10^7 tke/lyuk hozzáadott bifidobaktérium szám esetén *B. bifidum* RBL 460-nál $2,1 \cdot 10^6$ tke/lyuk, a *B. bifidum* RBL 71-nél $4,6 \cdot 10^5$ tke/lyuk és a *B. pseudolongum* törzsnél pedig $1,3 \cdot 10^6$ tke/lyuk sejtkoncentráció csökkenést tapasztaltak az *E. coli*-val történő tapadási vizsgálat során. Feltételezik, hogy a térbeli gátlásnak nagyobb szerepe van a patogének tapadásának gátlásában, mint a specifikus receptorok lekötésének.

Más bifidobaktérium törzsek esetén is megfigyeltek gátlási mechanizmust a tapadás során. *Bifidobacterium* spp. CA1 és F9 gátolta a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium behatolását a Caco-2 sejtbe [LIÉVIN *et al.*, 2000]; *B. lactis* DR-10 törzs gátolta az *E. coli* O157:H7 törzs kötődését az intesztinális sejthártyához és csökkentette behatoló képességét [GOPAL *et al.*, 2001]. *In vitro* eredmények mellett *in vivo* eredményeket is találunk az irodalomban. C3He/Oujco gnotobiotic egérben *Bifidobacterium* spp. CA1 és F9 törzsek kolonizálódtak és megvédték az egeret a *Sa. Typhimurium* C5 halálos fertőzésével szemben, tehát hozzájárultak a nagyobb védőgát kialakulásához [LIÉVIN *et al.*, 2000]. *B. lactis* HN019 adagolása BALB/c egereknek szintén növelte a védekező hatást a *Sa. Typhimurium*-mal szemben. Tízszerezésre nőtt a túlélési arány, súlynövekedést tapasztaltak és a patogén törzs transzlokációja a lépbe és a májba csökkent [SHU *et al.*, 2000]. E törzs esetén hasonló hatást figyeltek meg az *E. coli* O157:H7 törzsszel szemben is. Szignifikánsan nagyobb volt a fagocitáló sejtek aránya a vérben és a hashártyában, továbbá az IgA termelődése nőtt az intesztinális szakaszban [SHU & GILL, 2001]. *B. breve* (Yakult) törzs fertőzés ellenes hatását *Sa. enterica* serovar Typhimurium-mal szemben patkány

modellben mutatták ki [ASAHARA *et al.*, 2001]. *B. lactis* Bb-12 kultúra más baktériumtörzsekkel együtt antitumor aktivitást fejtett ki egerekben, amelyekben Sarcoma 180 és Lewis Lung Carcinoma LLC1 segítségével keltettek tumort. A Sarcoma 180 esetében a *B. lactis* Bb-12 51,3%-os tumorgátlást mutatott, míg az LLC1 esetében a tumorgátló hatás 35,1%-os volt [KIM *et al.*, 1991].

2.5.7 Tapadás detektálására alkalmas módszerek

Jelenleg különböző vizsgálati módszereket alkalmaznak a baktériumok hámsejtekhez történő tapadásának detektálására. A leggyakrabban alkalmazott módszerek a Gram-festés, a radioaktív jelölés és a lemezöntéses módszer, de mint minden módszer, ezek is rendelkeznek néhány korlátozó tényezővel [LE BLAY *et al.*, 2004]. A Gram-festéssel nem lehet megkülönböztetni az ugyanabba a Gram-csoportba tartozó baktériumokat, a vizsgálat időigényes a fénymikroszkópos elválasztás, illetve számlálás miatt, amelyből kifolyólag a szubjektivitás is érvényesül és így a kapott eredmények nagy szórással rendelkeznek. A mikroszkópos számlálás helyett alkalmazható képanalízis is, de a csomókat nem tudja elkülöníteni és a kiértékeléshez jó minőségű digitális képek szükségesek [TUOMOLA & SALMINEN, 1998]. A radioaktív jelölés sokkal pontosabb és reprodukálhatóbb, mint az előbb említett módszer, és kevert kultúra esetén is jól használható, de a radioaktivitás káros hatása miatt speciális kísérleti hely/körülmény (izotóp labor) szükséges a vizsgálathoz. Továbbá a cpm (counts per minute) arány nem stabil, valamint a sejteket a radioaktív jelölésre alkalmazott vegyület jelenlétében kell felszaporítani és így nehéz ugyanazt az állapotot elérni [VESTERLUND *et al.*, 2005/a]. A lemezöntést hagyományos módszernek tekintik, időigényes, anyagigényes (különböző szelektív táptalajok), a sejteknek kitenyészhető állapotban kell lenni, ugyanakkor nagyon érzékeny (10^2 tapadó baktérium kimutatható). E módszereken kívül egyre inkább elterjedtek és alkalmazottak az ELISA-n és a fluorimetrián alapuló módszerek. Az ELISA módszer előnyét az adja, hogy nagy mintaszámú kísérletekben is használható, sikeresen alkalmazzák sejtvonalaknál, valamint a tenyésztőedénybe rögzített hámsejteknél. Viszont a módszer hátrányokat is rejt: előfordulhat keresztreakció, specifikus ellenanyag szükséges, amelyek hozzáférhetősége korlátozott, és az élő/holt sejteket nem tudja megkülönböztetni [LE BLAY *et al.*, 2004]. A fluorimetriás technikát a radioaktív jelölés kiváltására, helyettesítésére lehet alkalmazni. Szintén pontos, reprodukálható módszernek tekintik, és nem igényel speciális körülményeket. Ugyanakkor a radioaktív jelöléssel szemben hátrányként jelentkezik, hogy a fluoreszcens jelölés megváltoztathatja a baktérium felszínét és életképességét [BIANCHI *et al.*, 2004; VESTERLUND *et al.*, 2005/a].

2.6 Erjesztett probiotikus termékek tervezése

A mikroorganizmusok segítségével történő erjesztések az élelmiszer-tartósítás legősibb eljárásai közé tartoznak és ma is az élelmiszer-feldolgozás egyik meghatározó eleme. A kenyér, sör, bor, sajt és egyéb tejtermékek előállítása az emberi kultúrák kezdetéig visszavezethető. A fermentált élelmiszerek előállítása kezdetben spontán fermentáción alapult, amely a nyersanyag által hordozott természetes mikrobiota tevékenysége révén jött létre. A termék minősége a nyersanyag

mikrobiológiai spektrumától függött. Áttörést jelentett a fermentált élelmiszerek előállításánál a szelektált törzsek (tisztá tenyészetek, starterkultúrák) használata, amelyek segítségével egy szabályozott, ellenőrzött erjesztési folyamat valósult meg és egységes minőségű végterméket eredményezett. E jellegzetes fiziológiai és metabolikus tulajdonságokkal rendelkező törzseket természetes környezetből vagy sikeres fermentált termékekből izolálták [LEROY & DE VUYST, 2004]. A fermentáció számos előnyt nyújthat az élelmiszerek, illetve az alapanyagok számára. Néhány példát említenék: (1) Az élelmiszerek választékának növelése. Például tejből, mint alapanyagból sokféle sajt és más tejtermék állítható elő a különböző mikroorganizmusok segítségével. (2) Tápérték és minőség javulása. Az erjesztés során a mikroorganizmusok számos antinutritív anyagot (pl. fitát, lektinek) lebontanak, valamint a növelik az alapanyagokban található ásványi anyagok hozzáférhetőségét. A mikroorganizmusok kedvező anyagcsere termékeik révén gazdagítják a termék beltartalmi és élvezeti értékét. (3) Eltarthatóság növelése. A mikrobák bizonyos anyagcsere termékei növelik az eltarthatóságot, visszaszorítják a romlást okozó mikroorganizmusokat. (4) Emészthetőség javítása. A mikroorganizmusok részben lebontják az élelmiszerek makromolekuláit (fehérjék, poliszacharidok, zsírok) és így növelik az emészthetőséget. Például a laktóz intoleranciás egyének az erjesztett tejtermékkel szemben nagyobb toleranciát mutatnak, mivel ezek laktóz tartalmát a tejsavbaktériumok nagyrészt tejsavvá erjesztik. (5) Funkcionális termékek előállítása. Sok erjesztett élelmiszer (pl. kefir, joghurt, probiotikus tejtermékek) immunmoduláló vagy az egészséges bélrendszer mikrobiotájának megőrzését szolgáló összetevőt tartalmaz [DEÁK, 2006].

A funkcionális élelmiszerek egyik dinamikusan fejlődő területe a probiotikus élelmiszerek előállítása és a probiotikumok tanulmányozása. Ezen élelmiszerek kínálata folyamatosan növekszik minden európai országban és piaci értéküket gyakran 1 milliárd € körülire becsülik. A probiotikus baktériumokat főként a fermentált élelmiszerek tartalmazzák, amelyeknek jelentős szegmensét az erjesztett tejtermékek alkotják.

2.6.1 A probiotikumok alkalmazásának feltételei

A probiotikumoknak a kívánt egészségi és klinikai tulajdonságok mellett teljesíteniük kell néhány alapkövetelményt, hogy probiotikus termékek előállítására alkalmazhatóak legyenek. A legfontosabb követelmények, hogy a termékben a probiotikus baktériumok megfelelő sejtkoncentrációban életképesek maradjanak a fogyasztásig, a fizikai és genetikai stabilitásukat megőrizték, és a törzsnek/törzseknek a termék előállítása és tárolása során megmaradjanak azon funkcionális tulajdonságai, amelyek fontosak a kívánt egészségi hatás kiváltásában. Továbbá a probiotikum a termék ízét és aromáját nem befolyásolhatja kedvezőtlen irányba és a termék savasságát nem növelheti a fogyaszthatósági idő alatt. Végül a probiotikus törzs egyértelmű azonosítására alkalmas módszert közölni kell [HELLER, 2001].

A probiotikumok az élelmiszer előállításba történő bevonásánál figyelembe kell vennünk néhány olyan tényezőt, amelyek befolyásolhatják a felhasznált törzs túlélését a termékben, illetve aktiválódását, ha a gastrointesztinális szakaszba kerül. Ezek a faktorok: (1) a probiotikus törzs fiziológiai állapota, (2) a termék kémiai összetétele, amelybe a probiotikumot tesszük, illetve

használjuk, (3) a probiotikus törzs kölcsönhatása más starter kultúrákkal vagy egyéb mikroorganizmusokkal [HELLER, 2001; LEROY & DE VUYST, 2004; ROSS *et al.*, 2005].

2.6.1.1 A probiotikum életképességét befolyásoló hatások

A probiotikus kultúraként alkalmazott törzsek előzetes vizsgálata, sav- és epetűrés tesztekkel, hasznos információval szolgálhat az emésztőrendszeren való áthaladás közben várható pusztulás előrejelzésére. Továbbá a stresszhatásokkal (pl. sav, oxigén tenzió) szembeni ellenálláson alapuló szelekció hasznos a fermentált élelmiszerek előállítás-technológiájának fejlesztésénél [ROSS *et al.*, 2005]. HOOD és ZOTTOLA (1988) vizsgálata azt mutatta, hogy a *Lb. acidophilus* tenyészetnek egyetlen sejtje sem tudott regenerálódni, ha két órán át 2-es pH-nak volt kitéve, viszont 4-es pH-n nem csökkent jelentősen az élő sejtszám két óra után sem. Ugyanezt a jelenséget tapasztalták, amikor *Lb. rhamnosus* GG túlélését vizsgálták humán gyomorsavban pH=1 és pH=7 között. Általában a *Bifidobacterium* tenyészetek kevésbé savtoleránsak, mint a *Lactobacillus* kultúrák, és ez tükröződik az emberi gyomorsavval szembeni csökkent ellenállásban is [DUNNE *et al.*, 1999]. MODLER (1994) kimutatta, hogy a bifidobaktérium populáció sejtkoncentrációja 10^9 tke/ml értékről kevesebb, mint egy hét alatt képes lecsökkeni nullára a kis pH-jú (pH=3,9-4,0) joghurtban. A stressznek kitett kultúrák nagyobb túlélőképességet mutatnak az epesav és gyomorsav jelenlétében, mint más izolátumok. CHOU és WEIMER (1999) által izolált sav és epe rezisztens *Lb. acidophilus* variánsok teljesen eltérő tulajdonságokat mutattak, mint a szülői kultúrák. PARK és munkatársai (1995) kimutatták, hogy a sav rezisztenciával rendelkező *Bifidobacterium breve* törzs nagyobb túlélőképességet mutatott a nem-rezisztens törzsekhez képest nemcsak a savas környezetben, hanem más környezeti hatások között is, mint például hidrogén peroxid jelenlétében és hűtve tárolás során.

A savas körülményekhez való hozzászoktatás sikeres volt arra vonatkozóan, hogy javítsák az *Lb. acidophilus* kultúra túlélését rendes körülmények között letálisan savas környezetben, valamint joghurtban [SHAH, 2000]. A savas stresszre adott reakcióban résztvevő gének, mint például a *F₁F₀-ATPáz* kifejeződésével kedvező irányú változás történt a kultúrák teljesítményében [ROSS *et al.*, 2005].

A másik stresszhatás (elsősorban anaerobok számára kedvezőtlen), amellyel a probiotikus mikroorganizmus szembekerülhet az élelmiszerfejlesztés alatt, az az oxigén stressz. Az oxigén könnyen beoldódik az alapanyagba, például a tejbe és így befolyásolhatja a mikroorganizmusok életképességét a termékben. Továbbá az oxigén a csomagoláson keresztül is bekerülhet a termékbe [SHAH, 2000]. AHN és munkatársai 2001-ben tanulmányozták az oxigén stresszhatását *B. longum* törzsre és vizsgálataik során felfedezték az „Osp” fehérjét, amely magasabb szintű kifejeződést mutatott az oxigén-toleráns *Bifidobacterium* törzsben. Megállapították, hogy az oxidatív stressz által indukált „Osp” megnövekedett szintje lehetőséget ad a probiotikus baktériumok oxigén toleranciájának fokozására.

A probiotikumok fiziológiai állapota fontos mind a szaporodóképesség, mind a fermentáció során jelentkező hatásokkal szembeni ellenállóképesség szempontjából. Néhány vizsgálat kimutatta, hogy a logaritmusos fázisból származó baktériumok sokkal érzékenyebbek a környezeti stresszhatásokra, mint a stacioner fázisból származók [HELLER, 2001].

Amennyiben a kiválasztott probiotikum életképessége gyenge a gyártási folyamat során, vagy nem rendelkezik megfelelő ellenálló képességgel az emésztőrendszerben fellépő stresszhatásokkal szemben, akkor immobilizálással megvédhető és életképessége fokozható [SULTANA *et al.*, 2000]. A sejtek rögzítésére egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a gélbezárás, ahol elsősorban zselatin, alginát, karragenát polimerekkel történik a rögzítés. A mikrokapszulázás egy másik lehetséges módszer, ahol pl. a rezisztens keményítőhöz a bifidobaktériumok képesek hozzátapadni és egy megfelelő tapadás esetén hidrolizálni is tudják.

2.6.1.2 A probiotikum és az élelmiszermatrix kapcsolata

A probiotikus termékeket általában azon elképzelés alapján szabványosítják (standardizálják), hogy az életképesség a probiotikus aktivitás ésszerű mércéje, és így a törzs azon képessége, hogy magas sejtkoncentrációt érjen el, elsődleges fontosságú. A kutatók úgy vélik, hogy 10^8 - 10^9 élő sejt napi bevitele szükséges a terápiás hatás elérése érdekében, amelyet legalább 100 gramm 10^6 - 10^7 tke/ml élő sejtszámot tartalmazó termék napi fogyasztásával lehet elérni [BLANCHETTE *et al.*, 1995; GOMES & MALCATA, 1999]. A probiotikus termék fejlesztése során kiemelt fontosságú az élelmiszermatrix megválasztása, ugyanis a mikroorganizmusok intenzív kapcsolatban állnak a környezetükkel azáltal, hogy felvesznek onnan számukra fontos tápanyagokat, valamint anyagcsere termékeket választanak ki. Ennélfogva az alapanyag kémiai összetétele kiemelkedő jelentőségű a mikroorganizmus megfelelő, zavartalan anyagcsere tevékenysége szempontjából [HELLER, 2001; CHARALAMPOPOULOS *et al.*, 2002]. A *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzseknek komplex tápigényük van: szaporodásukhoz szénhidrátokra, aminosavakra, peptidekre, zsírsav észterekre, ásványi anyagokra, nukleinsav származékokra és vitaminokra van szükség. A tápanyagigény fajonként változó [CHARALAMPOPOULOS *et al.*, 2002].

2.6.1.3 A felhasznált mikrobák kölcsönhatásának szerepe

A mikroorganizmusok közti kölcsönhatások lehetnek egymásra nézve közömbösek, kedvezőek vagy kedvezőtlenek. A mikroorganizmusok egymásra gyakorolt hatása a tápanyagok hasznosításában és anyagcsere termékek kibocsátásában jelentkezik, valamint hat a populációk élettani tevékenységére. Az egyik gyakori eset a vetélkedés a tápanyagokért, azonban lehetséges az is, hogy egy mikroorganizmus elősegíti mások szaporodását számukra felhasználható tápanyagok biztosításával. Másik gyakori kölcsönhatás, hogy az egyik mikroorganizmus tevékenysége hátrányos vagy gátló mások számára egyes anyagcsere termékeik révén [DEÁK, 2006].

Ismereteink még nem teljes körűek e kölcsönhatásokról, de mind antagonista, mind szinergista hatás megfigyelhető a probiotikumok és a starterkultúrák között. Például a klasszikus joghurt kultúrák (*Str. thermophilus* és *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) között szinergista hatás érvényesül, amely megmutatkozik a gyors és hatásos savanyításban és a törzsek sejtszám növekedésében, amely az egymásra ható anyagcsere tevékenységen alapul [HELLER, 2001]. Például a Fresco sajtban lévő egyéb probiotikus baktériumok jelenléte hatott a bifidobaktériumok

életképességére és a legmagasabb sejtkoncentrációt a *B. bifidum*, *Str. thermophilus*, *Lb. casei* kombináció eredményezte [VINDEROLA *et al.*, 2000].

Az antagonizmus gyakran olyan metabolikus összetevők termelésén alapul, amely gátolja vagy inaktíválja a rokon starterkultúrákat vagy még a nem-rokon baktériumokat is. Ilyen antagonista hatást kifejthetnek a tejsavbaktériumok által termelt szerves savak (tejsav, ecetsav, propionsav), hidrogén-peroxid, benzoésav, biogén aminok és bakteriocinek [SIEBER *et al.*, 1995; LEUSCHNER *et al.*, 1998].

VINDEROLA és munkatársai (2002) vizsgálták a bifidobaktériumok és a tejsavbaktériumok közötti kölcsönhatásokat. Megállapították, hogy a probiotikumok (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Bifidobacterium* törzsek) inkább gátolták a starter tejsavbaktériumokat (*Str. thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* törzsek), mint fordítva, ugyanis azok csak néhány esetben fejtettek ki gátló hatást a probiotikumokra. Négy különböző viselkedést tapasztaltak közöttük: stimulálást, növekedés lassítását, növekedés teljes gátlását, semmilyen hatást. A legtöbb vizsgált bifidobaktérium törzs felülűszoja gátolta a *Lb. acidophilus*-t és gyengén gátolták a *Str. thermophilus*-t, valamint a *Lc. lactis*-t. Ugyanakkor néhány bifidobaktérium törzs koncentrált felülűszoja stimulált egyes *Lb. acidophilus* törzseket. Korábban megfigyeltek a *Lb. acidophilus* és a *B. bifidum* között szinergista, növekedést serkentő hatásokat. A bifidobaktériumok nem gátolták sem a *Lb. casei*-t, sem a *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*-t. A bifidobaktérium törzsek szaporodására nem fejtettek ki gátló hatást a tejsavbaktériumok.

2.6.1.4 A starterkultúrák hatása a termék jellemzőire

A tejsavbaktériumos erjesztés javítja a termék érzékszervi tulajdonságait, amely függ a tejsav, ecetsav és néhány aromát meghatározó illékony komponens, mint például a magasabbrendű alkoholok, aldehidek, etilacetát és diacetyl mennyiségétől. A tejsavas erjesztés végtermék eloszlása függ a szubsztrát kémiai összetételétől (szénhidrát tartalom, elektron akceptor jelenléte, nitrogén felhasználhatósága) és a környezeti körülményektől (pH, hőmérséklet, oxigén tenzió). A törzs kiválasztásánál kritériumnak kellene tekinteni az aroma kialakítás szempontjából fontos anyagcsere termékek összetételének szabályozhatóságát [DAMIANI *et al.*, 1996, VAN KRANENBURG *et al.*, 2002, HANSEN & HANSEN, 1994; CHARALAMPOPOULOS *et al.*, 2002]. A monokultúrával fermentált probiotikus termékek kevésbé elfogadottak a fogyasztók körében, mert meglehetősen savanyú ízük van. A termék aromájának javítására más törzseket is bevonnak a termék előállításba, amelyek kedvezően befolyásolják a termék érzékszervi tulajdonságait [SAARELA *et al.*, 2000]. A tejsavas fermentáció legtöbb esetben javítja az alkalmazott alapanyag táplálkozási értékét és emészthetőségét. Cereáliák esetén javítja a fehérjék felhasználhatóságát, növeli a riboflavin, tiamin, niacin és a lizin mennyiségét; segíti a tejben a laktóz, vagy a szójában lévő raffinóz, sztachióz, verbaszkóz lebontását [LORRI & SVANBERG, 1993; HOU *et al.*, 2000; HOLZAPFEL, 2002].

2.6.2 Növényi eredetű élelmiszerek fejlesztése

A tejsavas erjesztett élelmiszerek a mai napig a legnagyobb mennyiségben és a legszélesebb termékválasztékban készülő fermentált élelmiszerek.

A probiotikus termékek/élelmiszerek jelentős szegmensét a tejalapú készítmények (joghurt, savanyú tej, kefir, különböző sajtok, tejalapú gyümölcsitalok) alkotják. Magyarországon is egyre többféle probiotikus tejalapú készítmény (joghurt, joghurtital, kefir, sajt, túró) kapható. A probiotikus fermentált tejtermékek folyamatos kutatás tárgyát képezik a táplálkozási és egészségügyi hatások feltárására. Olyan tejalapú készítmények kifejlesztése a cél, amelyek terápiás célra is alkalmazhatók. Például a Valio cég (Finnország) létrehozta az első vérnyomást csökkentő fermentált tejet, az Evolus[®]-t [VALIO, 2006].

A probiotikumok illetve probiotikus élelmiszerek iránti igény azon fogyasztók részéről (elsősorban a fejlett országokban élők) is megjelent, akik egészségi állapotuk (tejfehérje allergiában, laktóz intoleranciában szenvedők), vagy meggyőződésük miatt (vegetáriánusok) nem, illetve korlátozott mértékben fogyasztanak tejalapú készítményeket. Erre kínál megoldást a gyümölcs-, a zöldség- és a szója alapú probiotikus termékek fejlesztése, illetve a probiotikus élelmiszerek skálájának bővítése [HEENAN *et al.*, 2002; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2008]. Természetesen a nem tejalapú élelmiszerek felsorolásából nem szabad kihagyni a cereáliák felhasználásával készült tejsavasan fermentált élelmiszereket (pl. ital, zabkása) sem, amelyek előállításának és fogyasztásának elsősorban Afrikában és Ázsiában vannak hagyományai [ANGELOV *et al.*, 2006; BLANDINO *et al.*, 2003].

A gyümölcsök és a zöldségek tartalmaznak speciális tápkomponenseket, ez azt sejteti, hogy a belőlük készült levek, mint tápközegek ideálisak a probiotikus törzsek számára. Jellegzetes ízprofilal rendelkeznek, amely általában minden korcsoport számára kellemes és részét képezik az egészséges táplálkozásnak. A gyümölcsök és a zöldségek gazdagok funkcionális élelmiszer komponensekben, mint például ásványi anyagok, vitaminok, élelmi rostok, antioxidánsok és nem tartalmaznak allergéneket, így mindenki által fogyaszthatók [BRANDT *et al.*, 2004; LUCKOW & DELAHUNTY, 2004; HERRMANN, 2001]. A zöldségek közül két gyökér- és egy gumós zöldséget emelnék ki: a sárgarépat és a céklát, amelyek ásványi anyag és antioxidáns tartalma kiemelkedő, és a csicsókát, amelynek fogyasztása méltánytalanul háttérbe szorult, pedig a szervezetre kifejtett hatásai nagyon kedvezőek.

2.6.2.1 Probiotikus termékek fejlesztéséhez kiválasztott nyersanyagok jellemzése

Sárgarépa (*Daucus carota*): A sárgarépa a legrégebb kultúrnövényeink egyike, hiszen már a görögök és a rómaiak is termesztették. Táplálkozás-élettani szempontból a gyökérzöldségek közül a sárgarépa jelentősége a legnagyobb [SOMOS, 1983]. A sárgarépa nagy mennyiségben tartalmaz káliumot (323-360 mg/100g), kalciumot (27-28 mg/100g), vasat (0,5-0,7 mg/100g), foszfort (43-50 mg/100g) és nátriumot (70-125 mg/100g). Jelentős a magnézium tartalma (27-35 mg/100g) is, mely fontos ásványi anyag a nehéz fizikai munkát végzők, a rendszeresen sportolók és a komoly szellemi tevékenységet folytatók számára. Magas ásványi anyag tartalma révén kiválóan alkalmas a vér savtalanítására, valamint a máj tisztítására is. Szénhidrát-tartalmát (8,1 g/100g) főleg szacharóz (3,65 g/100g), glükóz (0,9 g/100g) és fruktóz (0,65 g/100g) alkotja és tartalmaz még cukoralkoholokat (mannit és xilit). A savak közül az almasav tartalom emelkedik ki, ezt követi a citromsav, kininsav, fumársav, borostyánkősav és a borkősav tartalom.

Ezekon kívül még oxálsavat is tartalmaz [HERRMANN, 2001; SZABÓ, 2001; KONTRASZTI *et al.*, 2005].

Táplálkozási szempontból a sárgarépa legnagyobb értéke karotinoid tartalmában (6-20 mg/100g) rejlik. Az összkarotinoid több mint 50%-át a β -karotin alkotja, továbbá 20-40% α -karotint, 2-7% ζ -karotint és 1-2% γ -karotint, illetve β -zeakarotint tartalmaz (HERRMANN, 2001). A béta-karotint fontos antioxidánsként tartják számon. Szerepet játszik a szervezet védelmében, részt vesz a szabad gyökök károsító hatásának megakadályozásában, amelyek többek között felelősek bizonyos rákos megbetegedések és az érlemeszesedés kialakulásáért. A szervezet a béta-karotint A-vitaminná alakítja, ami jótékony hatást fejt ki a látásra, a nyálkahártyára és a bőrre, szükséges a növekedéshez, valamint a csontfejlődéshez [ESKIN & TAMIR, 2006]. A sárgarépában B₁, B₂, C, E, K vitaminokat, valamint nikotinsavat és folsavat találunk. A sárgarépa élelmi rosttartalma is jelentős (3-4 g/100g), amelynek több mint fele vízdoldékony pektin, ebből adódik a bélműködésre kifejtett kedvező hatása. Vízkötő képessége, gélképző hatása segítségével megkötí az epesavakat és a toxikus anyagokat, ezáltal csökkenti a vér koleszterinszintjét. A vízben nem oldódó rostoknak köszönhetően hasznos tulajdonságai érvényesülnek az emésztés folyamatában [GAÁLLABÁTH, 2001].

Cékla (*Beta vulgaris*): A jellegzetes színű, vitaminokban és ásványi anyagokban gazdag növény őshazája a Földközi-tenger melléke [SOMOS, 1983]. Szerteágazó gyógyhatását az említett komponenseknek köszönheti. Mindenekelőtt sok káliumot (223-612 mg/100g) tartalmaz, ami szabályozza a vízháztartást, savtalanít, és a ballasztanyagokkal együtt részt vesz a szervezet méregtelenítésében. Ezenkívül gazdag még kalciumban (17-37 mg/100g), nátriumban (78-98 mg/100g), magnéziumban (23-87 mg/100g), foszforban (0,57-2,34 mg/100g), vasban (0,34-1,84 mg/100g), rézben (0,035-0,232 mg/100g) és mangánban (0,085-1,980 mg/100g). Az emberi szervezet számára kedvező mennyiségben tartalmaz szilíciumot, ami erősíti a kötőszöveteket, a bőrt, a véredények falát és a csontokat. A cékla fontos forrása az A, B és C vitaminoknak is. A vitaminok közül meg kell említeni a folsavat, amit a cékla nagy vastartalma révén jelentős mennyiségben vesz fel, és így számos pozitív hatást fejt ki a szervezetben, például serkenti a vörösvérsejtek képződését, fokozza a gyomorsav-elválasztást.

A cékla majdnem kizárólag csak szacharózt (7-8 g/100g) tartalmaz, glükóz (0,2 g/100g) és a fruktóz (0,1 g/100g) tartalma nagyon csekély. A cukoralkoholok közül a mannit jellemző a céklára, élelmi rosttartalma (4-5 g/100g) jelentős a zöldségfélék között. A savtartalmát főképp a citromsav alkotja. Oxálsav tartalma nagyobb, mint a sárgarépáé. A cékla további összetevője a bioaktív, másodlagos növényi anyag a szaponin, ami kis mennyiségben javítja az egészséget, koleszterincsökkentő, gyulladásgátló és rákmegelőző hatása által [HERRMANN, 2001; SZABÓ, 2001; KONTRASZTI *et al.*, 2005].

A cékla intenzív vörös színét a flavonoidok csoportjába tartozó betalain adja. A szervezet ezt nem tudja hasznosítani, így onnan kiürül. A flavonoidok jellemzője, hogy részt vesznek a sejtek oxidációs folyamataiban, kelátképzők, és így jelentősen csökkentik az antibiotikumok, az arzén és egyes baktériumok mérgező hatását. Az 1950-es években a magyar dr. Ferenczi Sándor felfigyelt a cékla tumorelles hatására, cékladiétát, főként céklalevet javasolt a rákos betegek

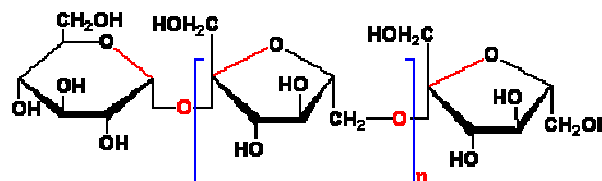
számára. Azóta több kutató és orvos is alátámasztotta a céklában lévő flavonoidok rákellenes hatását [JOHNSON *et al.*, 1994; ESKIN & TAMIR, 2006].

Csicsóka (*Helianthus tuberosus*): Észak-Amerikában, Kanadában őshonos, évelő növény. A napraforgóra hasonlít, annak közeli rokona, az *Asteraceae* (fészkes virágúak) családba tartozik. A burgonyához hasonló, 10-15 cm hosszú és 5-8 cm vastag gyökérgumókat fejleszt ki, melyek fajtától függően fehér, sárga, piros vagy vöröses színűek. Európában az 1700-as évek óta termesztik, de a burgonya a kedvezőbb tárolhatósága miatt jelentős mértékben visszaszorította. A csicsóka az utóbbi 10-15 évben került újra előtérbe a táplálkozás–élettani hatásainak köszönhetően. Kedvező tulajdonságát elsősorban rosttartalma, nagy telítőértékű ballasztanyag-tartalma, valamint inulin összetétele testesíti meg [ANGELI *et al.*, 2000]. A csicsóka szénhidrát-tartalma 15,8-16,7 g/100g, amelyből a szacharóz 2,3-4,0 g/100g-ot tesz ki. Jelentős a kálium (422-478 mg/100g), a foszfor (32-78 mg/100g), a magnézium (18-20 mg/100g), kalcium (10-21 mg/100g) és vas (3,7-4,2 mg/100g) tartalma. A vitaminok közül a B₁, B₂, C vitaminokat és a folsavat említhetjük meg, a savak közül a citromsav, az almasav, a fumársav és a borostyánkősav emelhető ki [BARTA & PÁTKAI, 2007].

A csicsókában található inulinnak az az előnye a burgonya szénhidrátjával, a keményítővel szemben, hogy míg a keményítő a szervezetben teljesen glükózzá bontódik, aminek minden grammja inzulinra szorul, az inulin – ha bontódik – csaknem teljesen fruktózzá hasad, amelynek 30-80 grammját a szervezet inzulin nélkül is képes hasznosítani. Az inulin az emberi emésztőtraktusban általában nem reszorbeálódik, sőt az emberben megfelelő inulináz enzim hiánya miatt nem is bontódik le. Ezáltal a táplálkozásban, mint ballasztanyag szerepel, és csupán a vastagbélben lévő baktériumok bontják a prebiotikus hatású inulint [ANGELI *et al.*, 2000].

Az inulin a csicsókagumóban a parenchimasejtek vakuólumaiban képződik, a szállítóedények útján odajutó glükóz-, fruktóz- és szacharóz molekulákból. Az inulin $\beta(2-1')$ kötésű lineáris fruktózláncokból áll [CAUSEY *et al.*, 2000].

A lánc végén egy glükóz molekula van. A fruktózlánc hosszát az n-polimerizációs fokkal jellemzik. A homológ sor első tagja (n=0) a szacharóz. További tagok az 1-kesztóz (n=1), nisztóz (n=2), oligofruktozidok (2<n<5), inulidok (5<n<10) és az n>10 lánchosszú polifruktánok, amelyeket inulinnak tekintenek.



2.6.2.2 Zöldségek szerepe a termékfejlesztésben

Az élelmiszertudománnyal, illetve közvetlenül a probiotikumokkal foglalkozók egyetértenek abban, hogy a fermentált növényi termékek alkotják majd azt a következő élelmiszer kategóriát, ahol az egészségre jótékonyan ható baktériumok piacot nyernek maguknak. Kétségtől van már néhány relatív új, nem tejalapú termék a probiotikus élelmiszerek piacán. Például: A Grainfields Wholegrain Liquid, amelyet különböző gabonafélékből (zab, kukorica, búza, köles) és magokból (lenmag, lucerna mag) állítanak elő. A fermentációját két *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*) és két élesztő törzs (*Saccharomyces boulardi*, *S. cerevisiae*)

bevonásával végzik és így egy frissítő hatású, habzó italt kapnak. A Vita Bosa aromás gyógynövények és más növények keveréke, amelyet tejsavbaktériumok és élesztők kombinációjával erjesztenek. Sokféle antioxidánst tartalmaz [PRADO *et al.*, 2008]. Svédországban 1994-ben jelent meg a piacon a Proviva. Ez volt az első olyan probiotikus élelmiszer, amely nem tartalmazott tejet vagy tejkomponenst. A *Lb. plantarum* 299v törzssel erjesztett zabkását 5% mennyiségben gyümölcslehez keverték és így hozták forgalomba. A termék $5 \cdot 10^{10}$ tke/ml sejtkoncentrációt tartalmaz [MOLIN, 2001]. A Valio Ltd (Finnország) 1996-ban kezdett nem tejalapú italokat fejleszteni *Lb. rhamnosus* GG törzset felhasználva. A Gefilus és a Bioprofit (még *Propionibacterium freudenreichii* törzset is tartalmaz) gyümölcs italok a legismertebbek [LEPORANTA 2005, DANIELLS, 2006]. Norvégiában Tine BA dobott piacra probiotikus italt Biola elnevezéssel, amely több, mint 95% gyümölcsstartalommal rendelkezik. A példákából kiderül, hogy zöldségalapú probiotikus élelmiszerek még nem kaphatók (valószínűleg fejlesztés alatt állnak), tehát új irányt jelenthetnek a növényi eredetű élelmiszerek között. A fermentált zöldségitalok különleges helyet kaphatnak a táplálkozásban, mivel a tejsavas fermentált zöldségleveleknek étvágyerjesztő hatásuk van, elősegítik az emésztést és szabályozzák a gyomorsavtermelést, illetve a bennük lévő funkcionális összetevők kedvezően hatnak a szervezetre. Az új típusú, probiotikumot tartalmazó zöldségitalok előállításuk kedvezően befolyásolhatja a zöldségfogyasztást, ugyanis az európai kultúrákban a fermentált zöldségfélék (leszámítva néhány hagyományos terméket, pl. savanyú káposzta, kovászos uborka stb.) nem igazán elterjedtek. Ehhez az is hozzájárulhat, hogy a fermentálásra alkalmas zöldségfélék elsődleges feldolgozási módja nem a légyártás [VERECZKEY *et al.*, 1997].

A fermentált zöldségfélékkel kapcsolatos kutatások során több kutató [BUCKENHÜSKES *et al.*, 1986; ANDERSSON & HEDLUNG, 1983] esetén is felmerült az 1980-as években, hogy tiszta tenyészeteket (starterkultúrákat) alkalmazzanak a végtermék állandó minőségének és a gyártási folyamat reprodukálhatóságának érdekében. Ennek a feltétele a tenyészet gondos kiválasztása volt. A legtöbb esetben *Lactobacillus* kultúrákat (*Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*) választottak ki és alkalmazták az irányított erjesztésekben.

Az irodalomban nem sok publikációt találunk, ahol probiotikus tulajdonsággal rendelkező baktériumokkal végeztek erjesztési vizsgálatokat a különféle zöldséglevelekben. YOON és munkatársai (2004, 2005, 2006) a paradicsomlé, céklalé és a káposztalé vizsgálták, mint lehetséges tápközeget a probiotikumok szaporítására, illetve erjesztésre. A kísérleteikben *Lb. acidophilus* LA39, *Lb. plantarum* C3, *Lb. casei* A4 és *Lb. delbrueckii* D7 törzseket alkalmazták. A paradicsomlé esetében mind a négy probiotikus törzs elérte a 10^9 tke/ml sejtkoncentrációt, valamint a pH=4,1 értékre csökkent a 72 órás fermentáció után. A céklalé a törzsek szintén jól hasznosították. A *Lb. acidophilus* és *Lb. plantarum* törzsek nagyobb mennyiségű tejsavat termeltek, mint a többi törzs és az erjesztett céklalé pH-ját a kezdeti 6,3-ról 4,5-re csökkentették le 48 óra alatt. A káposztalében a paradicsomléhez hasonlóan 10^9 tke/ml sejtkoncentrációt értek el a törzsek a 48 órás fermentáció során. A kísérleteik után 4 hetes tárolási vizsgálatokat is végeztek 4°C-on. A törzsek mind a paradicsomlében, mind a céklalében megőrizték életképességüket a 4 hetes tárolás alatt és a sejtkoncentrációjuk 10^6 - 10^8 tke/ml között alakult. A

káposztalében különböző sejtkoncentrációkat mutattak a törzsek 4 hét után: a *Lb. plantarum* $4,1 \cdot 10^7$ tke/ml, a *Lb. delbrueckii* $4,5 \cdot 10^5$ tke/ml sejtkoncentrációt, a *Lb. casei* törzs pedig elvesztette életképességét. RAKIN és munkatársai (2007) sörélesztő autolizátummal kiegészített cékla-, és sárgarépalét erjesztettek *Lb. acidophilus* törzsszel. Az autolizátum kedvezően hatott a törzs sejtszámára, csökkent az erjesztési idő, és a zöldséglé aminosavakkal, ásványi anyagokkal és antioxidánsokkal gazdagodott. DEMIR és munkatársai (2006) *Lb. plantarum* 1602 starter kultúrával erjesztett sárgarépalé beltartalmi tulajdonságait vizsgálták. Találunk magyar szerzőket (kutatókat) is ezzel a témával kapcsolatban. Például NAGY-GASZTONYI és munkatársai (2002), akik a kiegészített (vízzel és narancslével) és a nem kiegészített sárgarépapüré/lé erjeszthetőségét vizsgálták *Lb. plantarum* törzs esetében. Vagy BARÁTH és munkatársai (2004), akik a céklalé erjesztésére alkalmas *Lactobacillus* törzseket szelektáltak. A törzsek szelektálását tejsav, hidrogén-peroxid és biogén amin termelésük, valamint a betalainra történő hatásuk alapján végezték. A *Lb. plantarum* 2142, *Lb. curvatus* 2770 és a *Lb. casei pseudoplantarum* 2745 törzsek közül az általuk felállított kritériumoknak legjobban a *Lb. curvatus* 2770 törzs felelt meg.

Ezen élelmiszerek fejlesztésénél az élelmiszerbiztonság kérdését is fel kell vetnünk, mivel a zöldségek (elsősorban gondolok itt a gyökérezöldségekre), mint nyersanyagok széles mikroba populációval rendelkeznek. Ezért a végtermék megfelelő élelmiszerbiztonságának elérése érdekében szükség van a nyersanyag előkezelésre [DEÁK, 2006]. Az előkezelés kiválasztásánál az élelmiszerbiztonsági célok mellett viszont figyelembe kell venni, hogy minél kíméletesebb kezelési technológiát válasszunk, ami nem befolyásolja jelentős mértékben a nyersanyag funkcionális összetevőit.

Mindezek után a probiotikummal gazdagított élelmiszerek sikerét végül a fogyasztók döntése határozza meg, hogy megvásárolják-e és fogyasztják-e azokat. A fogyasztók igénylik, hogy érthető és ésszerű információkat kapjanak probiotikumokról, természetesen a túlzások elkerülésével. A probiotikus termékek jövőbeni elfogadottsága tehát attól függ, hogy biztosítja-e a fogyasztók számára mindazon előnyöket, amellyel jelenleg kecsegtetnek.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált mikroorganizmusok és fenntartásuk

A kísérleteimhez *Bifidobacterium* törzseket, *Lactobacillus* törzseket és teszt törzseket használtam. Az alkalmazott törzseket és az eredetüket az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat A kutatómunkában szereplő törzsek

Törzsek	Törzs jele	Eredet
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>B. angulatum</i>	B1.1	Saját izolátum*
	B1.2	Saját izolátum*
<i>B. bifidum</i>	B3.1	Saját izolátum*
	B3.2	Saját izolátum*
	B5.1	Saját izolátum*
	B7.1	Saját izolátum*
	B7.5	Saját izolátum*
	B8.3	Saját izolátum*
	NCFB 1454	National Collection of Food Bacteria
<i>B. breve</i>	DSM 20213	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
	B9.14	Saját izolátum*
	B9.15	Saját izolátum*
	B10.2	Saját izolátum*
<i>B. dentium</i>	B2.1	Saját izolátum*
<i>B. infantis</i>	DSM 20088	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>B. lactis</i>	NCAIM 02020	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms
	Bb-12	Chr. Hansen
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	American Type Culture Collection
	A1.2	Saját izolátum*
	A4.4	Saját izolátum*
	A4.6	Saját izolátum*
	A4.8	Saját izolátum*
	A4.9	Saját izolátum*
	B2.2	Saját izolátum*
	B6.1	Saját izolátum*
	Bb-46	Chr. Hansen
	K630	SKW GmbH
<i>B. pseudocatenulatum</i>	B4.1	Saját izolátum*
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. acidophilus</i>	La-5	Chr. Hansen
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	2142	Dairy Institute of the Agricultural Faculty of Perugia
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	2750	Dairy Institute of the Agricultural Faculty of Perugia
<i>Lb. casei</i> Shirota	Shirota	The Faculty of Veterinary Medicine of Utrecht University
<i>Lb. curvatus</i>	2756	Dairy Institute of the Agricultural Faculty of Perugia
<i>Lb. curvatus</i>	2775	Dairy Institute of the Agricultural Faculty of Perugia
<i>Lb. plantarum</i>	2770	Dairy Institute of the Agricultural Faculty of Perugia
<i>Lb. sakei</i>	DSM 20017	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

* MAYER *et al.*, 2003

5. táblázat folytatása

Törzsek	Törzs jele	Eredet
Teszt törzsek		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8439	American Type Culture Collection
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (apatogén)		Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tsz.
<i>Escherichia coli</i>	Bay 100	Szent István Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tsz.
<i>Enterococcus faecalis</i>		Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tsz.
<i>Enterobacter cloacae</i>		Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tsz.
<i>Listeria monocytogenes</i> 4ab (apatogén)		Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tsz.
<i>Clostridium sporogenes</i>		Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tsz.

A *Bifidobacterium* törzseket liofilizált formában (kapszulába zárva), vagy glicerin réteg alatt -20 °C-on tartottam fenn, és TPY táplevesben 37°C-on anaerob körülmények között tenyésztettem. Az anaerob környezetet Bugbox (anaerobic chamber, Ruskin Technology, Leeds, Anglia) vagy anaerob Jar+GasPak rendszer (Oxoid) segítségével hoztam létre. A *Lactobacillus* törzseket tejtáplevesben tartottam fenn 4°C-on, és MRS táplevesben 37°C-on tenyésztettem. A teszt törzseket a *Clostridium* kivételével TGE ferde agaron 4°C-on tartottam fenn, és TSB táplevesben tenyésztettem 37°C-on. A *Clostridium* törzset paraffinolaj réteg alatt ferde agaron tartottam fenn 4 °C-on, és RCM táplevesben 37°C-on tenyésztettem anaerob környezetben.

3.2 Felhasznált sejt kultúrák

Caco-2 sejt kultúra (ATCC HTB 37)

Emberi vastagbél adenocarcinoma sejtvonal, amely az Utrecht Egyetem gyűjteményéből származott. A sejtek tenyésztése és fenntartása 37°C-on 5% CO₂ koncentráció mellett történt Dulbecco's Modified Eagle's tápfolyadékban (DMEM, D-6046 Sigma, 4500 mg/l glükóztartalom), amelyhez még 1 (v/v) % MEM-nem esszenciális aminosav oldatot, 50 mg/l gentamicin-szulfátot, 100 mg/l kanamicin-szulfátot, 4 mM glutamint, 25 mM HEPES puffert, 1 mM nátrium-piruvátot (Sigma-Aldrich), és 10 (v/v)% hő-inaktivált fetális bovin szérumot (FBS; Gibco) adtam hozzá.

HT29 és HT29-12 sejtvonal

A HT29 sejteket egy 44 éves nő elsődleges colorectalis adenocarcinomájából izolálták. Ez a sejtvonal standard körülmények között 95%-ban differenciálatlan sejtekből áll (parental sejt). Ebből a sejtvonalból metotrexát (dihydrofolát reduktáz inhibitor) kezelés hatására a sejtek először kehelysejteké (HT29-21), majd enterocytá-típusú sejtekké (HT29-12) szelektálódtak. A sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban 37°C-on 5% CO₂ / 95% levegő jelenlétében tenyésztettem. A tápfolyadék összetétele a következő volt: 10 % hővel kezelt FBS, 4 mmol/l glutamin, 25 mmol/l HEPES, 1% MEM-nem esszenciális aminosav oldat, 1 mmol/l nátrium-piruvát, 100 mg/l kanamicin-szulfát, 50 mg/l gentamicin-szulfát. A sejtvonal a Szent István Egyetem Élettan Tanszékéről származott.

3.3 Felhasznált anyagok

3.3.1 Felhasznált prebiotikus poli- és oligoszacharidok

Raftiline por (ORAFTI, Belgium) – Fruktó-oligoszacharid

Raftilose por (ORAFTI, Belgium) – Fruktó-oligoszacharid

Laktoszukróz szirup (LS-40L); Ensuiko Sugar Refining Co., Japán) – Laktoszukróz

Oligo Time (Showa Sangyo Co., Japán) – Izomalto-oligoszacharid

Oligo MT-500 (Showa Sangyo Co., Japán) – Izomalto-oligoszacharid

Isomalto-500 szirup (Showa Sangyo Co., Japán) – Izomalto-oligoszacharid

Xylo-oligo 70 szirup (SUNTORY, Japán) – Xilo-oligoszacharid

Xylo-oligo 95 por (SUNTORY, Japán) – Xilo-oligoszacharid

3.3.2 Felhasznált melanoidinek

Kakaó eredetű különböző molekulatömeggel: >30 kD, 10-30 kD, 5-10 kD, <5 kD

Kenyérből származó kétféle molekulatömeggel: >10 kD, <10 kD

A melanoidineket a Bécsi Egyetem, Táplákozástudományi Tanszékéről kaptam és a vizsgálatok egy részét is ott végeztem [SUMMA C. *et al.*, 2008].

3.4 Felhasznált tápközegek

▪ Laboratóriumi tápközegek

TPY (Trypticase-Phytone-Yeast extract) tápleves

Trypticase pepton (BBL)	10	g
Phytone pepton (BBL)	5	g
Glükóz	5	g
Élesztőkivonat	2,5	g
Tween 80	1	ml
Ciszteín-HCl	0,5	g
K ₂ HPO ₄	2	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5	g
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0,25	g
CaCl ₂	0,15	g
FeCl ₃	0,03	g
Agar-agar	15	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=6,8-7,0

Sterilizés 121°C-on 15 percig.

TPY agar

Összetétele és elkészítése megegyezik a TPY levesével, kiegészítve 15 g agar-aggal.

MRS (de Man Rogosa Sharpe) leves

MRS "por" (BBL)	52,3	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=6,8-7,0

Sterilizés 121°C-on 15 percig.

MRS agar

Összetétele megegyezik az MRS levesével, kiegészítve 15 g agar-aggal.

RCM (Reinforced Clostridial Medium) tápleves

Élesztőkivonat	3	g
Húskivonat	10	g
Trypticase pepton (BBL)	10	g
Glükóz	5	g
Vízoldható keményítő	1	g
NaCl	5	g
Na-acetát	3	g
Cisztein-HCl	0,5	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=6,8-7,0

Sterilizés 121°C-on 15 percig.

RCM agar

Összetétele megegyezik az RCM levesével, kiegészítve 15 g agar-aggal.

Beerens' agar [BEERENS, 1990]

Columbia-agar (OXOID CM331)	44	g
Glükóz	5	g
Cisztein-HCl	0,5	g
Agar-agar	5	g
Desztillált víz	1000	ml

Sterilizés 121°C -on, 15 percig.

70°C-os termosztálás után 5 ml propionsavat kell hozzáadni és 1n NaOH-val pH=5-re állítani, ezt követően lehet a lemezeket önteni. 48 órán belül felhasználható.

TGE tápleves

Bacto-Tryptone	5	g
Glükóz	1	g
Élesztőkivonat	2,5	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=6,8-7,0; Sterilizés 121°C-on 15 percig.

TGE agar

Összetétele megegyezik a TGE levesével, kiegészítve 15 g agar-aggal.

TSB (Tryptic Soya Broth) leves

TSB "por" (Oxoid)	30	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=7,3±0,2; Sterilizés 121°C-on 15 percig.

TSB agar

Összetétele megegyezik az TSB levesével, kiegészítve 15 g agar-aggal.

FC (Fekál Coliform) agar

FC "por" (Scharlau)	52	g
Desztillált víz	1000	ml

2 ampulla (2x10 ml) rozolsav adalékot (Scharlau) kell hozzáadni. Nem szabad autoklávozni!

pH=7,4±0,2

Vas szulfit agar (ISO 15213)

Kazein (enzimesen emésztett)	15	g
Szója (pancreatic emésztett)	5	g
Élesztőkivonat	5	g
Na ₂ S ₂ O ₅	1	g
Vas(III) ammónium citrát	1	g
Agar-agar	9-18	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=7,6±0,2; Sterilizés 121°C-on 15 percig.

PDS (*Pseudomonas Selective*) agar

PDS "por" (Oxoid CM 559)	24,2	g
Glicerin	5	ml
Desztillált víz	1000	ml

pH=7,1; Sterilizés 121°C-on 15 percig.

Sterilizés után kiegészítve: Pseudomonas Selective Supplement (Oxoid SR103)

VRBD (Violet Red Bile Dextrose) Agar

VRBD "por" (Merck)	39,5	g
Desztillált víz	1000	ml

Nem szabad autoklávozni! pH=7,4±0,2

RBC (Rosebengal Chloramphenicol) agar

RBC "por" (Merck)	32,2	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=7,2±0,2; Sterilizés 121°C-on 15 percig.

ChromoBio Coliform agar

Chromobio "por" (Biolab)	30	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=7,4; 100°C -on 30 percig hőkezelés.

▪ **Zöldségalapú tápközegek**

Sárgarépalé

A nyers sárgarépalé készítéséhez a sárgarépa gyökeret folyóvízzel alaposan megmostam, meghámoztam, és öblítést követően gyümölcscentrifugával (Santos N°28) levet nyertem. A nyers levet vagy közvetlenül felhasználtam, vagy különböző módokon kezeltem: sterilizés 121°C-on 15 perc, pasztörözés 80°C-on 15 és 20 perc, nagy hidrosztatikus nyomású (HHP) kezelés különböző nyomás/időintervallum paraméterekkel (400MPa/5 és 15 perc; 500 MPa/5 és 15 perc, 600 MPa/5 és 15 perc). A nagy nyomású kezelést Stansted Food Lab 900 készülékkel végeztem.

A sűrítmény felhasználásával előállított sárgaréपालeveket 67 (m/m)%-os sárgarépa sűrítményből készítettem, amelyet a GPS Powder Kft.-től szereztem be. Az ebből készített 8 (m/m)%-os répalét 80°C-on 10 percig pasztöröztem.

Csicsókalé

A csicsókalé előállításához 68 (m/m)%-os csicsóka sűrítményt használtam. A sűrítményt a FITOKUP Kft. bocsátotta rendelkezésemre. A megfelelő szárazanyag-tartalom kialakítása után a leveket különböző módon kezeltem: steriliztem 121°C-on 15 percig és 80°C-on 10 percig pasztöröztem. A léptéknövelési kísérletekben pasztörözött levét, a többi esetben sterilizett csicsóka levét használtam fel a vizsgálatokhoz.

Céklalé

Santos N°28 típusú gyümölcscentrifuga segítségével nyertem a céklalét. A nyers céklalét steriliztem (121°C, 15 perc) és így alkalmaztam a zöldséglevek erjeszhetőségének vizsgálatánál. A sűrítményből készített céklalé előállításához a 64 (m/m)% szárazanyag-tartalmú, GPS Powder Kft. által forgalmazott sűrítményt használtam. Az elkészített 10 (m/m)%-os céklalét 80°C-on 10 percig pasztöröztem.

3.5 Fiziológiai vizsgálathoz felhasznált módszerek

3.5.1 Vancomycin rezisztencia vizsgálat módszerei

Agaron történő vizsgálat: a TPY agart az alkalmazott *Bifidobacterium* törzs 48 órás tenyészetének 1 tf%-nyi mennyiségével oltottam be, majd Petri-csészékbe öntöttem. A megszilárdult TPY agarra 30 µg vancomycint tartalmazó korongokat helyeztem, és 2 napos, 37°C-on történő anaerob inkubálást követően az eredményeket a keletkezett feltisztulási zónák alapján értékeltem.

Határhígítási módszer: Kétszeres töménységű 2 ml TPY tápleveshez 2 ml meghatározott koncentrációjú vancomycin oldatot tettem, és így a felező hígítás elvén különböző vancomycin koncentrációjú tápleveseket alakítottam ki, majd ezen oldatokat az adott *Bifidobacterium* törzs 48 órás tenyészetének 0,1 ml-ével beoltottam. Két napos, 37°C-on anaerob körülmények között történő inkubálás után határoztam meg a minimális gátló koncentrációkat (MIC). A vizsgálatokat két ismétlésben végeztem el.

3.5.2 Oxigéntolerancia vizsgálat

Tenyésztési módszert alkalmaztam az oxigéntolerancia mértékének meghatározásához. A vizsgálat előtt legalább kétszer átoltott törzsek 24 órás sejtszuszpenzióival TPY tápleveseket (100 ml) oltottam be 1 tf%-nyi mennyiséggel, majd a törzseket anaerob környezetben (Bugbox-ban) 16 órán keresztül tenyésztettem, hogy elérjék a stacioner szaporodási fázist. Ezután rázótermosztátba tettem a tenyészeteket és 37°C-on, aerob körülményeken, 120 rpm fordulatszámon inkubáltam őket. Adott időpontokban – az aerob inkubálás 0., 24. és 96. órájában – meghatározott sejtkoncentráció értékek alapján értékeltem a kísérleteket. A vizsgálatot 3 ismétlésben végeztem el.

3.5.3 Hidrogén-peroxid minimális gátló koncentrációjának meghatározása

Agardiffúziós módszer: *Bifidobacterium* tenyészetek 1 tf%-nyi mennyiségével beoltott TPY agart (15 ml) steril Petri-csészékbe öntöttem. Az agar megszilárdulását követően 8 mm átmérőjű lyukakat furtam az agarban. Majd a különböző koncentrációjú hidrogén-peroxid oldatokból 50 µl-t pipettáztam minden egyes lyukba. Ezt követően a Petri-csészéket 37°C-on, anaerob körülmények között inkubáltam 48 óráig. Az értékelést feltisztulási zónák alapján végeztem.

Határhígítási módszer: Megegyezik a vancomycin rezisztencia vizsgálatnál felhasznált módszerrel, csak itt 5-5 ml mennyiségeket alkalmaztam. A vizsgálatokat két ismétlésben végeztem el.

3.5.4 Bifidobaktériumok szénhidrát hasznosításának vizsgálata

A vizsgálatok során alkalmazott mono-, di-, poli-, és oligoszacharidokat az adott tápközeghez minden esetben 0,1 (m/v)% mennyiségben használtam. A baktérium sejtek növekedésének vizsgálata a következő módszerekkel történt:

Brómkrezolbíbor indikátoros módszer: Az elkészített tápleves pH-ját 7,0-re állítottam és kiegészítettem 10-15 mg/l brómkrezolbíbor indikátorral, amely lilás-kék színűre festette a

közeget. A sterilizést követően beoltottam a tápleveseket. A bifidobaktériumok savtermelése révén az indikátor sárga színre vált, jelezve a baktériumok szaporodását, illetve anyagcsere tevékenységét.

Optikai denzitás mérése: A tenyészetek 600 nm-en mért abszorbancia változásából következtettem a szaporodás mértékére. A mérést α -Helios típusú spektrofotométerrel végeztem.

Lemezöntéses módszer (vegyes kultúrák modellben): A bifidobaktériumok kimutatására Beerens' agart (szelektív), a teszt törzsek detektálására TSB agart alkalmaztam. A vizsgálatokat 3 ismétlésben végeztem el.

3.5.5 Maillard-reakció termékek bifidobaktériumok szaporodására kifejtett hatásának vizsgálata

Agardiffúziós és határhígításos módszereket használtam, amelyek menete teljesen megegyezik a hidrogén-peroxid és a vancomycin vizsgálatnál leírt lépésekkel. Az agardiffúziós módszernél 10, 5, 2, 1, 0,5 és 0,25 mg/ml melanoidin koncentrációkat, a határhígításos esetén 100, 50, 25 és 12,5 μ g/ml koncentrációkat alkalmaztam. A vizsgálatokat 3 ismétlésben végeztem el.

3.6 Bifidobaktériumok antimikróbás hatásának vizsgálata során használt módszerek

3.6.1 Kétrétegű spot módszer (Touré *et al.*, 2003 alapján)

A vizsgálat előtt a bifidobaktérium törzseket legalább három alkalommal (24 óránként) átoltottam 0,05% cisztein-hidrokloriddal kiegészített MRS táplevesbe és ezután alkalmaztam a vizsgálatokhoz, amelyek a menete a következő volt:

- 1,5% agar-agart és 2 g/l nátrium-bikarbonátot tartalmazó megfelelő összetételű alsó agar készítése;
- 3 μ l adott táplevesben aktívan szaporodó 17-18 órás bifidobaktérium kultúra (pöttyök) felvitele az agarra;
- 20-30 perces szárítás, majd inkubálás anaerob körülmények között 37°C-on 18 óráig,
- az agar befedése 0,8% agar-agart tartalmazó adott összetételű tápagarral, melyet előzőleg beoltottam késő exponenciális szaporodási szakaszban lévő 1 tf%-nyi aktív indikátor törzsszel
- Inkubálás aerob körülmények között 37°C-on 18 órán keresztül.

Értékelés a feltisztulási zónák alapján történt.

3.6.2 Agardiffúziós módszer (Vinderola *et al.*, 2002 alapján)

- Sejtmentes felülúszó előállítás: 18 órán át 0,05% cisztein-HCl kiegészített MRS táplevesben felszaporított bifidobaktérium kultúra lecentrifugálása (12000 fordulat/perc, 15perc), a felülúszó pH-jának semlegesre állítása 1 N NaOH oldattal, majd átszűrése 0,20 μ m pórusméretű Minisart (Sartorius) steril szűrőn.
- Liofilizálással történő koncentráció (1/15-ödére, ebből 0,5 g \rightarrow 1 ml-be), majd a kis molekulatömegű fehérje frakciók 3000 és 10000 Da-os Microcon (Millipore) szűrővel történő kinyerése.
- 1% agar-agart tartalmazó adott összetételű táptalaj beoltása 1 tf%-nyi aktív indikátortörzsszel.

- Az agart steril Petri-csészékbe öntöttem, megszilárdulás után 6 mm átmérőjű lyukakat fúrtam.
- Az elkészített felülúszokból 50 µl-t pipettáztam a lyukakba.
- Ezután a csészéket 1 óráig 5°C-ra tettem, hogy a diffúziót elősegítsem.
- Inkubáció 37°C-on 18 órán keresztül.

Az értékelés itt is a gátlási zónák alapján történt.

3.6.3 Fehérjetermészetű antimikrobás anyag kimutatási módszere

Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE, 1 dimenziós)

Ezzel a módszerrel a bifidobaktériumok felülúszójának a fehérjemintázatáról, valamint ezek molekulatömegéről szerezhetünk információt.

A minta előkészítése: 1 mg liofilizált bifidobaktérium kultúrát 20 µl mintaoldó pufferben (Mintaoldó puffer: 3% Na-dodecil-szulfát (SDS); 62 mM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRISZ); 8,7% glicerin (87%); 10% β-merkaptó-etanol, pH=6,8) feloldottam. (Abban az esetben, amikor a mintám folyékony volt, 100 µl mintát 100 µl mintaoldó pufferrel elegyítettem.) Az oldatot 5 percig forraltam. A vizsgálatokat Bio-Rad Power Pac 1000 készüléken végeztem.

Elválasztó gél (15%, 2 kis géltre):

30% akrilamid/bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	4,0 ml
2 M TRISZ.HCl (pH: 8,8)	1,8 ml
10% SDS	50 µl
Desztillált víz	2,06 ml
TEMED	6 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	50 µl

Gyűjtőgél (6%, 2 kis géltre):

30% akrilamid/bis-akrilamid 29:1 (Bio-Rad)	0,5 ml
10% SDS	27,5 µl
0,5 M TRISZ.HCl (pH: 6, 8)	0,33 ml
Desztillált víz	1,6 ml
TEMED	3 µl
Ammónium-perszulfát (100 mg/ml)	25 µl

Minden egyes mintából a felvitt mennyiség: 15-20 µl volt. A mintafelvitelt követően a gélt elektroforézis cellába helyeztem és feltöltöttem pufferrel.

Elektroforézis puffer:

TRISZ	3,03 g
SDS	1,0 g
Glicin	14,4 g
1000 ml-re feltöltve desztillált vízzel.	

Elektroforézis paraméterei:

Feszültség (konstans):	200 V
Áramerősség (limit):	400 mA
Futtatás ideje:	35-40 perc

Vizsgálataim során kétféle eljárást alkalmaztam a gélek festésére:

Gyors Coomassie festés:

- A gélen szeparált fehérjéket 20 percig fixáltam 20% triklór-ecetsavban (TCA).
- Mosás: A maradék TCA eltávolítására 3-szor 10 percig rázattam a géleket PAGE-mosó oldatban (10% etanol, 5% ecetsav).
- Festés: Coomassie festékoldattal (0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 ml etanol, 10 ml ecetsav, 50 ml desztillált víz).

A gélt 15 percig rázattam a festékoldatban, majd 10% ecetsav oldattal távolítottam el felesleges festéket.

Ezüstfestés:

- A gélen szeparált fehérjéket 20 percig fixáltam 20% TCA oldatban, majd ráöntöttem a kálium-bikromátos oldatot (100 mg kálium-bikromát 100 ml salétromsavban oldva), majd 5 percig rázattam, utána desztillált vízzel mostam.
- A gélekre ezüst-nitrát oldatot (0,21 g ezüst-nitrát/100 ml desztillált víz) öntöttem, majd 20 percig rázattam.
- Előhívás során: 500 ml 0,28 M Na-karbonát oldathoz 50 µl 37%-os formaldehidet adtam és ezzel az oldattal rázattam a géleket a jellegzetes színek kialakulásáig. A reakciót 5% ecetsavval állítottam le.

Blot technika (Yildirim & Johnson, 1998 alapján)

Az elektroforézis végeztével a gélt nem festettem meg, hanem 1 tf%-nyi *Listeria monocytogenes* törzzsel beoltott 0,8% agar-agar tartalmazó TSB agarra helyeztem, majd ugyanezzel az agarral befedtem. Ezt követően 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át. Ha feltisztulási zónát tapasztaltam egy meghatározott molekulatömeegnél ezt úgy értékeltem, hogy a vizsgált törzs valószínűleg valamilyen gátlóanyagot termelt az indikátor törzs ellen.

Szoftveres kiértékelés

A kapott géleket Gel Doc 2000 (Bio-Rad) rendszerrel értékeltem.

Rotoforos fehérje elválasztási művelet

A rotofor IEF Cell egy egyedi preparatív fehérjeelválasztó egység, amely liquid-fázisú izoelektromos fókuszálással választja el a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján. A rotofor rendszer ideális fehérjetisztításra és előfrakcionálásra nyers, vagy részlegesen tisztított fehérjéből. A módszer gyors, egyszerű és eredményes (<http://www.bio-rad.com/B2B/BioRad/product>). A töltéssel rendelkező részecske elektromos mező hatására vándorolni kezd az amfolitban az anód vagy éppen a katód felé attól függően, hogy pozitív vagy negatív töltése van. A fehérje mindaddig vándorol, amíg meg nem találja az izoelektromos pontját. Ezek alapján frakciók különíthetők el.

Az elválasztás menete:

- Liofilizált bifidobaktérium kultúra bemérése, majd oldása 49 ml desztillált vízben.
- 1 ml amfolit (SERVA) hozzáadása (pH tartománya: 3-10).
- Puffertartályok feltöltése (katódtartály: 0,1 M NaOH, anódtartály: 0,1 M H₃PO₄).
- A tartályok és a fókuszáló kamra felszerelése a kerámiahűtőre.
- Cellák feltöltése amfolit, minta és desztillált víz szuszpenzióval.
- Hűtés indítása.
- Futtatás indítása.

3.7 Tapadási vizsgálatok módszerei

A tapadási vizsgálatokhoz a már említett Caco-2, HT29 és HT29-12 sejtvonalakat alkalmaztam. Caco-2 sejt kultúrát használtam a detektálási módszerek kifejlesztésénél, a bifidobaktériumok

tapadásának és a versengő kitapadás vizsgálatánál. A HT29 és a HT29-12 sejtvonalakat a bifidobaktériumok eltérő kiindulási koncentrációjával kapcsolatos vizsgálat esetén alkalmaztam.

Caco-2 sejtvonalhoz történő tapadási vizsgálatok menete

Minden esetben 14 napos Caco-2 sejtenyészeteket használtam. A sejtenyészeteket 24 lyukú sejtenyésztő edényekben tenyésztették, amelyekbe előzőleg 70%-os alkohollal zsírtalanított és UV fényel 2 órán keresztül kezelt fedőlemezeket helyeztek. A vizsgálatok során a következő lépések történtek:

1. A tapadásra szánt baktériumtenyészetek előkészítése: *Bifidobacterium* törzsek és a *Lactobacillus* törzs 24 órás, az *E. coli* törzs esetén 18 órás tenyészetekkel végeztem a vizsgálatokat.
2. A baktériumtenyészetekből 1-1 ml-t steril Eppendorf csövekbe mértem, majd 13000g sebességgel 3 percig centrifugáltam. Ezt követően még kétszer mostam a sejteket steril fiziológiás sóoldattal.
3. Mosás után a sejteket antibiotikum és FBS mentes DMEM-ben szuszpendáltam vissza az eredeti térfogatra. Beállítottam a kívánt baktérium sejtszámokat: A bifidobaktériumok és a *Lactobacillus* törzs esetén $\sim 10^7$ tke/lyuk hozzáadott sejtszám, az *E.coli* törzsnél (versengő kitapadás) $\sim 10^6$, $\sim 10^7$, $\sim 10^8$ tke/lyuk sejtszám volt a cél.
4. Caco-2 sejtek mosása 1-1 ml 37°C-ra előremelegített DMEM (antibiotikum és FBS mentes) oldattal
5. 0,5 ml beállított sejtkoncentrációjú baktérium szuszpenzió pipettázása a sejtekre. Minden vizsgálat 2 ismétléssel történt. A versengő tapadás vizsgálat esetén a bifidobaktérium és az *E. coli* baktériumsejteket egy időben raktam a szövettenyészetre. Kontroll vizsgálatként meghatároztam azt is, hogy külön milyen tapadást mutatnak a vizsgált törzsek.
6. Inkubálás: 60 perc, 37°C, 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban.
7. Nem tapadó baktériumok leöblítése (2x) 1 ml 37°C-ra előremelegített DMEM oldattal.
8. Ezután a detektálási módszertől függ, milyen lépés következik.
 - *Lemezöntés*: (1) 0,5 ml tripszin oldatot teszünk a lyukakba, hogy a megtapadt sejteket felszedjem (15 perc, 37°C-on). (2) A tripszines reakciót 0,5 ml DMEM+10% FBS oldattal állítottam le. (3) Ezután hígítási sorokat készítettem és a megfelelő hígítási tagokból meghatároztam a sejtszámot. A bifidobaktériumok esetén TPY agart és Beerens' agart (versengő kitapadásnál), a *Lactobacillus* törzsnél MRS agart, és az *E. coli* törzsnél pedig ChromoBio Coliform agart használtam a kimutatáshoz.
 - *Gram-festés*: (1) A szövettenyészetet és a megtapadt baktériumokat fixáltam 10%-os formaldehiddel, 10 percig. Ezután Gram-szerint festettem (GRAM-color Staining Set, Merck) és az üveglapokat kiszedtem a lyukból, majd Mowiol oldattal (glicerin (87%) 6 g, Mowiol 4-88 polivinil alkohol (Fluka) 2,4 g, desztillált víz 6 ml, 0,2 M TRISZ puffer (pH=8,5) 12 ml) tárgylemezre ragasztottam. A tapadó baktériumokat 1000x-es nagyítással vizsgáltam (AxioPhot, Carl Zeiss, Oberkochen, Németország). Minden üveglap esetén 10-10 látótérrel készítettem (AxioCam HRC, Carl Zeiss) fényképet. A baktériumtapadás mértékét sejtszámlálással állapítottam meg. A Scion Image

képelemző program segítségével határoztam meg a baktériumok által borított terület százalékos arányát.

- A *hexidium-jodidos* festésnél a festési eljárást a baktériumok mosása után végeztem a következő módon: Tízszeres hígítást készítettem a hexidium-jodid törzsoldatból (LIVE BacLight™ Bacterial Gram Stain Kit) és ebből 7,5 µl-t pipettáztam az 1 ml törzsszuszpenzióhoz, majd ezeket 30 percen keresztül sötétben inkubáltam 50 rpm rázatás mellett. Ezután a felesleges festék eltávolítására négyszeres mosás következett. Mosás után a baktériumokat DMEM-be (antibiotikum és FBS mentes) visszaszuszpendáltam és hígítottam. Az ezt követő lépések megegyeznek a Gram-festés lépéseivel. A mikroszkópos vizsgálat során UV megvilágítást és XF43 szűrőt (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA) alkalmaztam a fluoreszcens baktériumok megjelenítésére.

HT29 és HT29-12 sejtvonalhoz történő tapadási vizsgálatok

A baktériumtapadási kísérletekhez a sejteket szintén fedőlemezen szaporítottam. Az előkészített fedőlemezeket 24 lyukú edényekbe helyeztük és a sejteket azon tenyésztettük 72 órán keresztül. A 70-90%-ban konfluens tenyészeteken végeztem a baktériumtapadási vizsgálatokat. A tapadó baktériumok detektálására lemezöntéses módszert alkalmaztam.

A vizsgálat módszere megegyezik a Caco-2 sejtvonal esetén leírtakkal, annyi a különbség, hogy a bifidobaktériumok esetén eltérő hozzáadott koncentrációkat ($\sim 10^6$, $\sim 10^7$, $\sim 10^8$ tke/lyuk) alkalmaztam.

3.8 Erjesztési kísérletek

Erjesztés és a tárolás körülményei:

Mind a mono, mind a vegyes kultúras erjesztéseket 10^6 - 10^7 tke/ml baktérium-koncentrációval indítottam. A vegyes kultúras erjesztés esetében a bifidobaktériumot és a laktobacillust 1:1 arányban alkalmaztam. Az erjesztéseket 37°C-on anaerob körülmények között végeztem, amelyet anaerob munkahelyben (Bugbox, Ruskin Technology), valamint anaerob Jar+GasPak rendszerben (Oxoid) biztosítottam. A lombikos kísérleteket 100-150 ml-ben, a léptéknövelési kísérleteket 2 liter hasznos térfogatú Biostat B (BBraun) fermentorban végeztem. A fermentorban az anaerob környezetet 10% szén-dioxid nitrogénben gázkeverékkel biztosítottuk. Az erjesztések időtartama 24-36 óra volt.

Tárolási kísérleteket 4°C-on és szobahőmérsékleten jól zárható üvegekben végeztem.

A sárgarépa tárolási vizsgálatánál a sárgarépalét 3 % mennyiségben egészítettem ki Raftilose prebiotikummal.

A vegyes kultúrával erjesztett csicsókalé tárolási vizsgálata előtt a termék állományának kialakítására és a vízáktívitas csökkentésére kereskedelmi forgalomból – Herbstreith & Fox Kft. – beszerzett különböző pektineket használtam: almapektineket (Pectin Classic AJ 201, AJ202, AF703, AU202) és citruspektineket (Pectin Classic CJ201, CJ206). A pektinek mellett nátrium-algináttal (Satalgine 550) történő besűrítés lehetőségét is vizsgáltam, amely a KUK Hungaria Kft.-től származott.

3.9 Mikrobiológiai vizsgálatok mikroorganizmusok mennyiségi meghatározására

- *Bifidobacterium*-ok: Meghatározása TPY, vagy Beerens' agaron (szelektív), lemezöntéssel történik. Inkubálás 37°C-on, anaerob körülmények mellett 48-72 óráig.
- *Tejsavbaktériumok*: Kimutatása MRS agaron, lemezöntéssel történik. Inkubálás 30°C-os termosztátban, 48-96 óra.
- *Mezofil aerob összcsíraszám*: TGE agaron, szélesztéses technikával határozta meg. Inkubálás 30°C-on termosztátban, 24-48 óra.
- *Szulfít-redukáló baktériumok (Clostridium)*: Vas-szulfit agaron, lemezöntés segítségével mutatjuk ki. Inkubálás anaerob körülményeken, 37°C-on, 24-48 óra.
- *Enterobaktériumok*: Kimutatása VRBD agaron, lemezöntéssel. Inkubálás 37°C-os termosztátban, 16-24 óra.
- *Coliform-ok*: Kimutatása rozolsavval kiegészített Fekál Coliform agaron, szélesztéssel. Inkubálás 37°C-on, 24 óra.
- *Pseudomonas-ok*: Kimutatása *Pseudomonas* szelektív agaron (Selective Supplement), szélesztéssel. Inkubálás 37°C-on, 24 óra.
- *Élesztőgombák és penészgombák*: Meghatározásuk RBC agaron, szélesztéssel. Inkubálás 25°C-on, az élesztők esetében 48-72 óra, a penészeknél 72-140 óra az inkubálási idő.

3.10 Analitikai módszerek

3.10.1 Szénhidrát és szerves sav mennyiségi meghatározása HPLC-vel

Készülék:	Waters HPLC, Waters 600 pumpa, Waters 717 plus automata mintaadagoló, Waters 410 RI detektor és PDA detektor (UV) (szénhidrát: 410 nm; szerves sav: 210 nm)
Oszlop:	Aminex HPX-87H töltetű oszlop, ami glükóz, fruktóz, maltóz, maltotrióz, etanol és szerves savak meghatározására alkalmas.
Mozgó fázis:	5 mM H ₂ SO ₄
Mérés jellemzői:	futtatás ideje: 20 perc a szénhidrát és 40 perc a szerves sav esetén mintamennyiség: 20 µl detektor hőmérséklete: 45°C oszlop hőmérséklete: 45°C áramlási sebesség: 0,5 ml/min

Szénhidrát standardok: glükóz, fruktóz, szacharóz, maltóz, galaktóz, maltotrióz, raffinóz.

Szerves sav standardok: tejsav, ecetsav, almasav, citromsav, borostyánkősav, kénsav, oxálsav

Minta előkészítés: 2 ml sárgarépa- és a céklalé mintákhoz 0,5 mol/l H₂SO₄ oldatot adtam és 30 másodpercig vortexeltem, majd 14000g fordulatszámom 10 percig centrifugáltam. A felüliszót 0,45 µm pórusátmérőjű szűrővel (Waters, Milford, USA) leszűrtem. A csicsókalé mintát csak

lecentrifugáltam az említett paraméterekkel és szintén leszűrtem 0,45 µm pórusátmérőjű szűrővel (Waters, Milford, USA).

3.10.2 Karotinoid tartalom meghatározása HPLC-vel

Készülék: Knauer HPLC
Beckman PDA detektor (UV), 450 nm

Oszlop: Nucleosil 100 C 18 (240mm x 4,6 mm) oszlop,

Mozgó fázis: Gradiens eluens: A (metanol) és B (60:25:15 izopropanol-aceton-víz)

Mérés jellemzői: futtatás ideje: 20 perc
mintamennyiség: 20 µl
detektor hőmérséklete: 45°C
oszlop hőmérséklete: 45°C
áramlási sebesség: 1 ml/min

Minta előkészítés: (1) 5 ml sárgarépa mintához 10 ml metanolt adtam egy csiszolatos Erlenmeyer lombikba és összeráztam. (2) Ezután 5 ml metanolt és 35 ml 1,2-diklóretánt adtam hozzá, ismét összeráztam, majd néhány milliliter desztillált vizet tettem hozzá. (3) Választótölcsérbe öntöttem és lassan szűrőpapírban lévő nátrium-szulfátra cseppegtettem. (4) A lecsepegtetett karotinoid tartalmú oldatot vákuum evaporátorban szárazra pároltam. (5) A maradékot 5 ml HPLC minőségű acetonba visszaoldottam és ezt injektáltam az oszlopra.

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Bifidobaktériumok fiziológiai vizsgálata

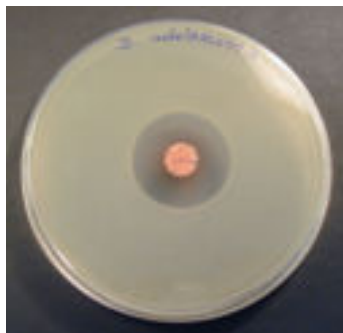
A probiotikumok kiválasztásánál fontos feladat a törzsek biokémiai tulajdonságainak megismerése és értékelése. E tulajdonságok között fontos szempont antibiotikum érzékenységük és rezisztenciájuk, oxigén toleranciájuk feltérképezése, a hidrogén peroxid gátlásának feltárása, szénhidrát hasznosításuk megismerése, valamint a Maillard-reakció eredményeként keletkező termékek hatásának feltárása. A probiotikus törzsek elsődleges szelekciós kritériuma, hogy ne rendelkezzenek átadható antibiotikum rezisztencia génekkel. Az oxigén tolerancia az egyik fontos tényező a technológiai folyamatok és a tárolás során. A hidrogén-peroxid szerepe a kevert kultúrák alkalmazásánál (mint szelekciós kritérium) merülhet fel, mert a tejsavbaktériumok köztudottan hidrogén-peroxidot termelnek, viszont a bifidobaktériumok a kataláz enzim hiánya miatt érzékenyek erre a vegyületre. A törzsek szénhidrát (mono-, di-, oligo-, és poliszacharid) hasznosításának megismerése segítséget nyújthat a megfelelő tápközeg (nyersanyag) kiválasztásában. Továbbá szükséges megvizsgálni a prebiotikumok hasznosíthatóságát, illetve azt, hogy milyen mértékben nyilvánulhat meg ezen poli-, és oligoszacharidok prebiotikus hatása. A Maillard-reakció termékei az előkezelések során a tápközegben keletkezhetnek, illetve a táplálkozás során kerülhetnek a szervezetbe, ezért cél e reakciótermékek hatásának vizsgálata a törzsekre.

4.1.1 *Bifidobacterium* törzsek vancomycin rezisztenciája

Terápiás és élettani szempontból fontos ismerni a törzsek antibiotikum érzékenységét. A bifidobaktériumok számos antibiotikummal (kanamycin, neomycin, streptomycin, polymyxin, gentamycin, nalidixinsav és metronidazol) szemben rezisztensek. Más antibiotikumokkal szemben eltérő érzékenységet tapasztaltak, de ez a tulajdonság különbözhet fajok, és adott fajon belül a törzsek között is. A vancomycin gátló hatása kiemelkedően fontos, mert ez az egyik olyan antibiotikum, amely széles hatásspektrummal rendelkezik a klinikai fertőzéseket okozó patogénekkal szemben.

A vancomycin érzékenység vizsgálatot tápagon 30 µg-os korongok segítségével és határhígításos módszerrel táplevesben végeztem el.

Az agaros módszer során, ahol 18 és 44 mm közötti feltisztulási zónákat kaptam, valamennyi felhasznált *Bifidobacterium* törzs szenzitívnek bizonyult (6. táblázat és 2. ábra).



2. ábra *Bifidobacterium adolescentis* törzs esetén kapott feltisztulási zóna

6. táblázat *Bifidobacterium* törzsek vancomycin rezisztencia vizsgálatának eredményei

<i>Bifidobacterium</i> törzsek	Feltisztulási zóna d (mm)	<i>Bifidobacterium</i> törzsek	Feltisztulási zóna d (mm)
<i>B. adolescentis</i> ^T	29	<i>B. breve</i> B10.2	20
<i>B. breve</i> ^T	18	<i>B. lactis</i> Bb-12	18
<i>B. infantis</i> ^T	19	<i>B. longum</i> B2.2	26
<i>B. lactis</i> ^T	25	<i>B. longum</i> A1.2	23
<i>B. bifidum</i> B1.2	33	<i>B. longum</i> A4.6	44
<i>B. bifidum</i> B3.1	19	<i>B. longum</i> Bb-46	25
<i>B. bifidum</i> B3.2	18	<i>B. longum</i> K630	26
<i>B. bifidum</i> B7.1	20	<i>B. pseudocatenulatum</i> B1.1	19

A vancomycin rezisztencia vizsgálatát a kiválasztott törzsekkel TPY táplevesben is elvégeztem, hogy meghatározzam a minimális gátló koncentráció (MIC) értékét. Az eredményeket a 7. táblázatban mutatom be.

7. táblázat *Bifidobacterium* törzsek vancomycin rezisztencia vizsgálata TPY táplevesben

Törzsek	Vancomycin koncentráció [µg/ml]								
	0,093	0,188	0,375	0,75	1,5	3	6	12	Kontroll
<i>B. breve</i> ^T	+++	+++	+++	++	–	–	–	–	+++
<i>B. infantis</i> ^T	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	+++
<i>B. bifidum</i> B3.2	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	+++
<i>B. bifidum</i> B7.1	+++	+++	+++	+++	±	–	–	–	+++
<i>B. lactis</i> Bb-12	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	+++
<i>B. longum</i> B2.2	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	+++
<i>B. longum</i> Bb-46	+++	++	±	–	–	–	–	–	+++

– : nincs növekedés; ± : nagyon gyenge növekedés; ++ : közepes növekedés; +++: jó növekedés

A *B. lactis* Bb-12, a *B. bifidum* B3.2, a *B. longum* B2.2 és a két típus törzs esetében a MIC 1,5 µg/ml értéknek adódott, a hasonló érzékenységet – kivéve a B2.2 törzs esetében – alátámasztják a tápagon észlelt hasonló kioltási zónák. A *B. longum* Bb-46 starterkultúra esetén nagyobb érzékenységet tapasztaltunk – 0,75 µg/ml MIC érték –, mint a humán forrásból származó *B. longum* B2.2 törzsnél. A *B. bifidum* B7.1 törzsnél tapasztaltuk a legnagyobb minimális gátló koncentrációt, amely 3 µg/ml volt. Ezen eredmények alapján a vizsgált bifidobaktériumok a vancomycin szemben érzékenyek tekinthetők, mivel a vancomycin esetében általában 4-8 µg/ml koncentrációban határozzák meg a szenzitivitás és a rezisztencia határát [JOHNSON *et al.*, 1990]. MOUBARECK és munkatársai (2005) is hasonló kioltási zónákat (20-36 mm) és MIC értékeket (0,25-2 µg/ml) detektáltak vancomycin rezisztencia vizsgálataik során.

4.1.2 Bifidobaktériumok oxigén toleranciája

Mivel a *Bifidobacterium* nemzetség fajai obligát anaerob szervezetek, ezért az oxigén toleranciájuk kardinalis kérdésként jelentkezik az élelmiszergyártás és a termékek tárolása során. Az oxigéntolerancia vizsgálatnál arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a stationer fázisban levő törzsek sejtkoncentrációja aerob körülmények között, milyen mértékű változást mutat 24 és 96 óra elteltével. Az eredményeket a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat Bifidobaktériumok sejtkoncentrációjának változása aerob inkubálás során

Törzsek	Sejtkoncentráció [log(tke/ml)] ±SD		
	Kiindulási	24 órás aerob inkubálás után	96 órás aerob inkubálás után
<i>B. adolescentis</i> ^T	8,59±0,22	5,41±0,29	3,47±0,50
<i>B. breve</i> ^T	8,75±0,16	8,23±0,21	4,11±0,07
<i>B. bifidum</i> B5.1	7,85±0,24	5,61±0,20	1,10±0,15
<i>B. bifidum</i> B7.1	8,47±0,22	8,26±0,21	1,13±0,07
<i>B. bifidum</i> B3.2	8,31±0,13	7,18±0,27	2,32±0,07
<i>B. bifidum</i> B1.2	8,46±0,16	8,14±0,17	4,08±0,14
<i>B. breve</i> B9.15	8,30±0,55	6,74±0,32	1,69±0,08
<i>B. dentium</i> B2.1	8,49±0,26	8,15±0,47	2,50±0,14
<i>B. lactis</i> Bb-12	7,85±0,52	7,14±0,42	1,34±0,11
<i>B. longum</i> Bb-46	7,48±0,35	3,93±0,24	<1
<i>B. longum</i> A4.4	7,67±0,31	7,41±0,41	1,19±0,09
<i>B. longum</i> A4.8	8,61±0,28	8,15±0,21	1,24±0,24

A tesztelt törzsek közül a *B. breve*^T, *B. bifidum* B7.1, *B. bifidum* B1.2, *B. dentium* B2.1, *B. lactis* Bb-12, *B. longum* A4.4, és az A4.8 törzsek esetén a sejtkoncentráció változás egy nagyságrenden belül maradt 24 óra után. A *B. bifidum* B 3.2 sejtkoncentrációja egy nagyságrendet, a *B. bifidum* B5.1 és a *B. breve* B9.15 törzseké két nagyságrendet, a *B. adolescentis*^T törzsé pedig három nagyságrendet csökkent a 24 órás inkubálás alatt. Érdekes, hogy a *B. longum* Bb-46 starterkultúra mutatta a legrosszabb oxigén toleranciát 24 óra elteltével és a sejtkoncentrációja a 96. órára már a kimutatási határ alá csökkent. A törzsek életképessége a 96. órára jelentősen lecsökkent, de kiemelendő a két típus törzs és a *B. bifidum* B1.2 törzs, amelyek szignifikánsan nagyobb toleranciát mutattak.

A 24 órás eredményeinket összehasonlítva SIMPSON és munkatársai (2005), valamint TALWALKAR és munkatársai (2001) által közölt adatokkal megállapítható, hogy az általam vizsgált törzsek – kivéve a Bb-46 törzset – jó oxigén toleranciával rendelkeznek. A 96 órás eredmények pedig felhívják a figyelmet a megfelelő tárolási körülmények és csomagolóanyagok kiválasztásának fontosságára.

4.1.3 Hidrogén-peroxid gátló koncentrációjának meghatározása

A termékfejlesztési kísérletek előkészítéseként információt kívántam szerezni a bifidobaktérium törzsek hidrogén-peroxid toleranciájára vonatkozóan, mivel a tejsavbaktériumok jelentős része hidrogén-peroxid termelő és a bifidobaktériumok kataláz negatívak. Így nem tudják a hidrogén-peroxidot lebontani.

A hidrogén-peroxid minimális gátló koncentrációjának meghatározását mind agardiffúziós módszerrel, mind táplevesben elvégeztem, és a kapott értékeket a 9. és a 10. táblázatban szemléltetem.

9. táblázat Hidrogén-peroxid minimális gátló koncentrációja agardiffúziós módszerrel

Vizsgált baktérium törzs	H ₂ O ₂ koncentráció [µg/ml]									
	5,9	11,7	23,4	47	94	188	375	750	1500	3000
<i>B. bifidum</i> B7.1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> B3.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. lactis</i> Bb-12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. longum</i> Bb-46	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. longum</i> B2.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+ : nőtt a baktérium; - : nem nőtt a baktérium (feltisztulási zóna van)

10. táblázat Hidrogén-peroxid minimális gátló koncentrációja tápleveses módszerrel

Vizsgált baktérium törzs	H ₂ O ₂ koncentráció [µg/ml]									
	12,5	25	37,5	50	75	100	150	200	300	
<i>B. bifidum</i> B7.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	
<i>B. bifidum</i> B3.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	
<i>B. lactis</i> Bb-12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	
<i>B. longum</i> Bb-46	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	
<i>B. longum</i> B2.2	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	

- : nincs növekedés; + : gyenge növekedés; ++ : közepes növekedés; +++: jó növekedés

A két módszer érzékenysége közötti különbséget jól mutatja a kapott minimális gátló koncentráció értékek eltérése. Az agardiffúziós módszerrel minden vizsgált törzs (B7.1, B3.2, Bb-12, Bb-46, B2.2) esetében egyöntetűen a 375 µg/ml koncentrációt kaptam MIC értéknek. A táplevesben történő szaporításnál eltérő MIC értékeket detektáltam. A legellenállóbbnak a *B. lactis* Bb-12 és *B. bifidum* B7.1 jelzésű törzsek voltak, amelyeknél 200 µg/ml MIC érték adódott. 150 µg/ml hidrogén-peroxid koncentráció már gátolta a *B. bifidum* B3.2 és *B. longum* Bb-46 jelzésű törzsek szaporodását. A legnagyobb érzékenységet a *B. longum* B2.2 törzs mutatta, amelynél MIC értéként 100 µg/ml koncentrációt határoztam meg.

Ezen eredmények ígéretesek a tejsavbaktériumokkal és a bifidobaktériumokkal történő kevert kultúrák erjesztések szempontjából, ugyanis például GRAF és munkatársai (2006), akik a *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid termelését vizsgálták, 2 - 20 µg/ml mennyiségű hidrogén-peroxidot mértek. Az általunk alkalmazott *Lactobacillus* törzsek ZALÁN és munkatársai (2005) szerint 2-6 µg/ml hidrogén-peroxidot termeltek.

4.1.4 Bifidobaktériumok szénhidrát hasznosítása és a prebiotikumok értékelése

A bifidobaktériumok szénhidrát hasznosításának, illetve a prebiotikumok hatékonyságának vizsgálata előtt szükségessé vált egy olyan alaptápközeg kialakítása, amelyben minimális háttérnövekedés tapasztalható. Ugyanis e baktériumok komplex táptalajon szaporíthatók és a glükóz elhagyása esetén is kiváló növekedést tapasztaltam az eredeti tápközegben. A tápközeg azon komponenseinek arányát kívántam csökkenteni, melyeket a baktériumok szénforrásként is hasznosíthatnak.

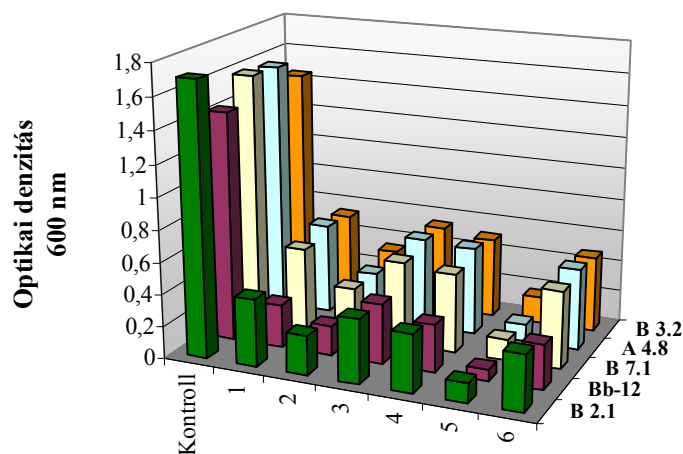
Ezután vizsgálatokat végeztem arra vonatkozóan, hogy a bifidobaktérium törzsek milyen mértékben hasznosítják azokat a mono- és diszacharidokat, melyek az egyes prebiotikus oligo- és poliszacharidok építőkövei lehetnek. Továbbá azt is vizsgálni kívántam, hogy mely bifidobaktérium fajok, illetve törzsek képesek hasznosítani a különböző kémiai szerkezetű, prebiotikus hatású oligo-, illetve poliszacharidokat, valamint arra kerestem a választ, hogy e prebiotikumok szelektíven támogatják-e a bifidobaktériumok szaporodását. A szelektivitás bizonyításának érdekében potenciális kórokozó baktériumokat is felhasználtam a vizsgálataimhoz.

4.1.4.1 Alaptápközeg összetételének meghatározása

A bifidobaktériumok szaporításához alkalmazott glükóz nélkül készített TPY tápközegben lévő, a baktériumok által szénforrásként is felhasználható tápanyagforrások, a trypticase- és a phytone pepton, valamint az élesztőkivonat szaporodásra gyakorolt hatását vizsgáltam. Különböző kísérleti beállításokat készítettem, amelyet a 11. táblázatban mutatok be. A különböző összetételű, 5 ml térfogatú tápközégeket 100 µl tenyésztettel oltottam be és 37°C-on 24 óráig, - amíg a sejtek a stacioner szaporodási fázisba jutottak - inkubáltam, majd megmértem a tenyészetek optikai denzitását. Kontrollként az eredeti összetételű TPY levest használtam. A kapott abszorbancia értékeket a 3. ábrán szemléltetem, amelyen jól megfigyelhető, hogy a kisebb mennyiségű phytone pepton tartalmozó tápközegekben (2. és 5. kísérletek) a bifidobaktériumok gyengébb szaporodást mutattak, illetve a phytone pepton mennyiségének csökkentésével (50→25%) a mért értékek is csökkentek. Ebből arra lehet következtetni, hogy ez a tápkomponens meghatározó a baktériumok növekedésében és így a további optimálás során elsősorban a phytone pepton mennyiségét célszerű csökkenteni.

11. táblázat A trypticase-, a phytone pepton és az élesztőkivonat százalékos arányai az eredeti TPY összetételre vonatkoztatva

Bemérés az eredeti összetétel százalékában			
Kísérletek	<i>Typticase</i>	<i>Phytone</i>	<i>Élesztőkivonat</i>
1	50	100	100
2	100	50	100
3	100	100	50
4	25	100	100
5	100	25	100
6	100	100	25



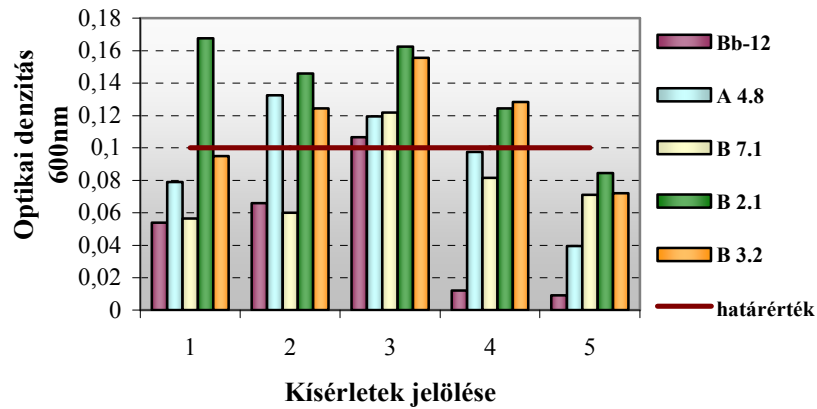
Kísérletek jelölése

3. ábra *Bifidobacterium* törzsek szaporodásának vizsgálata különböző összetételű tápközegekben

A phytone pepton mennyiségének változtatása mellett megvizsgáltam a többi komponens csökkentésének hatását is. A 12. táblázatban látható kísérleti beállításokat alkalmaztam a vizsgálatokban. A különböző tápközeg összetételek esetén elért biomassza hozamot a 4. ábra szemlélteti. A megfelelő tápanyag ellátás biztosítására a 0,1-es abszorbancia határt ($\sim 10^6$ tke/ml) tűztem ki, mint minimálisan elérendő szaporodási határt, mivel a megfelelő nitrogén mennyiséget biztosítani kell a baktériumok számára. Ez a feltétel a harmadik variáció esetén teljesült, ahol mindegyik vizsgált bifidobaktérium törzs meghaladta az általunk felállított szaporodási határt. A többi esetben a különböző törzsek nagyon eltérő szaporodóképességet mutattak.

12. táblázat A trypticase-, a phytone pepton és az élesztőkivonat százalékos arányai az eredeti TPY összetételre vonatkoztatva

Bemérés az eredeti tápközeg összetétel százalékában			
Kísérletek	Trypticase	Phytone	Élesztőkivonat
1	100	0	100
2	20	0	20
3	100	12	100
4	20	12	20
5	0	0	0



4. ábra Az egyes bifidobaktérium törzsek szaporodása a különböző összetételű tápközegekben

A kísérleti eredményeim alapján megállapítottam, hogy a szénhidrát hasznosítási vizsgálatokhoz használható módosított TPY alaptápközeget glükóz nélkül és a phytone pepton mennyiségét az eredeti összetétel 12%-ára csökkentve kell elkészíteni.

4.1.4.2 Bifidobaktérium törzsek cukorhasznosítása

Ezen vizsgálatokban arra kerestem a választ, hogy a kiválasztott bifidobaktérium törzsek milyen mértékben hasznosítják a mono- és diszacharidokat. A szaporodás követése a savtermelés alapján történt, melyet brómkrezolbíbor indikátor jelenlétében a színváltozás alapján értékeltem. Az így kapott eredményeket a 13. táblázatban mutatom be.

13. táblázat A *Bifidobacterium* törzsek mono- és diszacharid hasznosítása

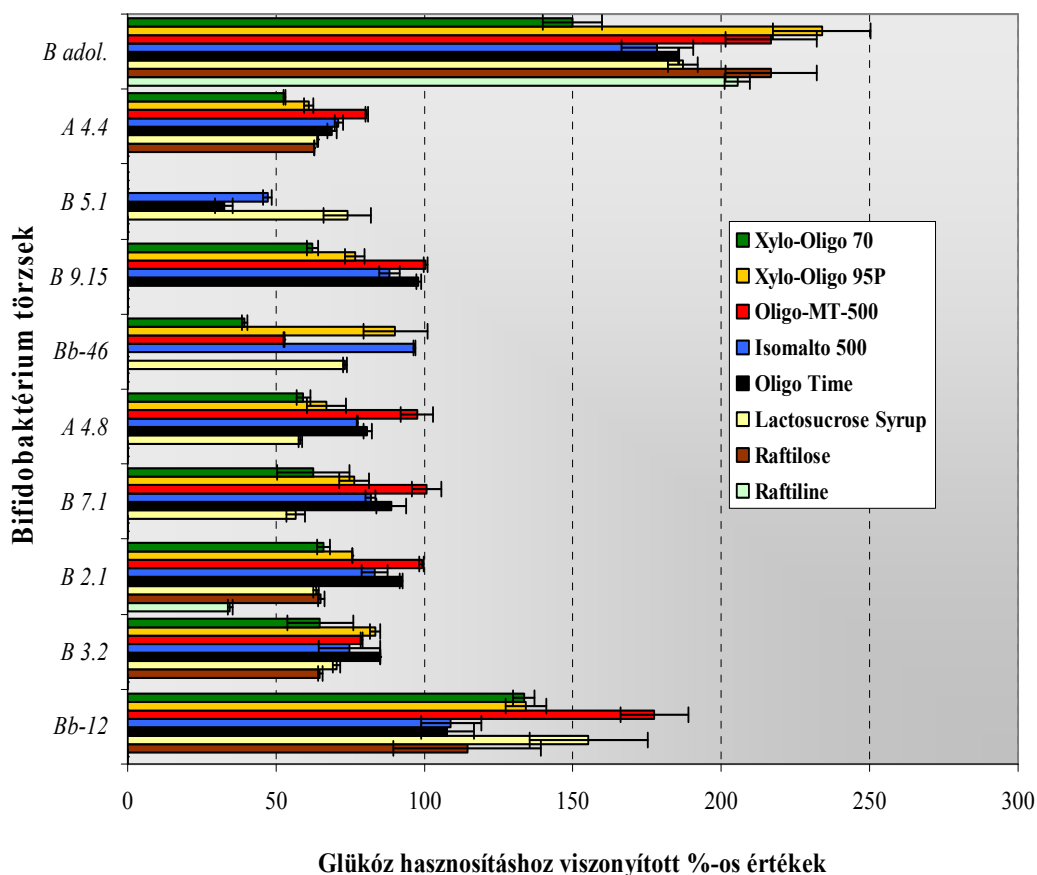
Bifidobakt. törzsek	<i>B. adolescentis</i> ^T	<i>B. longum</i> A4.4	<i>B. bifidum</i> B5.1	<i>B. breve</i> B9.15	<i>B. longum</i> Bb-46	<i>B. longum</i> A4.8	<i>B. bifidum</i> B7.1	<i>B. dentium</i> B2.1	<i>B. bifidum</i> B3.2	<i>B. lactis</i> Bb-12
Szénhidrátok										
Glükóz	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Fruktóz	+++	+	+++	+/-	+++	+	+	+++	+	+
D-xilóz	+	+/-	-	+/-	+	+++	+	+++	+	+
Laktóz	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+++
Galaktóz	++	++	+/-	+/-	++	++	+/-	++	+/-	+/-
Szacharóz	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Maltóz	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
Melibióz	++	++	+/-	++	++	++	++	++	++	++

+++ : kiváló szaporodás; ++ : jó szaporodás; + : gyenge szaporodás; +/- : háttér növekedés; - : nincs szaporodás;

Számos bifidobaktériummal foglalkozó irodalomban olvasható, hogy a fajok illetve törzsek jelentős része a laktózt, a galaktózt és a szacharózt jól hasznosítja. Ezt vizsgálataim is igazolták kivéve a galaktóz esetében, ahol néhány törzs esetében nagyon kis szaporodást tapasztaltam. A törzsek a glükózt kivétel nélkül jól felhasználták tápanyagforrásként, míg a fruktózt legtöbb esetben (négy törzs kivételével) kevésbé hasznosították. A D-xilóz monoszacharidon a *B. bifidum* B5.1 törzs nem mutatott szaporodást. Ezen a szénhidrát, amely a xilo-oligoszacharidok építőköve, két törzs (*B. dentium* B2.1, *B. longum* A4.8) esetén detektáltunk kiváló növekedést. A melibiózt és a maltózt mindegyik törzs – kivéve *B. bifidum* B5.1 – jól hasznosította, amely eredményt ROY *et al.* (1991) és SGORBATI és munkatársai (1995) által végzett vizsgálatok is alátámasztják. Ezen eredmények reményt adnak arra, hogy a bifidobaktérium törzsek a vizsgálatba bevont prebiotikumokat is hasznosítani fogják.

4.1.4.3 Bifidobaktériumok prebiotikus oligo- és poliszacharid hasznosítása

A kereskedelmi forgalomban kapható különböző kémiai szerkezettel rendelkező prebiotikumok hasznosítását vizsgáltam kiválasztott bifidobaktérium törzsekkel, illetve e szénhidrátok bifidogén tulajdonságait is bizonyítani kívántam. Kísérleteimben a törzsek szaporodását optikai denzitás méréssel követtem. A glükóz esetén mért abszorbanciát tekintettem 100%-nak és ehhez viszonyítottam az oligoszacharidok hasznosítását. Az eredményeket az 5. ábrán szemléltetem.



5. ábra A *Bifidobacterium* törzsek oligo- és poliszacharid hasznosítása

HUEBNER és munkatársai (2007) szerint egy adott cukornak akkor van prebiotikus aktivitása, ha a cukrot a tesztörzs olyan jól vagy közel olyan mértékben metabolizálja, mint a glükózt. Tehát a törzstől is függ, hogy az adott szénhidrát prebiotikusnak tekinthető-e vagy sem. Az eredményeim alapján elmondható, hogy a *B. adolescentis*^T és a *B. lactis* Bb-12 törzs esetén tapasztaltunk egyértelmű prebiotikus aktivitást. A *B. adolescentis*^T, amely felnőttek bélrendszerében található az összes vizsgált oligoszacharidot jobban hasznosította, mint a glükózt. *B. lactis* Bb-12 törzs, amely a tejparban, széles körben alkalmazott starterkultúra a Raftiline oligoszacharid kivételével szintén előnyben részesítette a vizsgált oligoszacharidokat a glükózhoz képest. (A Raftiline oligoszacharidot egyáltalán nem hasznosította.)

A *B. dentium* B2.1 törzs ugyan az összes szénhidráton növekedett a *B. adolescentis*^T törzshöz hasonlóan, de a szaporodás mértéke elmaradt a glükózon tapasztalttól. A *B. breve* B9.15 törzs esetén csak az izomalto- és a xilo-oligoszacharidok jelenlétében tapasztaltunk növekedést. A *B. bifidum* B3.2 és a B7.1 törzsek a Raftiline oligoszacharidon nem szaporodtak, valamint a *B. bifidum* B7.1 a másik frukto-oligoszacharidon (Raftilose) sem mutatott növekedést. A törzsek közül a *B. bifidum* B5.1 törzsnél tapasztaltam a leggyengébb szaporodást, csak az Isomalto 500, Oligo Time és a Lactosucrose syrup szolgált szénforrásként számára. A *B. longum* törzsek oligoszacharid hasznosítása heterogenitást mutatott. A *B. longum* A4.4 törzs a Raftiline kivételével minden vizsgált oligoszacharidot hasznosított. A *B. longum* A4.8 törzs a Raftiline mellett még a Raftilose-t sem használta fel szénforrásként. Ezzel szemben a *B. longum* Bb-46 törzs, sem a frukto-oligoszacharidokon, sem az Oligo Time izomalto-oligoszacharidon nem szaporodott.

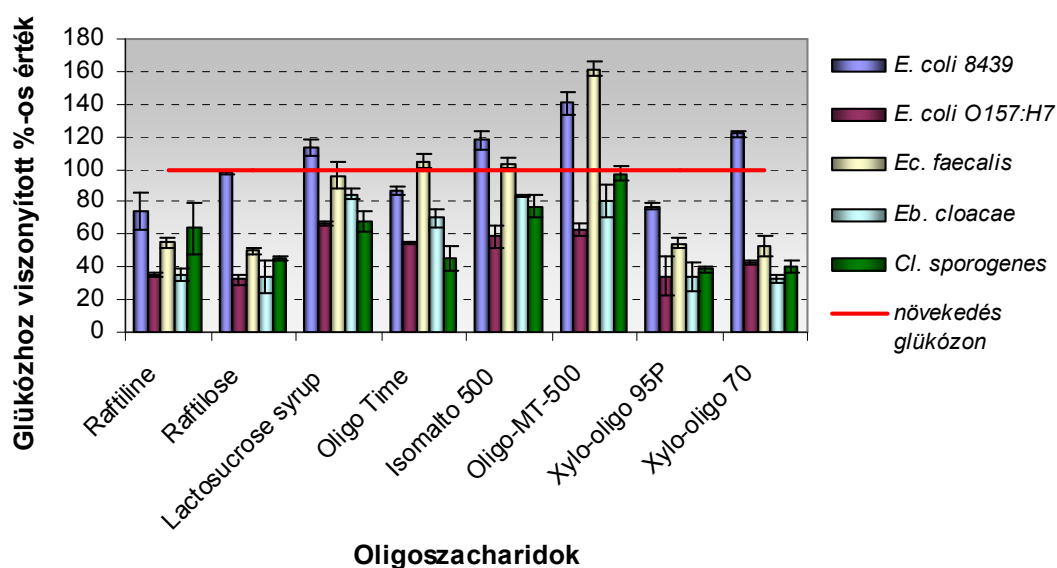
A *B. bifidum* és a *B. longum* törzsei közötti különbségek is bizonyítják, hogy a prebiotikumok hatékonysága függ az egyes törzsek genetikai tulajdonságaitól. A *Bifidobacterium* törzsek a vizsgált oligoszacharidok közül az Oligo-MT-500, Isomalto 500, Oligo Time és Xylo-oligo 95P szénhidrátokat hasznosították legjobban.

4.1.4.4 Prebiotikumok szelektivitásának vizsgálata

A szelektivitási kísérletek során első lépésben megvizsgáltam, hogy az általam alkalmazott prebiotikus oligoszacharidokat, milyen mértékben hasznosítják a potenciálisan kórokozó baktériumok, majd célul tűztem ki egy olyan vegyes kultúras modellrendszer létrehozását, ahol egyértelműen bizonyítható e szénhidrátok prebiotikus hatása, tehát az, hogy a probiotikumok a potenciális kórokozók jelenlétében is előnyt élveznek. A definíció szerint csak azon vegyületek tekinthetők prebiotikumoknak, amelyek szelektíven támogatják a probiotikumok növekedését.

A potenciálisan kórokozó baktériumok oligoszacharid hasznosítási vizsgálatát megelőzte egy alaptáptalaj-összetétel optimalálás annak érdekében, hogy minimális háttérnövekedést érjek el és így konzekvensen tudjam detektálni a hasznosítást. Az *E. coli* törzsek, az *Ec. faecalis* és az *Eb. cloacae* teszt törzsek szaporításához használt TGE táplevest és a *Cl. sporogenes* esetén alkalmazott RCM táplevest módosítottam. (TGE: glükóz és élesztőkivonat: Ø, tripton 60% (eredeti mennyiségre vonatkoztatva); RCM: glükóz, vízdoldható keményítő, húskivonat és élesztőkivonat: Ø, trypticase pepton 50%). Ezen alaptápközegekhez hozzáadott oligoszacharidok

teszt törzsek által történő hasznosításának eredményeit mutatom be 6. ábrán. (A mért abszorbancia értékeket a glükóznál mért értékhez viszonyítottam.)



6. ábra A különböző tesztörzsek oligoszacharid hasznosítása

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az *E. coli* 8439 jelzésű törzs a vizsgált szénhidrátokat – kivéve a Raftiline és a Xylo-oligo 95 P termékeket – glükózzal közel azonos, illetve azt meghaladó mértékben használta szénforrásként. A törzsek közül még az *Ec. faecalis*-t emelhetem ki, amely az izomalto-oligoszacharidokon és a laktoszukrózon mutatott kiváló szaporodást.

Összességében elmondható, hogy a vizsgált teszt törzsek a frukto-oligoszacharidokat (Raftiline, Raftilose) és a xylo-oligoszacharidokat (Xylo-oligo 95P és 70) kevésbé, míg az izomalto-oligoszacharidokat (elsősorban az Oligo-MT-500) és a laktoszukrózt jobban hasznosították. FOOKS és GIBSON (2003) is megfigyelték vizsgálataik során, hogy a frukto-oligoszacharid és a xylo-oligoszacharid:frukto-oligoszacharid (50:50) keverék nem támogatta az általuk vizsgált törzsek (*E. coli*, *Campylobacter jejuni*) növekedését. RYCROFT és munkatársainak (2001) vizsgálataiból is kiderült, hogy a xylo-oligoszacharidok jelenlétében a bifidobaktériumok száma növekedett, s a clostridiumok száma pedig lecsökkent.

Vizsgálataim alapján prognosztizálható, hogy a prebiotikumok *in vivo* hasznosulása nagymértékben függhet az ott lévő baktérium közösség összetételétől és számosságától.

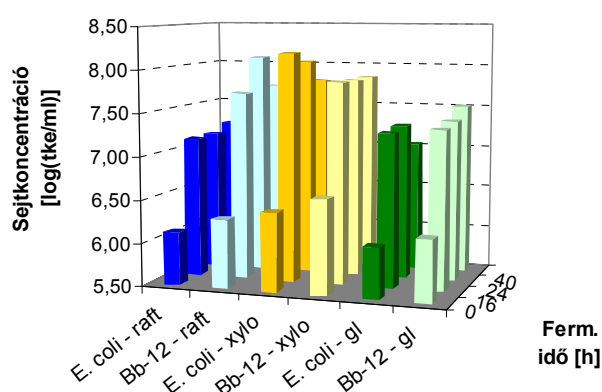
Vegyes kultúras modell

A vegyes kultúras modellben egy bifidobaktériumot és egy tesztörzset tenyésztettem együtt és a sejtkoncentráció detektálásával figyeltem, hogyan változik az egyes törzsek sejtszáma a prebiotikus oligoszachariddal kiegészített tápközegben a glükózzal kiegészítetthez viszonyítva. A modell megvalósításához először egy olyan tápközeget kellett kiválasztanom, melyet felhasználhattam a törzsek együttes szaporításához. Az elvégzett kísérletek során fény derült arra, hogy az RCM táplevesben mind a bifidobaktériumok, mind a tesztörzsek egyaránt jól szaporodnak, ezért a törzsek minimális szaporodásának biztosítása érdekében ennek a táplevesnek az összetételét módosítottam. A módosítás eredményeként, amelynél fontos volt a

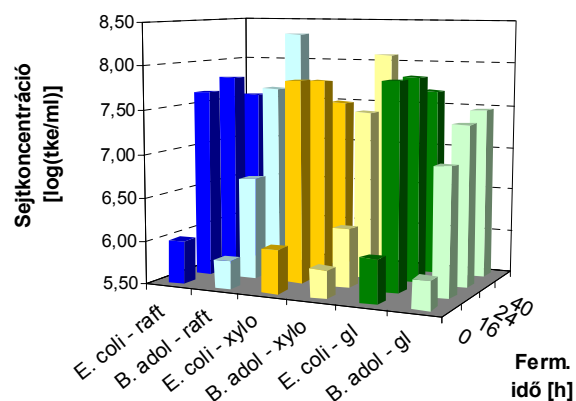
bifidobaktériumok és a teszt törzsek közel azonos mértékű növekedése, a következő táptalaj-összetételt határoztam meg: a glükózt, vízoldható keményítőt, húskivonatot, élesztőkivonatot, trypticase peptont elhagytam, és phytone pepton kiegészítést (1g/l) alkalmaztam, a többi komponens mennyiségét nem változtattam.

Elsőként a *B. lactis* Bb-12 és az *E. coli* O157:H7 (7. ábra A), majd a *B. adolescentis* és az *E. coli* O157:H7 (7. ábra B) együttes tenyésztését végeztem el. A prebiotikumok közül pedig a Xylo-oligo 95P és a Raftilose szelektivitását vizsgáltam. Mind a bifidobaktériumok, mind a tesztörzsek esetén $\sim 10^6$ sejt/ml induló sejtkoncentrációval oltottam be.

A



B



7. ábra *B. lactis* Bb-12+*E. coli* O157:H7 (A) és *B. adolescentis*^T+ *E. coli* O157:H7 (B) törzsek Raftilose, Xylo-oligo 95P oligoszacharidokkal és glükózzal kiegészített táplevesekben történő együttes tenyésztése során kapott sejtkoncentráció értékek

A Bb-12 és *E. coli* párosítás esetén elsősorban a Raftilose oligoszacharidnál bizonyítható a szelektív hatás, mivel a tenyésztés teljes ideje alatt a Bb-12 jobban szaporodott, mint az *E. coli* O157:H7 törzs. A Raftilose jó hasznosíthatóságát mutatja az is, hogy a vizsgált szénhidrátok közül ebben az esetben érte el a Bb-12 a legnagyobb sejtkoncentrációt ($1,25 \cdot 10^8$ tke/ml) a 24. órában. A Xylo-oligo 95P esetén nem volt megfigyelhető szelektív hatás, igaz a 40. órára visszaszorult az *E. coli* O157:H7 törzs szaporodása, de összehasonlítva a glükóznál kapott eredményekkel hasonló tendenciát tapasztaltam. A Xylo-oligo 95P oligoszacharid alkalmazásánál a tejsav és ecetsav meghatározás eredményei is alátámasztják, hogy a bifidobaktérium törzs háttérbe szorult az *E. coli* mellett (14. táblázat).

A *B. adolescentis* és az *E. coli* O157:H7 együttes szaporításánál, mind a Xylo-oligo 95P, mind a Raftilose oligoszacharid szelektív hatása kimutatható volt a tenyésztés végén. Míg a glükózzal történő erjesztés során a bifidobaktérium koncentráció $2,95 \cdot 10^7$ tke/ml, az *E. coli* O157:H7 sejtkoncentrációja $4,65 \cdot 10^7$ tke/ml volt a 40. órában, addig a Xylo-oligo 95P esetén $1,21 \cdot 10^8$ és $3,10 \cdot 10^7$ tke/ml, a Raftilose esetén $2,07 \cdot 10^8$ és $3,55 \cdot 10^7$ tke/ml bifidobaktérium illetve *E. coli* sejtkoncentrációt detektáltam. Tehát a *B. adolescentis* lassúbb szaporodása ellenére nagyobb sejtkoncentrációt ért el a tenyésztés végére, ami köszönhető egyrészt jó oligoszacharid hasznosításnak, másrészt a termelő savaknak (elsősorban az ecetsavnak), amelyek révén gátló

hatás alakulhatott ki az *E. coli* törzsre nézve. A tenyésztés ideje alatt mind a tejsav, mind az ecetsav koncentrációja növekedett, ami szintén a bifidobaktérium szaporodására, ezáltal savtermelésére utal (15. táblázat). Számos prebiotikummal foglalkozó publikációban olvasható, hogy ezen oligoszacharidok növelik a tejsav és a szerves savak termelődését. Az esetünkben a *B. adolescentis*+*E. coli* O157:H7 együttes tenyésztésénél figyelhető meg jelentősen magasabb ecetsav koncentráció a glükózon történő szaporításhoz képest (15. táblázat).

14. táblázat A *B. lactis* Bb-12 és az *E. coli* O157:H7 együttes tenyésztése során termelődött tejsav és ecetsav koncentrációk

<i>Bb-12+</i> <i>E.coli</i> O157:H7	0. óra		16. óra		24. óra		40. óra	
	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]
Glükóz	0	0	747	1215	939	1421	989	1274
Xylo-oligo 95P	0	0	226	363	314	408	628	134
Raftilose	0	0	739	1181	996	1613	1165	1181

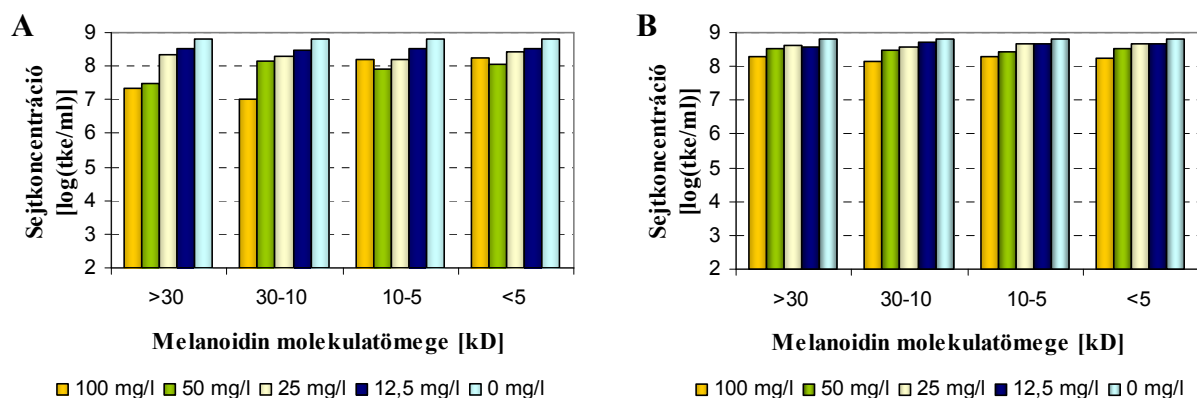
15. táblázat A *B. adolescentis* és az *E. coli* O157:H7 együttes tenyésztése során termelődött tejsav és ecetsav koncentrációk

<i>B. adol+</i> <i>E.coli</i> O157:H7	0.óra		16. óra		24. óra		40. óra	
	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]	tejsav [µg/ml]	ecetsav [µg/ml]
Glükóz	0	0	310	133	874	532	1724	1172
Xylo-oligo 95P	0	0	365	1032	527	1209	1760	2571
Raftilose	0	0	527	766	652	1080	1235	1573

4.1.5 Maillard-reakció termékek hatásának vizsgálata

A Maillard-reakció termékeinek esetleges gátlásának kimutatására kakaó eredetű (pörkölt) és kenyér eredetű melanoidineket alkalmaztam, amelyek különböző molekulatömeggel rendelkeztek. A vizsgálatba egy starterkultúrát *B. lactis* Bb-12, és egy a Sör- és Szeszipari Tanszék munkatársai által izolált *B. bifidum* B7.1 törzset vontam be. A lehetséges gátlás kimutatására táplevesben történő tenyésztést és agardiffúziós módszert használtam.

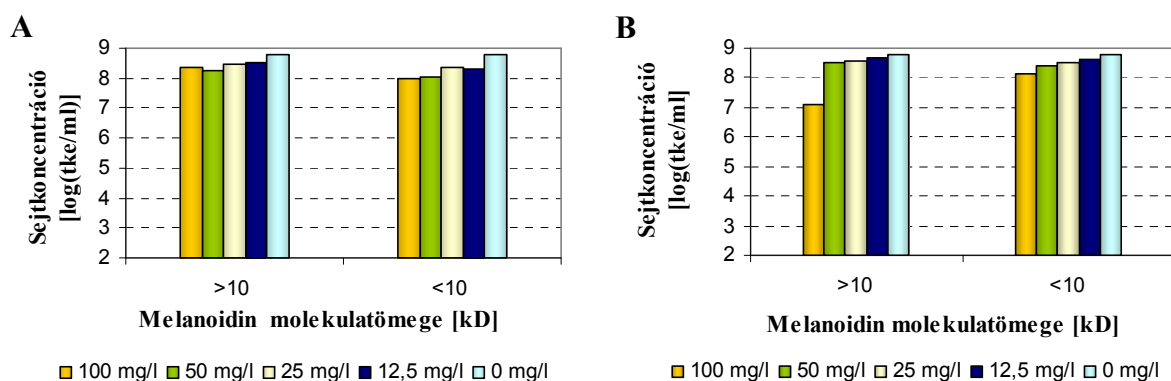
A szubmerz módszerrel vizsgált kakaó melanoidinek eredményeit a 8. ábrán, a kenyér melanoidinekét pedig az 9. ábrán szemléltetem.



8. ábra Különböző molekulatömegű kakaó melanoidin hatása a *B. bifidum* B7.1 (A) és *B. lactis* Bb-12 (B) törzs szaporodóképességére

A 100 µg/ml és 50 µg/ml kakaó melanoidin koncentráció esetén a >30 kD és a 30-10 kD molekulatömeggel rendelkező melanoidin fejtett ki jelentősebb gátló hatást a *B. bifidum* B7.1 törzs szaporodására, amely a sejtkoncentráció egy nagyságrendű csökkenésében nyilvánult meg. Az 50 µg/ml koncentrációnál kisebb tartományban nem tapasztalható ilyen mértékű gátlás. A sejtkoncentráció értékek egy nagyságrenden belül változtak a melanoidin koncentrációk csökkenésével fordítottan arányosan.

Ezzel szemben a *B. lactis* Bb-12 törzsnél nem volt megfigyelhető olyan mértékű gátló hatás, mint a *B. bifidum* B 7.1 törzs esetén. A sejtkoncentráció értékek egy nagyságrenden belül növekedtek szintén a melanoidin koncentráció csökkenésével fordítottan arányosan.



9. ábra Eltérő molekulatömegű kenyér melanoidin hatása a *B. bifidum* B 7.1 (A) és *B. lactis* Bb-12 (B) életképességére

Kenyér eredetű melanoidint tekintve 100 µg/ml koncentráció alkalmazása okozott nagyobb sejtkoncentráció csökkenést a *B. lactis* Bb-12 törzsnél, de csak a 10 kD-nál nagyobb molekulatömegű melanoidin esetében. A másik három melanoidin koncentrációnál csekély különbséget észleltem a sejtszám értékeket a kontroll adattal összevetve. A *B. bifidum* B7.1 esetén jelentős sejtkoncentráció csökkenést nem tapasztaltam, vagyis egy nagyságrenden belül változtak a sejtszámok.

Az agardiffúziós módszerrel az alkalmazott melanoidin koncentrációknál (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml) sem a *B. bifidum* B7.1, sem *B. lactis* Bb-12 törzs esetében nem tapasztaltam feltisztulási zónákat, amelyek jeleznék az esetleges gátlást.

Eredményeim arra engednek következtetni, hogy a szervezetbe jutó élelmiszer eredetű melanoidinek nem gátolják számottevően a probiotikus bifidobaktériumok szaporodását. AMES és munkatársai (1999) vizsgálatai során, amelyekben a melanoidinek hatását nézték a fekális baktérium populációra megállapították, hogy vagy támogatják csekély mértékben azok növekedését vagy nem.

4.2 Bifidobaktériumok antimikrobás hatása

A vizsgálataim során arra kerestem a választ, hogy a bifidobaktériumok szintetizálnak-e fehérjetermészetű antimikrobás anyagokat, bakteriocineket. Termelésüket egyes bifidobaktérium törzsek esetében már bizonyították (pl. egyes *B. bifidum* törzsek szintetizálják a bifidocin B-t és a

bifidint), de az eddig elvégzett számos kutatás ellenére még mindig viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a keletkezésük és a hatásmechanizmusukat illetően.

Kísérleteim során megvizsgáltam a különböző humán bifidobaktérium izolátumok, starterkultúrák és típus törzsek tenyészetének és sejtmentes fermentumainak antimikrobás hatását mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumokra nézve. Vizsgáltam a tápközeg szerepét az antimikrobás hatás megnyilvánulásában, valamint azt, hogy mely tenyésztési időpontban a legnagyobb az antagonista hatás az általunk kiválasztott törzs esetében. Továbbá feltérképeztem a törzsek fehérjemintázatát és blot-módszerrel ezen fehérjék esetleges gátló aktivitását vizsgáltam. Fehérje elválasztási műveleteket végeztem, ahol az adott törzs (*B. longum* A 4.8) fehérje frakcióinak antimikrobás hatását vizsgáltam agardiffúziós módszerrel.

4.2.1 Antimikrobás hatás kimutatása kétrétegű spot módszerrel

A bifidobaktérium törzsek antimikrobás aktivitásának feltárására potenciális kórokozó baktériumok apatogén törzseit és tejsavbaktériumokat használtam tesztorganizmusként. A bifidobaktériumok 18 órás tenyészetét alkalmaztam a kísérlethez. A gátló aktivitást mutató törzsek valószínűleg antimikrobás anyagot termeltek, mivel a pH hatást kizártam az alsó tápagar nátrium-bikarbonátos kiegészítésével. Az antagonista hatás számszerűsítésére a bifidobaktérium telep körül kialakult feltisztulási zóna és a telepátmérő hányadosát használtam. Az eredményeket az 16. táblázatban foglaltam össze. (Melléklet I. ábráin néhány képet bemutatok az eredményekről.)

Eredményeim alapján megállapítható, hogy a *Lactobacillus* törzsek kevésbé voltak érzékenyek, ugyanis csak néhány esetben tapasztaltam gátlást. O'RIORDAN és FITZGERALD (1998) is hasonló eredményeket kaptak az általuk vizsgált *Lactobacillus* törzsek esetén. Két törzs, a *B. longum* A4.8 és *B. bifidum* B5.1 esetében mértem egyértelmű gátló hatást, a *B. longum* A4.8 esetén a *Lb. acidophilus* La-5 és a *Lb. casei* 2756 törzsekre, míg a B5.1 esetén csak a *Lb. casei* 2756 törzsre. Továbbá a *B. longum* Bb-46 starterkultúra és a *B. dentium* B2.1 törzs mutatott bizonyos gátlást a *Lb. acidophilus* La-5 törzsre. Ezen eredmények reménykeltők lehetnek *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* vegyes kultúrák tervezése szempontjából.

A potenciálisan kórokozó baktériumok mindegyikét a *B. longum* A4.8 és a *B. bifidum* B7.5 törzs gátolta. A további gátlást mutató bifidobaktériumok is elsősorban a *B. longum* és a *B. bifidum* fajhoz tartoznak. Az irodalomban található adatok alapján is elsősorban e két fajnak tulajdonítanak antimikrobás hatást. Továbbá ezt bizonyítja az is, hogy ANAND és munkatársainak (1984) és YILDIRIM-nek és JOHNSON-nak (1998) *B. bifidum* törzseknél sikerült izolálni a bifidint illetve a bifidocin B-t, valamint FUJIWARA és munkatársai (1997) pedig egy *B. longum* törzs esetén mutattak ki gátló fehérje komponenst (BIF). A típus törzsek közül is a *B. bifidum* NCFB 1454 és a *B. longum* ATCC 15707 törzs mutatott jelentős gátlást. Meg kell jegyezni, hogy a *B. bifidum* NCFB 1454 törzset kontrollként alkalmaztam, ugyanis YILDIRIM és JOHNSON (1999) e törzs esetében izolálta a bifidocin B bakteriocint. E törzs csak az *E. coli* O157:H7 esetében mutatott kiemelkedő gátlást, az *Enterococcus faecalis* ellen viszont hatástalannak bizonyult.

16. táblázat Bifidobaktériumok antagonistája hatása a tesztörzsekre

Bifidobaktérium törzsek	A feltisztulási zóna és a telep átmérő aránya									
	<i>L. monocytogenes</i> 4ab	<i>Ec. faecalis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> ATCC 8439	<i>Lb. acidophilus</i> La-5	<i>Lb. plantarum</i> 2142	<i>Lb. casei subsp. pseudopl.</i> 2750	<i>Lb. casei subsp. casei</i> 2756	<i>Lb. curvatus</i> 2770	<i>Lb. curvatus</i> 2775
<i>B. bifidum</i> B5.1	2,5	1,33	-	1,2	1,1	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> B7.5	1,5	1,25	1,6	1,33	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> B1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> B3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> B7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> B8.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> A4.6	1,83	-	1,33	1,4	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> A4.8	1,94	1,88	1,2	1,8	2,0	-	-	1,44	-	-
<i>B. longum</i> A4.9	1,66	-	-	1,33	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> B2.2	1,28	-	1,6	1,33	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> B6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> A4.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> Bb-46 (Chr. Hansen)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> B9.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> B9.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> B10.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. lactis</i> Bb-12 (Chr. Hansen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. dentium</i> B2.1	-	-	-	1,11	+	-	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i> B4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> NCFB 1454	1,83	-	2,27	1,44	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> ATCC 15707	1,5	-	1,66	1,4	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> DSM 20213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. lactis</i> NCAIM 02020	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: volt gátlás, de a feltisztulási zóna nem volt mérhető; -: nem volt feltisztulás
érték=gátlási zóna átmérő (mm)/telep átmérő (mm)

A közvetlen sejt-sejt kontaktus esetén a potenciálisan kórokozó baktériumok közül a legérzékenyebbeknek a *L. monocytogenes* 4ab és az *E. coli* ATCC 8439 törzsek bizonyultak, amelyek szaporodását számos bifidobaktérium kultúra gátolta. E gátlóhatást a bifidobaktérium telepek körül kialakuló feltisztulási zónák mutatták. A legnagyobb mértékű gátlást a *L. monocytogenes* törzsre a *B. bifidum* B5.1 törzs fejtette ki, amelyet a feltisztulási zóna és a telep átmérő 2,5 aránya is jelez. Ez azért is fontos, mert a *L. monocytogenes* szélsőséges körülmények között is megőrzi életképességét (pl. vákuum, fagyasztás, UV sugárzás, pasztörözés), így élelmiszerekben is könnyen életben marad. Főleg az idősek, a csecsemők és a terhes nők veszélyeztetettek, a megbetegedettek között magas a halálozási arány. Az *E. coli* különböző patogén törzsei pedig bélhurtot, hasmenést és vastagbélgyulladást idézhetnek elő.

Egy *B. longum* A4.8, egy *B. bifidum* B5.1 törzs, egy starterkultúra, a *B. longum* Bb-46 és a *B. dentium* B2.1 törzs esetén vizsgáltam, milyen mértékben változik a gátló hatás a különböző tápközegeket alkalmazva. (Két jelentős és két csekély gátló aktivitással rendelkező törzsre esett a választás. Továbbá kíváncsi voltam, hogy a *B. longum* Bb-46 starterkultúra antagonista hatása változik-e, mert SLAČANAC és munkatársai (2007) publikációikban antimikrobás hatást társítanak e törzshöz.) A teszt törzsek közül csak azokat vontam be a vizsgálatba, amelyek esetén már korábban is gátló hatást tapasztaltam. A bifidobaktériumokat MRS-C (0,05% cisztein-HCl kiegészített), TPY és RCM tápoldatban szaporítottam (ennek megfelelően a kétrétegű spot alsó tápára is MRS, TPY és RCM volt), és 18 órás tenyészetként alkalmaztam. A különböző tápközegeken kapott gátlási zóna/telep átmérő értékek a 17. táblázatban láthatók.

17. táblázat Különböző tápközegek hatása az antimikrobás aktivitásra

<i>Bifidobacterium</i> törzsek	Tápközegek	Teszt törzsek					
		<i>L. monocytogenes</i> 4ab	<i>Ec. faecalis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> ATCC 8439	<i>Lb. acidophilus</i> La-5	<i>Lb. casei subsp.</i> <i>casei</i> 2756
<i>B. longum</i> A4.8	MRS	2,43	1,67	1,2	1,75	1,44	1,25
	RCM	1,5	1,5	1,67	1,5	1,83	-
	TPY	1,7	1,43	2,14	1,53	1,5	-
<i>B. dentium</i> B2.1	MRS	+	+	+	1,33	1,29	-
	RCM	-	-	-	-	+	-
	TPY	1,86	-	-	-	1,29	-
<i>B. bifidum</i> B5.1	MRS	2,29	2,13	+	1,33	1,44	-
	RCM	1,33	1,25	-	1,5	1,6	+
	TPY	1,43	-	-	-	1,22	-
<i>B. longum</i> Bb-46	MRS	-	-	-	-	-	-
	RCM	-	-	-	-	-	-
	TPY	2	1,43	1,71	1,67	1,33	+

+: volt gátlás, de a feltisztulási zóna nem volt mérhető; -: nem volt feltisztulás
érték=gátlási zóna átmérő (mm)/telep átmérő (mm)

A 17. táblázatban látható értékek azt mutatják, hogy az MRS tápközeg alkalmazása általában nagyobb gátlási értékeket eredményezett a *B. longum* A4.8, *B. dentium* B2.1 és a *B. bifidum* B5.1 törzsek esetében. Ezzel szemben a *B. longum* Bb-46 törzs csak a TPY tápközeg használatakor mutatott antagonista hatást.

A *B. longum* A4.8 mind a három tápközeg alkalmazásánál kifejtett ugyan gátló hatást, de a potenciális kórokozó baktériumoknál detektált értékek az MRS tápközeg esetén meggyőzőbbek.

A *B. dentium* esetén is az MRS tápközeg javasolható tenyésztésre, illetve nagyobb antimikrobás hatás elérése érdekében. A *B. bifidum* B5.1 törzsnél az MRS és az RCM tápközeg emelhető ki, de az MRS használatával kifejezettebb gátlás érhető el. A *L. monocytogenes* és az *Ec. faecalis* teszt törzseknél szignifikánsan nagyobb antagonista hatást detektáltam, ha MRS tápközeg használtam a B5.1 számára. A *B. longum* Bb-46 a TPY tápközegben hat teszt törzs közül ötre antagonista hatást fejtett ki, míg MRS-ben nem mutatott még csekély mértékű gátló hatást sem. E törzs esetén kapott eredmény felhívja a figyelmet arra, hogy a tápközeg meghatározó tényező az antimikrobás anyagok szintetizálása szempontjából.

Az eredmények rávilágítanak arra is, hogy a két *Lactobacillus* törzs közül a *Lb. acidophilus* La-5 bizonyult a legérzékenyebbnek minden tápközeg típus esetén. A bifidobaktérium törzsek a legnagyobb mértékű gátlást ismét a *L. monocytogenes* 4ab törzsszel szemben mutatták.

4.2.2 Különböző módon kezelt sejtmentes tenyészlevek antimikrobás hatása

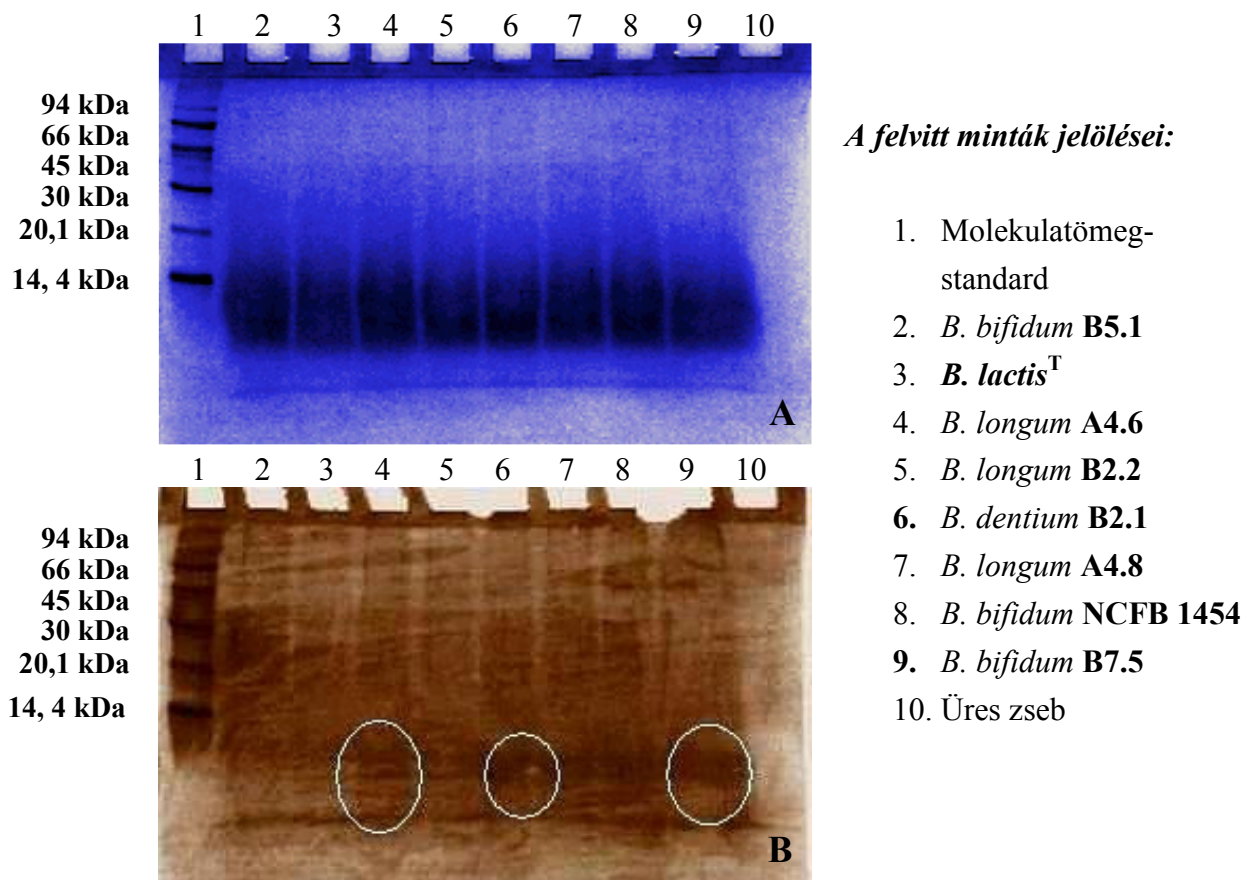
A kétrétegű spot módszer során antimikrobás aktivitást mutató törzsek sejtmentes felülúszóinak antagonista hatását vizsgáltam agardiffúziós módszerrel. A sejtmentes tenyészleveket különböző módon kezeltem, mielőtt az agarban kialakított lyukakba pipettáztam: (1) Semleges pH-ra állítottam a felülúszókat (2) 3000 és 10000 Da-os Microcon szűrővel a mintákat leszűrtem, és a szűrőn fennmaradt és átszűrt mintákat használtam; (3) Fagyasztva szárítással koncentráltam a semlegesített felülúszókat.

Az eredmények azt mutatták, hogy antimikrobás hatást sem a semlegesített sem az ultraszűréssel frakcionált minták nem mutattak a teszt törzsekre (*L. monocytogenes* 4ab, *Ec. faecalis*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* 8439) nézve. A *B. longum* A4.8 koncentrált felülúszójának vizsgálatánál kaptam pozitív eredményt, amely a teszt törzsek közül a *L. monocytogenes* 4ab törzsnél mutatott antagonista hatást. A gátlási zóna és a telepátmérő hányadosaként számolt érték 2,3 volt, amely erős gátlásnak számít. TOURÉ és munkatársai (2003) sem tapasztaltak – az eredményes spot módszer után – aktivitást a felülúszókban *L. monocytogenes*-sel szemben agardiffúziós módszerrel. Viszont amikor az általuk alkalmazott hat felülúszót a tizedére koncentrálták, a koncentrátumok alkalmazásával a hatból három izolátum már mutatott inhibíciót. Ugyanakkor LEE és munkatársai (2003) arról számolnak be, hogy mind a koncentrálatlan, mind a liofilizálással koncentrált (2, 5, 10, 20-szoros) *B. infantis* felülúszók gátolták a *Cl. difficile* törzset. A koncentrállással arányosan nőtt a gátlás mértéke.

4.2.3 A bifidobaktériumok sejtmentes tenyészlevében található antimikrobás fehérjék kimutatása

A bifidobaktériumok tenyészlevében lévő fehérjék vizsgálatára gélelektroforézist (egydimenziós SDS-PAGE) alkalmaztam, amelynek a célja a bifidobaktériumok által termelt fehérjék jellegének, mennyiségének és molekulatömegének feltérképezése volt. Kilenc *Bifidobacterium* törzs fehérjemintázatát vizsgáltam. A megfelelő fehérjemintázat elérése érdekében szükség volt az egydimenziós SDS-PAGE paramétereinek optimalizálására. A módszer optimalizálását követően a következő paramétereiket alkalmaztam: 15-20%-os gradiens gélt és 6%-os gyűjtőgélt készítettem,

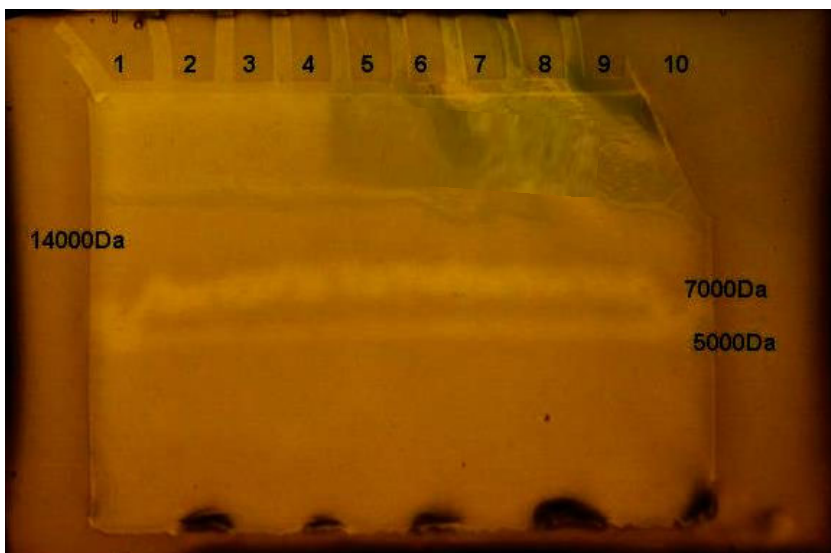
majd 200 V, 500 mA induló és 200 V, 14 mA vég paramétereket állítottam be. A futtatási idő pedig 30 perc volt. Az így kapott géleképeket a 10. ábrán szemléltetem.



10. ábra A bifidobaktérium törzsek fehérje mintázata Coomassie festéssel (A) és ezüst festéssel (B)

Az elektroforetikus mintázat alapján elmondható, hogy a fehérjék jelentős része a 14,4 kDa molekulatömeg határ alatt helyezkedik el. Az ezüstfestéses gélképen kivehető néhány kisebb molekulatömegű fehérje, amely a Coomassie festésnél nem egyértelműen elkülöníthető. A kapott géleképek alátámasztják azt a tényt, hogy a legtöbb detektált antimikrobás fehérje (bakteriocin) a II. csoportba tartozik, amely a 10 kDa alatti peptideket foglalja magába. YILDIRIM és JOHNSON (1999) által izolált bifidocin B molekulatömege is 10 kDa alatti (4432, Da) volt. LIÉVEN és munkatársai (2000) vizsgálataik alapján szintén ebbe a tartományba sorolták az általuk kapott antimikrobiális frakció molekulatömegét.

A gélelektroforézissel elválasztott fehérje specieszek antimikrobás hatásának kimutatására blottolást alkalmaztam. A *L. monocytogenes* 4ab törzset tartalmazó agarra blottoltam a gélelektroforézissel elválasztott fehérjéket és inkubálás után feltisztulási zónákat figyeltem meg. A 11. ábrán látható, hogy ~7000 és ~5000 Da molekulatömegű fehérjék gátlást fejtettek ki a teszt organizmus szaporodására. Viszont mivel nem fixáltuk a gélt valószínű, hogy a fehérjék szabadon diffundáltak az egymás melletti sávokba és emiatt jelentek meg egy vonalban. Mindenesetre ebből arra következtethettem, hogy egyes bifidobaktérium izolátumok termelnek kis molekulatömegű fehérje jellegű antimikrobás anyagot, amely gátolja a *L. monocytogenes* 4ab növekedését.



A minták jelölése:

1. Molekulatömeg-standard
2. *B. bifidum* B5.1
3. *B. lactis*^T
4. *B. longum* A4.6
5. *B. longum* B2.2
6. *B. dentium* B2.1
7. *B. longum* A4.8
8. *B. bifidum* NCFB 1454
9. *B. bifidum* B7.5
10. Üres zseb

11. ábra Bifidobaktérium törzsek antimikrobás hatása *Listeria monocytogenes* 4ab tesztorganizmussal szemben (Blot-technika)

4.2.4 *B. longum* A4.8 törzs további vizsgálatai

A további vizsgálatokat azért végeztem az A4.8 törzsszel, mert a spot módszer során jelentős antagonista hatást fejtett ki, az agardiffúziós módszernél pedig csak e törzs mutatott gátlást, és a felüszójának fehérjemintázatában is fellelhető volt kis molekulatömegű fehérje komponens.

Antagonista hatás vizsgálata különböző tenyésztési időpontokban

A minél nagyobb antimikrobás fehérje tartalom elérése érdekében megvizsgáltam, hogy hogyan változik a törzs antagonista hatása a különböző tenyésztési időpontokban. Ehhez kétrétegű spot módszert alkalmaztam. Teszt törzsként *L. monocytogenes* 4ab, *Ec. faecalis* és *E. coli* O157:H7 törzseket, kontroll/referencia törzsként pedig a *B. bifidum* NCFB 1454 bakteriocin termelő kultúrát [YILDIRIM & JOHNSON, 1999] használtam. Mintákat a tenyésztés 16., 18. és 20. órájában vettem. A mintavételi időpontokat az irodalmi adatokat figyelembe véve határoztam meg. A kapott gátlási értékeket a 18. táblázatban, a hozzá kapcsolódó szemléltető képeket a 12. ábrában mutatom be.

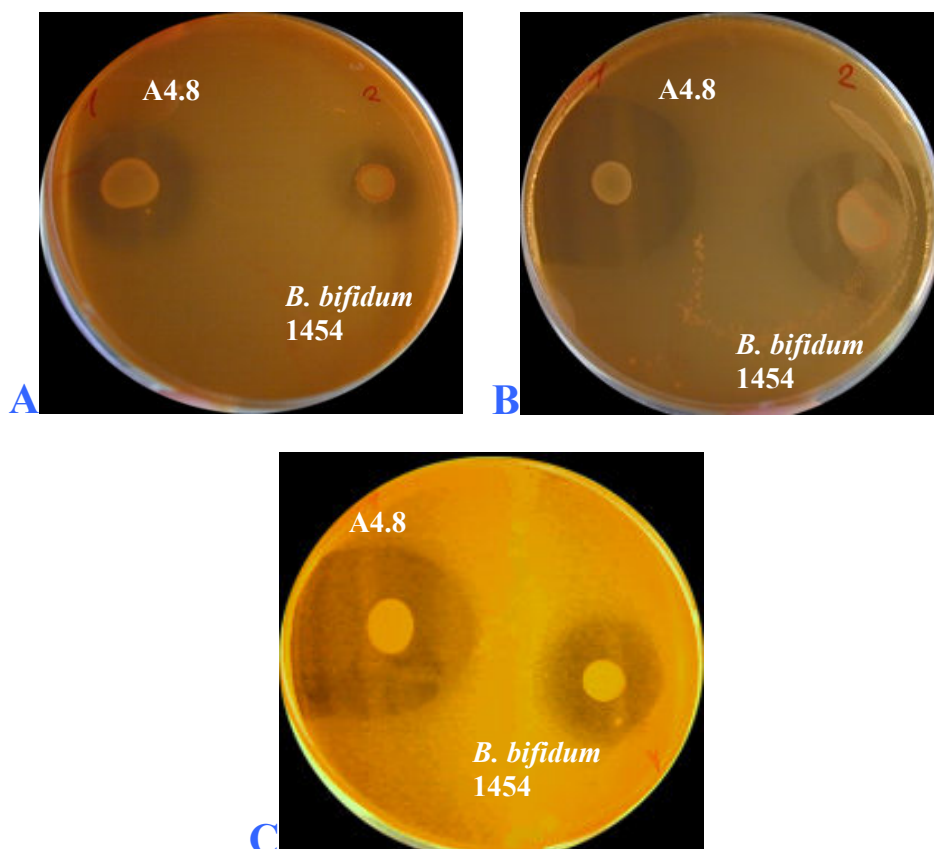
18. táblázat Bifidobaktériumok gátlásának mértéke a tenyésztési idő függvényében

<i>Bifidobacterium</i> törzsek	Tenyésztési idő [óra]	Gátlási zóna / telep átmérő hányadosa		
		<i>Ec. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i> 4ab	<i>E. coli</i> O157:H7
<i>B. longum</i> A4.8	16	1,75	2,5	2,57
	18	2,22	3	3,13
	20	2,45	3,2	3
<i>B. bifidum</i> NCFB 1454	16	1,95	2,21	2,5
	18	2,42	3,1	3,2
	20	2,57	2,66	2,9

Az eredmények alapján megállapítható, hogy 16. órára nem szintetizálódott annyi gátló komponens a tenyészlemben, mint a 18. és a 20. órában. Ez mindkét törzs esetében megfigyelhető.

A 18 és a 20 órás bifidobaktérium kultúra által kifejtett gátló hatás mértékében nem volt számottevő különbség. Egy esetben a *B. bifidum* törzs *L. monocytogenes*-re kifejtett gátlásánál láthatunk nagyobb különbséget (a többi adathoz viszonyítva) a 18 és a 20 órás érték között. A két bifidobaktérium törzset összehasonlítva elmondható, hogy közel azonos feltisztulási értékeket eredményeztek az egyes tenyésztési időpontokban a különböző teszt törzsek esetén.

Az irodalomban általában 16 óra körüli felszaporítási időt (késő exponenciális fázis) találunk a bifidobaktériumok esetében, amikor a tenyészlemben a legtöbb antimikrobás anyag szintetizálódik [COLLADO *et al.*, 2005; MAKRAS & DE VUYST, 2005]. Az optimális tenyésztési idő természetesen nagymértékben függ az adott törzs anyagcsere tevékenységétől.



**12. ábra *B. longum* A4.8 és *B. bifidum* NCFB 1454 törzs antimikrobiális aktivitása *Listeria monocytogenes* 4ab törzsszel szemben különböző tenyésztési időpontokban
A: 16. óra; B: 18. óra; C: 20. óra**

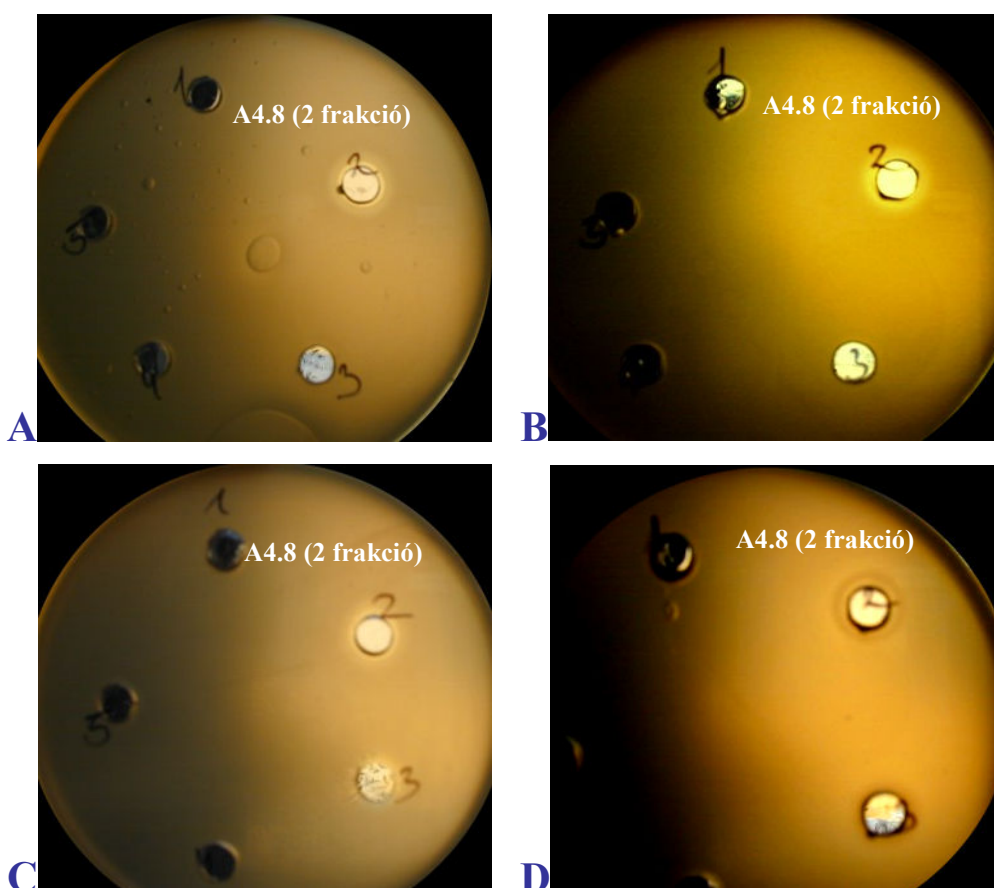
Rotoforral nyert egyedi fehérjefrakciók vizsgálata

A *B. longum* A4.8 törzs fehérjéinek izoelektromos pont alapján történő elválasztását rotofor készülékkel valósítottam meg, és 20 egyedi fehérjefrakciót kaptam. Az egyes frakciók antimikrobiális tulajdonságát – tartalmaznak-e gátlást kifejtő fehérjéket – agardiffúziós módszerrel vizsgáltam meg. Továbbá a frakciók fehérjemintázatának molekulatömeg szerinti megoszlásának kimutatására gélelektroforézist alkalmaztam.

A rotoforos elválasztás után nyert fehérje frakciók 2 ml-ét liofilizálással koncentráltam, majd visszaoldottam 250 µl semleges pH-jú pufferoldatban. Ezután a mintákat az 5 mm átmérőjű lyukakba pipettáztam.

Az agardiffúziós módszer értékelése során a kettős frakció esetén figyeltem meg feltisztulási zónát a *L. monocytogenes* 4ab, az *E. coli* ATCC 8439, az *E. coli* O157:H7, illetve az *Ec. faecalis* teszt törzseknél. A gátlási zónák, amelyeket a 13. ábra szemléltet, átmérője 9 és 13 mm között változott. A gélelektroforézises vizsgálatok alapján pedig megállapítható, hogy ezen fehérjék molekulatömege 5 és 7 kDa között volt. A *B. longum* A4.8 törzs 19-es, illetve 20-as frakciójánál is detektáltam kis (nem mérhető) gátlási zónákat a két *E. coli* teszt törzs esetében.

Ezen eredmények arra utalnak, hogy a *B. longum* A4.8 kultúra szintetizál antimikrobás anyagot az anyagcseréje során. A jövőben szükséges kidolgozni további tisztítási lépéseket, majd jellemezni a tisztított fehérje tulajdonságait. A megfelelően elkülönülő fehérjék tisztítására lehetséges megoldás lenne a kromatográfias elválasztás, amely egy esetleges továbblépési lehetőséget kínál.



13. ábra *B. longum* A4.8 törzs kettős frakciójának antimikrobás hatása *E. coli* ATCC 8439 (A), *E. coli* O157:H7 (B), *L. monocytogenes* 4ab (C) és *Ec. faecalis* (D) ellen

4.3 Bifidobaktériumok tapadása

A bifidobaktériumok tapadási vizsgálataim során arra kerestem a választ, hogy az adott bifidobaktériumok milyen mértékű tapadást mutatnak a Caco-2, HT29 és HT29-12 sejtvonalakhoz, illetve a versengő kitapadás során, hogyan változik a bifidobaktériumok tapadó képessége a Caco-2 sejtkultúrához. Továbbá megvizsgáltam, hogy hogyan alakul (arányosan nő vagy esetleg csökken) a tapadó baktériumok száma eltérő kiindulási sejtkoncentrációk esetén

HT29 sejtvonalakhoz. Mielőtt azonban elvégeztem a tapadási vizsgálatokat, összevettem a detektálási módszereket (lemezöntés, Gram-festés, fluoreszcens festés hexidium-jodiddal), valamint a festések után képanalízis segítségével kívántam a borítottsági százalékot meghatározni.

4.3.1 A detektálási módszerek vizsgálata

A kísérletekbe az előzetes vizsgálatok során jó tapadó képességgel rendelkező *Lb. casei* DSM20017 és a *B. bifidum* B3.2 törzset alkalmaztam [SZEKÉR *et al.*, 2005]. Vizsgáltam, hogy a különböző detektálási módszerek – a lemezöntés (kitenyésztés) és a sejtszámlálás (különböző festésekkel festett baktériumok esetében) – milyen eredményeket adnak az adott törzseknel, illetve mennyire megbízhatóak a módszerek egymáshoz képest. Továbbá a festési eljárások során meghatároztuk a borítottságot (a tapadó baktériumok által borított terület százalékos arányát). A hozzáadott és a különböző módszerekkel detektált tapadó baktériumok számát, arányát és a borítottságát a 19. táblázatban szemléltetem.

19. táblázat A hozzáadott és különböző módszerekkel meghatározott tapadó baktériumok száma, aránya és borítottsága

Detektálási módszerek		Baktérium törzsek	
		<i>Lb. sakei</i> DSM 20017	<i>B. bifidum</i> B3.2
Hozzáadott baktériumszám [tke/lyuk]		$1,65 \cdot 10^7 \pm 3,46 \cdot 10^6$	$1,30 \cdot 10^7 \pm 8,56 \cdot 10^6$
Lemezöntés	Tapadó baktériumszám [tke/lyuk]	$1,23 \cdot 10^6 \pm 4,16 \cdot 10^5$	$3,93 \cdot 10^5 \pm 2,64 \cdot 10^5$
	Tapadó bakt. aránya [%]	7,5	3,0
Gram-festés	Tapadó baktériumszám [tke/lyuk]	$2,24 \cdot 10^6 \pm 1,56 \cdot 10^6$	$4,78 \cdot 10^5 \pm 9,5 \cdot 10^5$
	Tapadó bakt. aránya [%]	13,6	3,7
	Borítottság [%]	$1,40 \pm 1,01$	$0,54 \pm 0,70$
Hexidium-jodidos festés	Tapadó baktériumszám [tke/lyuk]	n.a	$5,84 \cdot 10^5 \pm 2,13 \cdot 10^5$
	Tapadó bakt. aránya [%]	n.a	4,5
	Borítottság [%]	n.a	$3,14 \pm 1,02$

n.a: nincs adat

Az eredmények jól mutatják, hogy a *Lb. sakei* törzs jobb tapadóképességgel rendelkezik, mint a bifidobaktérium. A bifidobaktérium esetén a lemezöntés és a Gram festés között nem tapasztaltam jelentős különbséget, ami a tapadó baktériumok arányából jól látszik. Ezzel szemben a *Lb. sakei* törzs esetén szignifikáns különbség figyelhető meg a tapadó baktériumok aránya között, noha ez a különbség a kapott sejtszámokat tekintve nem olyan szembetűnő. A lemezöntés és a Gram-festés eredményei közötti eltérést a következők okozhatják: (1) lemezöntéssel csak azokat a sejteket tudjuk detektálni, amelyek tapadás után is életképességet mutatnak és kitenyészthetőek, valamint (2) ha a sejtek összetapadnak (aggregátumot képeznek) csak egy-egy telep nő ki a lemezen és ez nem tükrözi a tényleges baktériumszámot; (3) a Gram-festés során

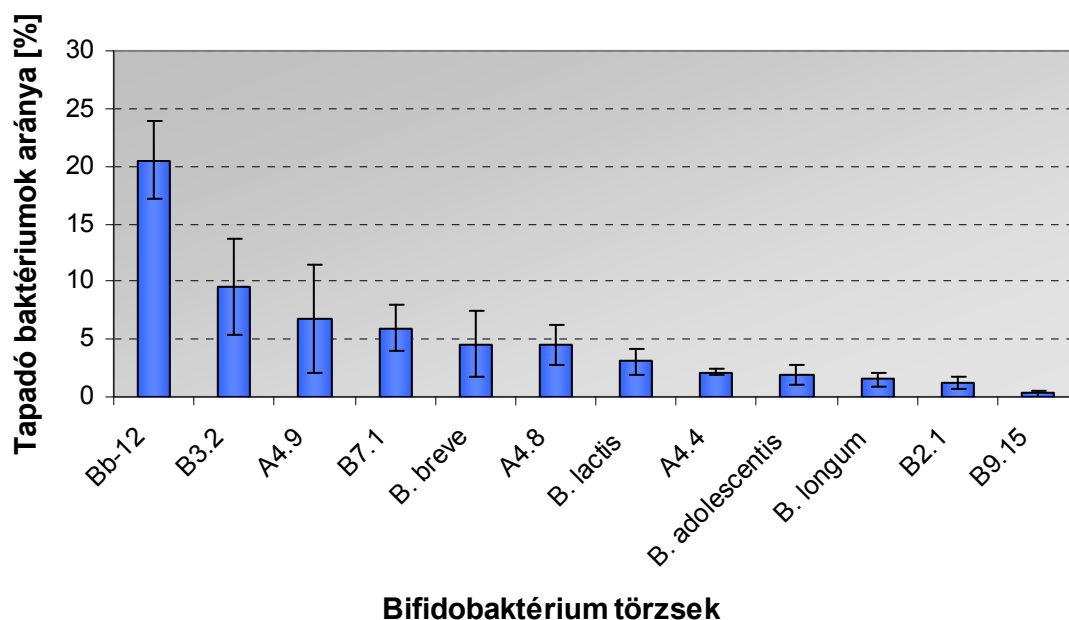
egyrészt szubjektíven történik a látómezők kiválasztása, másrészt ha a baktériumok eloszlása heterogén (mint esetünkben is) szintén nagy szórásokat kapunk a kiértékelés során (lásd a fényképeket a Melléklet III. ábrában) [LE BLAY *et al.*, 2004; VESTERLUND *et al.*, 2005/b].

A hexidium-jodidos festés nem adta a várt eredményt, ugyanis az előzetes optimalizációs kísérletek (festék mennyiség, mosás) ellenére a többszöri ismétlés során sem kaptunk egyértelmű eredményeket. A hexidium-jodidos festés során azt tapasztaltuk, hogy a Caco-2 sejtek olyannyira megfestődtek a baktériumokból kijutó festéktől, hogy az a többszöri mosás után is zavarta a kiértékelést, továbbá a baktérium sejtek is különböző mértékben (erőteljesebben, halványabban) festődtek (Melléklet II. ábra). A kapott eredmények is ezt tükrözik, mivel a *Lb. sakei* esetén nem lehetett értékelni az eredményeket, a *B. bifidum* B3.2 törzs esetén pedig túlbecsültük a tapadó baktériumok számát és arányát a Gram-festéshez képest, valamint a borítottság % is jelentősen nagyobb értéket mutatott, mint a Gram-festésnél. Ezen okok miatt a további vizsgálatoknál nem alkalmaztam ezt a detektálási módszert.

A borítottsági százalék alkalmas lehet a baktériumok tapadási képességének összehasonlítására, mivel a borított terület és a baktériumszám közötti összefüggés linearitást mutatott. (Az egyenes egyenlete: $y = 0,023x + 0,0386$; és az R^2 : 0,9163 [SZEKÉR *et al.*, 2007].) Tehát a borítottsági % segítségével viszonylag gyors előszelekció hajtható végre a törzsek tapadását illetően.

4.3.2 Különböző *Bifidobacterium* törzsek tapadóképességének feltérképezése

Az általunk kiválasztott 11 *Bifidobacterium* törzs tapadóképességét Caco-2 sejt vonalat felhasználva vizsgáltam meg. A tapadás mértékét Gram-festés segítségével határoztam meg. (Néhány mikroszkópos képet bemutatok a Melléklet III. ábráján.) Az eredményeket a tapadó baktériumok arányában (%) szemléltetem a 14. ábrán.



14. ábra *Bifidobacterium* törzsek tapadása Caco-2 sejt vonalhoz

A legjobb tapadást az élelmiszeriparban széles körben elfogadott tejipari starterkultúrából származó *B. lactis* Bb-12 törzs mutatta. Az intesztinális nyálkához történő tapadással foglalkozó

publikációkban még magasabb tapadási százalékot (26-30%) is közölnek erre a törzsr vonatkozóan [JUNTUNEN *et al.*, 2001; KIRJAVAINEN *et al.*, 1998]. A saját izolátumok közül elsősorban a *B. bifidum* (B3.2 és B7.1) és a *B. longum* (A4.8 és A4.9) törzsek esetén tapasztaltunk nagyobb mértékű tapadást, a többi törzshöz képest. Ebből a csoportból a *B. bifidum* B3.2 törzs 10 %-hoz közeli tapadását tartom jelentősnek. A legkisebb tapadó aktivitást az izolátumok esetén a *B. dentium* B2.1 (1,26%) és a *B. breve* B9.15 (0,30%) mutatta. Ezzel szemben viszont a *B. breve* típus törzsnél már közel 5%-os tapadási arányt kaptam, amely kiemelkedő a típus törzsek között, ugyanis a többi típus törzs tapadási aránya 3,0% alatt volt. RIEDEL és munkatársai (2006) is tapadási százalék alapján értékelték a bifidobaktériumok tapadását és hasonlóan az általam mért értékekhez az ő esetükben is a legtöbb bifidobaktérium törzs tapadási aránya 10% alatti tartományba esett. Az intesztinális nyálkához történő tapadással foglalkozó publikációk is általában 10% alatti tapadási arányról számolnak be a legtöbb bifidobaktérium törzssel kapcsolatban [HE *et al.*, 2001/a; HE *et al.*, 2001/b]. A Caco-2 sejthez történő tapadást RIEDEL és munkatársai (2006) törzsfüggő tulajdonságnak értékelik, amely a mi esetünkben szintén elmondható. További vizsgálatainkat a két legjobb tapadást mutató *B. bifidum* B3.2 és *B. lactis* Bb-12 törzssel végeztem.

4.3.3 Bifidobaktériumok tapadásának alakulása eltérő kiindulási sejtkoncentrációk esetén

A *B. bifidum* B3.2 és a *B. lactis* Bb-12 törzsek tapadási vizsgálata során, amelyben HT29 és HT29-12 sejtvonalakat alkalmaztam, arra kerestem a választ, hogy a különböző kiindulási koncentrációk hogyan befolyásolják a tapadó baktériumok számát. A kísérletben három kiindulási sejtkoncentráció hatását ($10^8, 10^7, 10^6$) vizsgáltam. A tapadás nyomon követésére lemezöntéses módszert használtam, amely megfelelően érzékeny a kis tapadó sejtkoncentráció detektálására is.

20. táblázat A *B. bifidum* B3.2 és a *B. lactis* Bb-12 tapadó sejt számának alakulása a különböző kiindulási sejtkoncentrációk függvényében

<i>Bifidobacterium</i> törzsek	Hozzáadott sejtkoncentráció [tke/lyuk]	Tapadó baktériumkoncentráció [tke/lyuk]/ (Tapadó baktériumok aránya [%])	
		HT29 szövetteny.	HT29-12 szövetteny.
<i>B. lactis</i> (Bb-12)	$2,34 \cdot 10^8$	$4,28 \cdot 10^5$ (0,18)	$4,96 \cdot 10^6$ (2,12)
	$5,22 \cdot 10^6$	$4,13 \cdot 10^4$ (0,79)	$5,18 \cdot 10^5$ (9,91)
	$8,06 \cdot 10^5$	$3,25 \cdot 10^4$ (4,03)	$6,58 \cdot 10^4$ (8,17)
<i>B. bifidum</i> (B 3.2)	$2,27 \cdot 10^8$	$4,87 \cdot 10^6$ (2,15)	$7,60 \cdot 10^6$ (3,35)
	$2,47 \cdot 10^7$	$5,19 \cdot 10^5$ (2,10)	$9,75 \cdot 10^5$ (3,94)
	$2,14 \cdot 10^6$	$7,03 \cdot 10^4$ (3,29)	$1,51 \cdot 10^5$ (7,07)

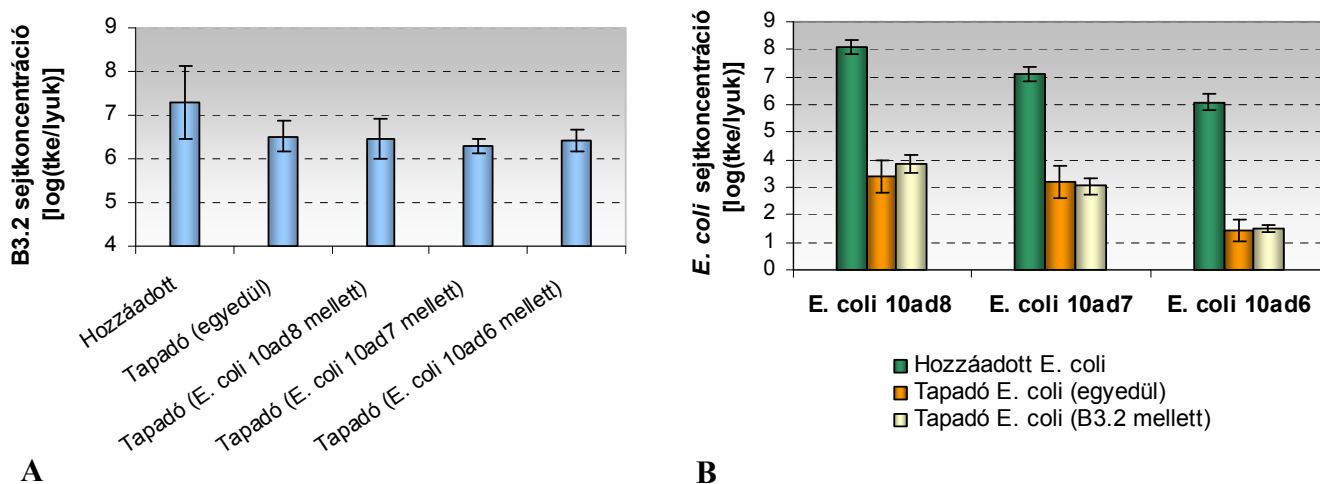
A 20. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a kiindulási sejtkoncentráció növelésével arányosan növekszik a tapadó baktériumok száma is. Ezt a következtetést vonta le TUOMOLA és SALMINEN (1998) is, amikor a *Lactobacillus* törzsek koncentrációfüggő tapadását vizsgálták Caco-2 sejtvonalhoz. Viszont az is megfigyelhető, hogy míg a 10^8 és a 10^7 induló sejtkoncentrációnál a detektált, megtapadt baktériumok koncentrációja két nagyságrenddel kisebb értéket mutatott, addig a 10^6 és 10^5 induló koncentrációnál a legtöbb esetben csak egy nagyságrendű csökkenést tapasztaltunk a tapadó baktériumszám esetén. Ezt a megállapítást a tapadó baktériumok arányának alakulása is alátámasztja, amely fordított arányosan változik a kiindulási sejtkoncentrációhoz képest.

Meg kell említenünk, hogy a tapadás mértékét jelentősen befolyásolhatja a törzsek autoaggregációs képessége [PÉREZ *et al.*, 1998] is, ugyanis a kötőhelyek esetleges telítődésével a baktériumok egymáshoz tapadhatnak, illetve egymásra rétegződhetnek a sejtkultúrák felszínén. Ez jelentősen megnehezíti a tapadó baktériumok pontos detektálását.

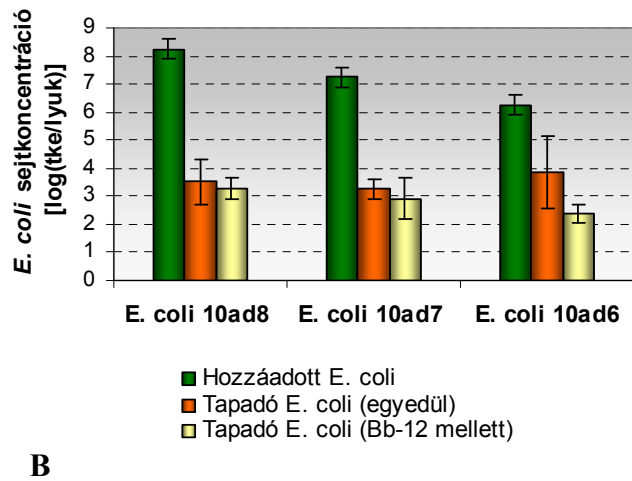
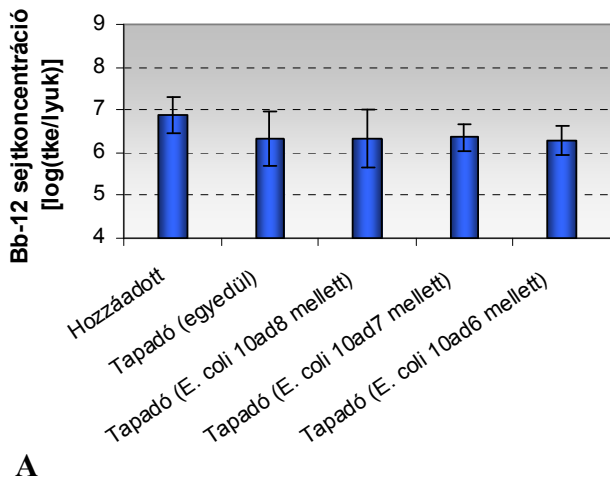
Az eredmények alapján továbbá megállapítható, hogy vizsgált szövettenyészetek közül a HT29-12 sejtkultúrához mindkét bifidobaktérium jobb tapadóképességet mutatott függetlenül a hozzáadott sejtkoncentrációtól. A törzsek közül pedig Bb-12 kultúra esetén tapasztaltam nagyobb tapadási affinitást, amely már a Caco-2 sejtvonal esetén is megmutatkozott.

4.3.4 *Bifidobacterium* törzsek és az *E. coli* Bay100 törzs versengő tapadásának vizsgálata

A kísérlet során a bifidobaktérium törzsekből (*B. bifidum* B3.2 és *B. lactis* Bb-12) $\sim 10^7$, az *E. coli* törzsből $\sim 10^8$, $\sim 10^7$, $\sim 10^6$ tke/lyuk sejtmennyiségek alkották az egyes vegyes kultúrákat. E vegyes kultúrákban szereplő törzsek tapadásának változását detektáltam – összevetve az egyedüli tapadásukkal – Caco-2 sejtkultúrához. A tapadó baktériumok meghatározása lemezöntéssel történt, valamint Gram-festés segítségével is értékeltem a tapadást. A kísérlet eredményeit az 15. és 16. ábrán mutatom be.



15. ábra A *B. bifidum* B3.2 (A) és az *E. coli* Bay100 (B) tapadó sejtkoncentrációjának változása egyedi és vegyes kultúrákban



16. ábra A *B. lactis* Bb-12 (A) és az *E. coli* Bay100 (B) tapadó sejtkoncentrációjának változása egyedi és vegyes kultúrákban

A kapott tapadási sejtkoncentrációk alapján elmondható, hogy nem változott sem a *B. bifidum* B3.2 sem a *B. lactis* Bb-12 tapadó sejtkoncentrációja *E. coli* Bay100 törzssel együtt történő a tapadás esetében összehasonlítva az egyedüli tapadási értékekkel (15. ábra/A és 16. ábra/A). Az *E. coli* Bay100 törzs tehát nem befolyásolta, illetve gátolta, még 10^8 tke/lyuk hozzáadott sejtkoncentrációnál sem, a bifidobaktérium törzsek tapadását. Ez mindenképpen pozitív eredménynek értékelhető.

Abban a tekintetben, hogy a bifidobaktériumok milyen hatást fejtettek ki az *E. coli* Bay100 törzsre a következő eredményeket kaptam: A *B. bifidum* B3.2 törzs nem gátolta az *E. coli* Bay100 tapadását a Caco-2 sejthez, sőt igaz csekély mértékben (nem szignifikánsan) még növelte a tapadását 10^8 tke/lyuk hozzáadott sejtkoncentráció esetében (15. ábra/B). A *B. lactis* Bb-12 ezzel szemben viszont inkább gátolta az *E. coli* Bay100 törzs tapadását és 10^6 tke/lyuk hozzáadott sejtkoncentráció esetén egy nagyságrendű csökkenést tapasztaltam az egyedüli tapadáshoz képest (16. ábra/B). GAGNON és munkatársai (2004) is gátlást figyeltek meg az *E. coli* O157:H7 törzssel szemben, amely a bifidobaktériumok sejt számának növelésével arányosan nőtt. Ugyanakkor esetükben a Caco-2 sejtenyészeten megtapadt bifidobaktérium koncentráció is csökkent.

A *B. bifidum* B3.2 és *B. lactis* Bb-12 törzs közötti különbség a különböző anyagcsere termelésből (gátló komponensek), illetve a kötőhelyekért történő versengésben kereshető. BERNET és munkatársai (1993) *B. breve* 4 törzs tapadási vizsgálatánál, ahol 50%-os gátlást tapasztaltak mindegyik patogénre (DAEC, EPEC, ETEC, *Sa. Typhimurium*), két lehetséges gátlási mechanizmust fogalmaztak meg: az egyik a patogének kizárása a specifikus kötőhelyekről a másik a baktérium biofilm kialakulása, amely meggátolja az enterovirulens baktériumok hozzáférését.

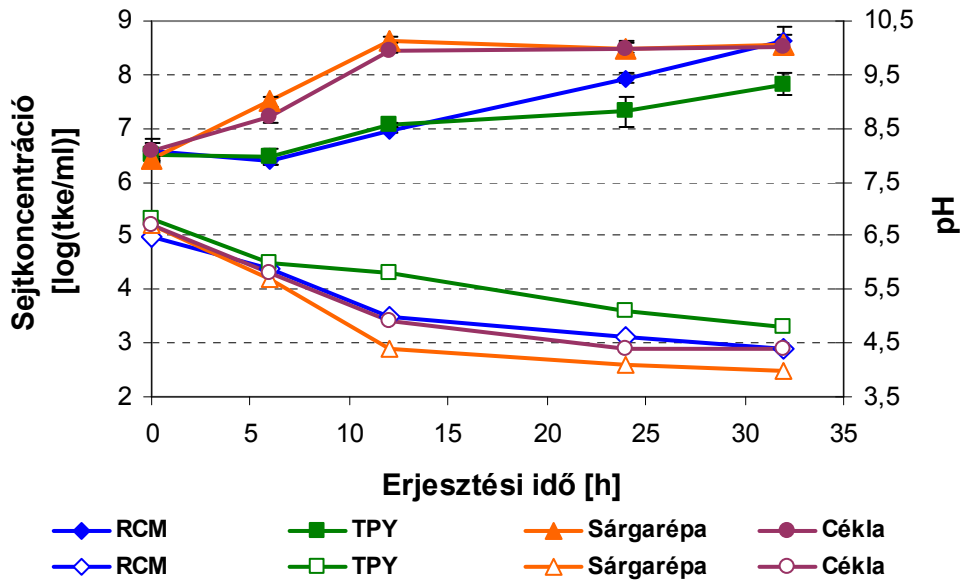
4.4 Erjesztési vizsgálatok

Az erjesztési kísérletekben az irodalmi részben említett, számos kedvező tulajdonsággal rendelkező zöldségek alkalmazhatóságát (mint tápközeg), illetve erjeszthetőségét vizsgáltam elsősorban *Bifidobacterium* törzsek, valamint a vegyes kultúrában résztvevő tejsavbaktériumok

számára. Termékfejlesztési céljainkat is figyelembe véve léptéknövelési és tárolási vizsgálatokat végeztem sárgarépa- és csicsóka levekben.

4.4.1 Zöldséglevelek erjeszhetőségének vizsgálata

Összehasonlító vizsgálatokat terveztem a bifidobaktérium törzsek szaporodására vonatkozóan, a zöldséglevelek és a bifidobaktériumok számára ajánlott laboratóriumi tápközegek alkalmazásával.



Teli jelölők: sejtkoncentráció; Üres jelölők: pH értékek

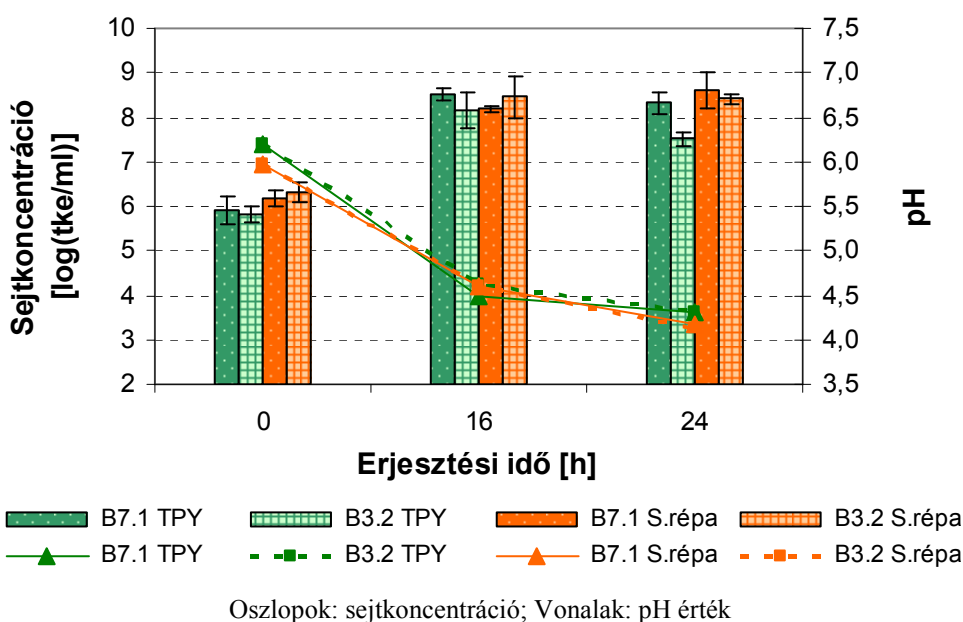
17. ábra A sejtkoncentráció és a pH értékek alakulása RCM és TPY, sárgarépa-, illetve céklalé *B. lactis* Bb-12 starterkulturával történő erjesztése során

E vizsgálatnál *B. lactis* Bb-12 törzs szaporodását követtem a bifidobaktériumok szaporításához ajánlott laboratóriumi tápközegeken (TPY, RCM), valamint sárgarépa- és céklaleven. Az erjesztés során bekövetkező sejtkoncentráció és a pH érték változását a 17. ábrán szemléltetem.

A 32 órás erjesztési időtartam alatt az RCM-ben és mindkét zöldséglevében mintegy két, a TPY táplevesben egy nagyságrendű sejtkoncentráció növekedést tapasztaltam. Viszont a sárgarépa- és a céklalé esetében a bifidobaktérium törzs már a 12. órában elérte a 10^8 nagyságrendű sejtkoncentrációt (sárgarépa: $4,39 \cdot 10^8$ tke/ml; cékla: $2,70 \cdot 10^8$ tke/ml), és a szaporodásuk stacioner fázisba került, valamint a sejtek 32 óra elteltével is megtartották életképességüket. A zöldséglevelekben mért fajlagos szaporodási sebességek, amely a sárgarépa esetében $0,18 \text{ óra}^{-1}$, a céklalénél $0,15 \text{ óra}^{-1}$, ezzel szemben az RCM-ben $0,084 \text{ óra}^{-1}$ és a TPY-ben pedig csak $0,043 \text{ óra}^{-1}$, is azt mutatják, hogy e zöldséglevelek alkalmas tápközegek lehetnek a bifidobaktérium számára. A törzs megfelelő anyagcsere tevékenységére utal a zöldséglevelek pH-jának 4,5 érték alá történő csökkenése is.

A tanszék munkatársai által izolált humán eredetű törzsek [MAYER, 2004] vizsgálatával kívántam megerősíteni eredményeimet. Ebben az esetben is arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a kiválasztott törzsek milyen szaporodást mutatnak a zöldséglevelekben. *B. bifidum* törzseket (B3.2 és B7.1), amelyek az egészséges csecsemők bélrendszerében találhatóak, vontam be a vizsgálatba. A *B. bifidum* B7.1 törzsnek a *B. lactis* Bb-12 törzshöz hasonlóan jó savtoleranciát, a

B. bifidum B3.2 törzsnek pedig jó tapadó képességet tulajdonítanak. Szaporodóképességüket a TPY mellett sárgarépalében vizsgáltam.



18. ábra A sejtkoncentráció és a pH értékek alakulása TPY és sárgarépalé *B. bifidum* B7.1 és B3.2 törzsszel történő erjesztése során

Az 18. ábrán látható, hogy mindkét törzs mind a TPY táplevesben, mind a sárgarépalében elérte a 10^8 tke/ml sejtkoncentrációt az erjesztés 16. órájára. Ebben az időpontban a legnagyobb sejtkoncentrációt a *B. bifidum* B7.1 törzsnél a TPY táplevesben ($3,28 \cdot 10^8$ tke/ml) és *B. bifidum* B3.2 kultúrájánál a sárgarépalében ($3,01 \cdot 10^8$ tke/ml) detektáltam. Az erjesztés 24. órájára a *B. bifidum* B3.2 törzs megőrizte életképességét, és a *B. bifidum* B7.1 törzs már a sárgarépalében mutatta a legnagyobb sejtkoncentrációt. A legkisebb sejtkoncentrációt a TPY táplevesben mértem, ahol a *B. bifidum* B3.2 törzs sejtkoncentrációja egy nagyságrenddel csökkent. A kapott eredményekből megállapítható, hogy a zöldséglevelek ideális tápanyagforrást kínálnak a bifidobaktériumok számára. SAVARD és munkatársai (2003) is arra a következtetésre jutottak, hogy az általuk alkalmazott zöldség tápközeg, amely 6% sárgarépalét, 12% káposztalét és 3% hagymalét tartalmazott, megfelelő tápanyag ellátást biztosít az általuk vizsgált *B. breve* és *B. bifidum* törzsek számára.

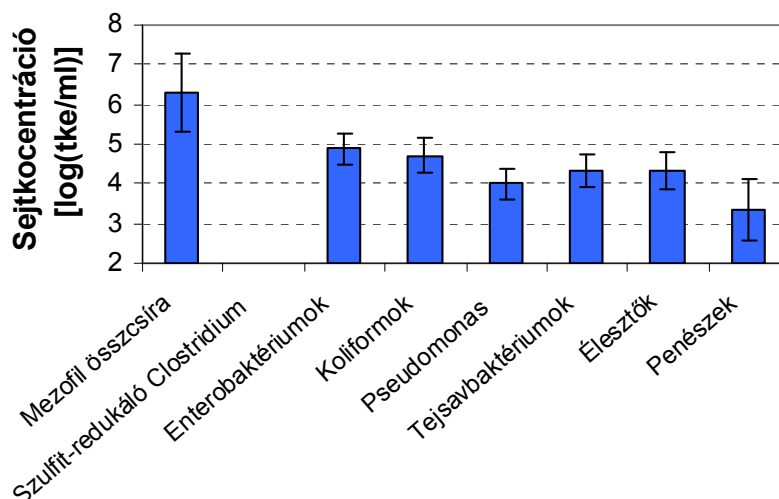
4.4.2 Erjesztési vizsgálatok sárgarépalén

Az erjesztési vizsgálataim során első lépésként a nyers sárgarépa mikrobiológiai állapotát vizsgáltam meg. Ezt követően a sárgarépa mikrobiotájának csökkentésére különböző előkezelési technológiákat használtam fel. Továbbá feltérképeztem a bifidobaktériumok anyagcsere tevékenységét a pasztörözött sárgarépalében és végül léptéknövelési és tárolási vizsgálatokat végeztem.

4.4.2.1 Natúr sárgarépa-levél jellemző mikrobiotájának feltérképezése

Az erjesztési technológiák kidolgozása előtt információt gyűjtöttem a natúr sárgarépa-levél mikrobiotájára vonatkozóan. A nyers sárgarépalé mikrobiológiai állapotára vonatkozó

vizsgálataim során a répalevek mezofil összcsíraszama 10^5 - 10^8 tke/ml közötti tartományban változott a felhasznált répa származási helyétől és előéletétől függően. A gyökérzöldségek jellemző mikrobiotáját alkotó csoportok (enterobaktériumok, koliformok, *Pseudomonas*-ok, tejsavbaktériumok, élesztők, penészek, szulfít-redukáló baktériumok (*Clostridium*-ok)) vizsgálata során 10^5 tke/ml, illetve annál kisebb mikrobasűrűséget mértem. Csak a szulfít-redukáló *Clostridium*-ok sejtszáma volt a kimutatási határ alatt (19. ábra). Ezek alapján megállapítható, hogy a répalevek előkezelése szükséges a csíraszám csökkentés érdekében.



19. ábra Nyers répalevek mikrobiológiai állapota

4.4.2.2 Előkezelési technológiák a sárgarépalevek natív mikrobiotájának csökkentésére

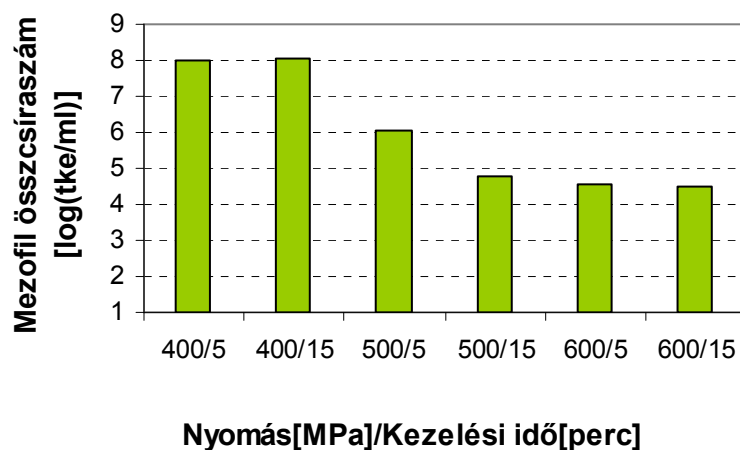
A kezeletlen natúr zöldséglevelek alkalmazása erjesztett levek előállítására élelmiszerbiztonsági kockázattal jár (4.4.2.1. fejezet). Ezért a sárgarépalevek mikrobaszám csökkentésére a pasztörözést alkalmaztam, mint előkezelést. Vizsgáltam a 80°C -on 15 és 20 percig történő hőkezelés hatékonyságát, továbbá arra is kerestem a választ, hogy az induló sejtkoncentráció milyen hatással van a környező mikrobiota alakulására az erjesztés folyamán. A pasztörözés mellett megvizsgáltam a nagy hidrosztatikus nyomású (HHP) kezelés alkalmazhatóságának lehetőségét is.

A nyers zöldséglevek 80°C -on 15 percig történő pasztörözése után a levek átlagos mezofil aerob baktérium száma 10^2 nagyságrendű ($2,13 \cdot 10^2$ tke/ml), míg a koliform koncentráció $3,24 \cdot 10^1$ tke/ml volt. Amikor a pasztörözés idejét 20 percre emeltük, akkor a kísérő mikrobiota koncentrációja kimutatási határ (10^1 tke/ml) alá csökkent.

Az induló sejtkoncentráció hatását a *B. lactis* Bb-12, *B. bifidum* B7.1, *B. bifidum* B3.2 és *B. longum* A4.8 törzsekkel végzett erjesztésekben vizsgáltam meg. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a 10^7 tke/ml induló sejtszám mindegyik törzs esetében gyorsabb szaporodást eredményezett és a törzsek már az erjesztés 6. órájában elérték a 10^8 nagyságrendű sejtszámot. Ezzel szemben a 10^6 tke/ml induló sejtszámnál a törzsek csak a 24. órában mutatták a 10^8 tke/ml nagyságrendű sejtszámot. Ezek révén, illetve a kisebb anyagcsere tevékenység következtében a kísérő mikrobiota koncentrációjában jelentős különbség alakult ki, ugyanis a 10^6 tke/ml induló koncentrációnál az erjesztés végén $5 \cdot 10^4$ – $8 \cdot 10^5$ tke/ml, a 10^7 tke/ml induló esetén

pedig csak $3,46 \cdot 10^1 - 1,65 \cdot 10^2$ tke/ml mezofil összcsíraszámot detektáltam. Ennek alapján 10^7 (tke/ml) induló sejtkoncentráció javasolható a pasztörözött sárgarépa levek erjesztésének indításához.

A nagy hidrosztatikus nyomás alkalmazhatóságának vizsgálatánál első lépésként meghatároztam a sárgarépa előkezelése szempontjából optimális nyomást és időintervallumot. E paraméterek megállapítására azt vizsgáltam, hogy milyen mértékben aktiválódik és szaporodik a kezelést követően visszamaradó mikrobiota 18 órás 37°C inkubálást követően. A 20. ábra a mezofil összcsíraszámot mutatja a 18 órás 37°C -on történő inkubálás után, amelynek a koncentrációja a kezelést követően, azaz az inkubálás kezdetén kimutatási határ alatt volt.



20. ábra Különböző paraméterű nagy hidrosztatikai nyomással kezelt minták mezofil összcsíraszama 18 órás inkubálást követően

A 20. ábra jól tükrözi, hogy a nagyobb nyomás és hosszabb időintervallum a 18 órás inkubálás után kisebb mezofil összcsíraszámot eredményezett. Ezen vizsgálat alapján és az irodalmi adatok figyelembevételével választottam a nagynyomású kezelés paramétereinek a 600 MPa –t és a 15 perces időtartamot [TEO *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2001].

Ezzel a paraméterekkel kezelt zöldségleveket *B. lactis* Bb-12, *B. bifidum* B7.1, *B. bifidum* B3.2 és *B. longum* A4.8 törzsekkel erjesztettem és arra voltam kíváncsi, hogyan alakul a mezofil összcsíraszám a 24 órás erjesztés végére. A kapott értékeket összevetettem a pasztörözött, szintén ezen törzsekkel erjesztett sárgarépa lebében mért mezofil összcsíra koncentrációkkal. (Az erjesztéseket 10^7 tke/ml sejtkoncentrációval indítottam.) A HHP kezelt és a hőkezelt, majd erjesztett minták mezofil összcsíraszámának változását a 21. táblázatban mutatom be.

21. táblázat Különböző bifidobaktérium törzsekkel erjesztett sárgarépa levek mezofil összcsíraszama az előkezelés függvényében

Erjesztési idő [h]	Mezofil összcsíraszám [tke/ml]							
	<i>B. bifidum</i> B7.1		<i>B. lactis</i> Bb-12		<i>B. bifidum</i> B3.2		<i>B. longum</i> A4.8	
	80°C 20 min	600 MPa 15 min	80°C 20 min	600 MPa 15 min	80°C 20 min	600 MPa 15 min	80°C 20 min	600 MPa 15 min
12	$4,0 \cdot 10^1$	$9,6 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^1$	$1,28 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^1$	$4,1 \cdot 10^2$
24	$1,2 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^2$	$7,3 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^2$	$1,62 \cdot 10^3$

A 21. táblázat adatai azt mutatják, hogy a kezelések között a 12. órában egy nagyságrendű különbség volt. Az erjesztés végére is különbségeket tapasztaltunk a mezofil összcsíraszámában a két előkezelés között. A Bb-12 törzssel erjesztett sárgarépalé kivételével a többi esetben egy, illetve két nagyságrendű eltérés volt a pasztörözött és a HHP kezelt, majd erjesztett minták összcsíraszámában a 24. órára. Ez valószínű a nagyobb induló mezofil összcsíraszámra volt tulajdonítható.

A bifidobaktériumok mind a pasztörözött, mind a HHP kezelt sárgarépalében egyenletes, gyors szaporodóképességet mutattak (Melléklet IV. ábra). A megfelelő anyagcsere tevékenységet bizonyítja a pH érték 4 körüli értékre való csökkenése a fermentáció 6-12. órájában. A legmagasabb sejtkoncentráció értéket ($9,02 \cdot 10^8$ tke/ml) a pasztörözött répalében mértük – a B7.1 törzsnél – az erjesztés 12. órájában. Ezek alapján a pasztörözést, mint előkezelést megfelelőbb eljárásnak tekinthetem, amely mellett a könnyebb megvalósíthatóság is szól. A HHP kezelés további optimalizálására van szükség. Például VAN OPSTAL és munkatársai (2005) sikeresen alkalmazták a kezelést *E. coli* inaktiválására sárgarépalében.

4.4.2.3 Bifidobaktériumok növekedésének és anyagcsere tevékenységének vizsgálata

A kísérlet során a *B. lactis* Bb-12, *B. bifidum* B 7.1, *B. bifidum* B3.2 és *B. longum* A4.8 törzsek szaporodását követtem pasztörözött (80°C, 20 perc) sárgarépalében, valamint vizsgáltam a kísérő mikrobiota változását a 24 órás erjesztés alatt. Továbbá meghatároztam az erjesztés alatt termelődő tejsav és ecetsav mennyiséget, valamint mértem az összecukor ezen belül a glükóz, fruktóz, szacharóz koncentráció változását és a karotinoid tartalom alakulását.

A 10^7 tke/ml induló sejtkoncentrációnak köszönhetően a rövid lag fázis után mind a négy törzs az erjesztés 6. órájában elérte a 10^8 nagyságrendű sejtkoncentrációt (22. táblázat). Az erjesztés 12. órájában pedig már a legnagyobb sejtkoncentrációt detektáltam a törzsek – kivéve a B3.2 kultúra – esetében. A Bb-12 sejtkoncentrációja ebben az időpontban 8,22 log(tke/ml), a B7.1 törzsé 8,96 log(tke/ml), és az A4.8 kultúráé pedig 8,37 log(tke/ml) volt. A B3.2 törzs az erjesztés végén érte el a maximális sejtszámot, amely 8,71 log(tke/ml) volt. Kiszámítva a fajlagos sejthozamokat az irodalmi adatokkal egyező értékeket kaptam, amely a Bb-12 törzsnél $2,48 \cdot 10^{10}$ tke/l*h, a B7.1 esetén $6,26 \cdot 10^{10}$ tke/l*h, B3.2 törzsnél $7,60 \cdot 10^{10}$ tke/l*h, és az A4.8 törzsnél $4,50 \cdot 10^{10}$ tke/l*h volt. VENTLING és MISTRY (1993), GARRO és munkatársai (2004), valamint DOLEYRES és munkatársai (2002) 10^8 és 10^{12} tke/l*h közötti fajlagos sejthozamokról számoltak be. Az erjesztési folyamat gyors lefolyását jelzi a pH értékek alakulása is, hiszen már a hatodik órában 5,0 alá és az erjesztés végére pedig 4,0 közeli értékre csökkent. A detektált végső pH élelmiszerbiztonsági szempontból is kedvező.

A pasztörözést követően (0. órában) nem mutattam ki mikrobiológia szennyezettséget, azaz minden vizsgált csoport baktérium száma kisebb volt, mint 10 tke/ml. Az erjesztés folyamán a mezofil összcsíraszámot és a koliformokat detektáltam. A gyors erjesztési folyamat ellenére mezofil összcsíra koncentráció 10^1 - 10^2 tke/ml nagyságrendű tartományban mozgott, míg a koliform koncentráció a kimutatási határ alatt volt az erjesztés végén (22. táblázat). A *B. bifidum* A4.8, amelyet antimikrobás hatása miatt vontam be a vizsgálatokba, nem mutatott nagyobb gátló hatást a többi törzshöz viszonyítva a mezofil összcsíraszámra nézve.

22. táblázat Az erjesztés során mért sejtkoncentrációk, pH és a szénhidrát koncentráció változása

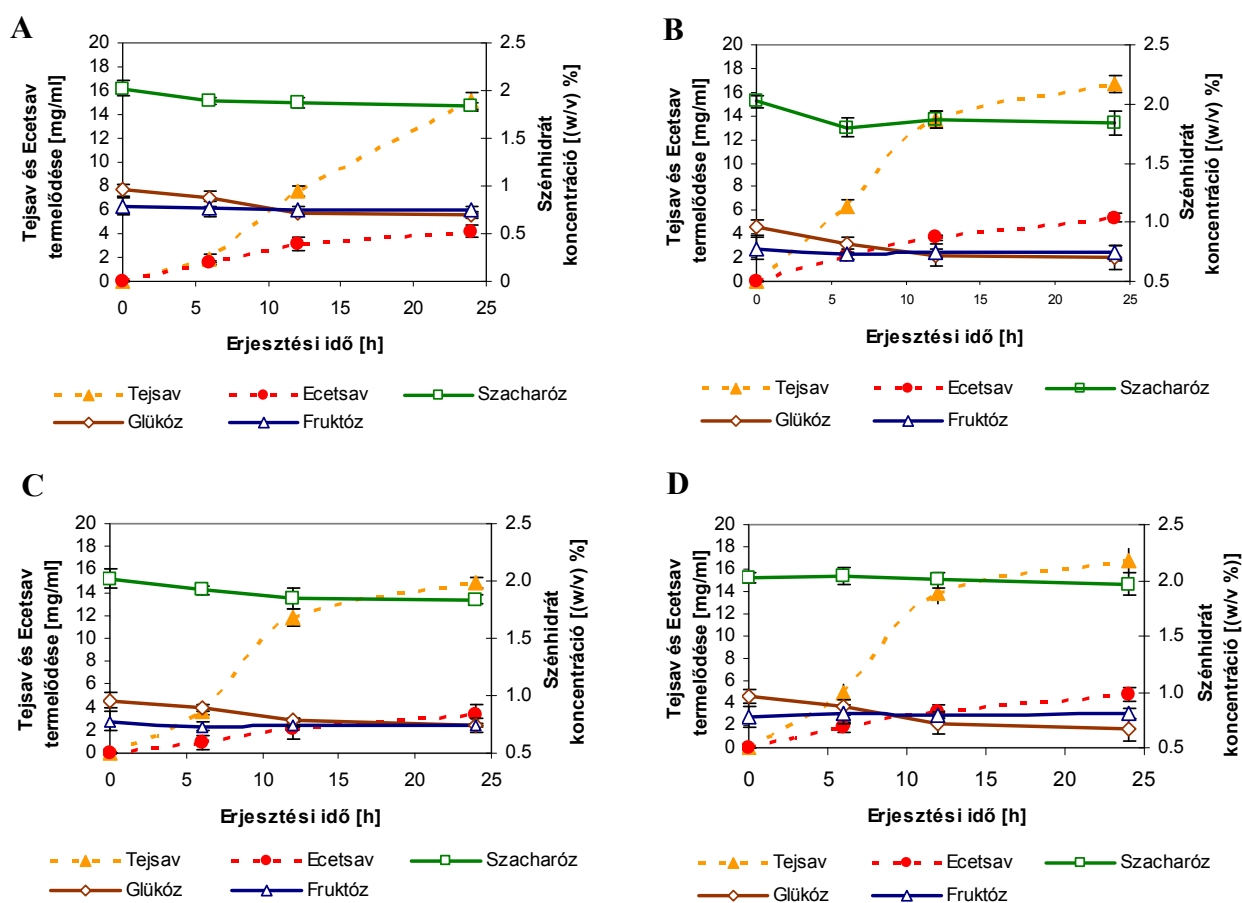
Törzsek	Erjesztési idő [h]	Bifidobaktérium [log(tke/ml)]	Mezofil összcsíra [log(tke/ml)]	Koliformok [log(tke/ml)]	pH	Összszénhidrát [(w/v)%]
<i>B. lactis</i> Bb-12	0	7,21±0,26	n.d	n.d	6,4	4,36±0,21
	6	8,17±0,14	1,00±0,21	n.d	4,9	4,12±0,81
	12	8,22±0,10	3,50±0,88	1,68±0,77	4,3	3,91±0,77
	24	7,88±0,11	2,22±0,86	n.d	4,24	3,81±0,52
<i>B. bifidum</i> B3.2	0	7,64±0,20	n.d	n.d	6,4	4,36±0,21
	6	8,44±0,78	n.d	1,97±0,82	4,85	3,92±0,14
	12	8,54±0,19	1,30±0,21	1,65±0,46	4,2	3,88±0,91
	24	8,71±0,27	1,54±0,26	n.d	4,15	3,80±0,44
<i>B. bifidum</i> B7.1	0	7,14±0,24	n.d	n.d	6,4	4,36±0,21
	6	8,47±0,54	n.d	n.d	4,9	4,14±0,41
	12	8,96±0,39	1,00±0,22	1,24±0,37	4,2	3,94±0,82
	24	8,82±0,38	1,78±0,55	n.d	4,15	3,88±0,31
<i>B. longum</i> A4.8	0	7,42±0,41	n.d	n.d	6,4	4,36±0,21
	6	8,32±0,67	1,86±0,12	n.d	4,76	4,31±0,72
	12	8,37±0,71	1,94±0,32	1,19±0,28	4,2	4,10±0,32
	24	8,04±0,87	2,43±0,78	n.d	4,14	4,04±0,12

n.d: nem detektálható (kimutatási határ (10^1 cfu/ml) alatt van)

Az erjesztés folyamán a bifidobaktériumok tejsav termelése intenzívebb volt, mint az ecetsav termelése. A tejsav és ecetsav változását az 21. ábrán láthatjuk az egyes törzsek esetében. A bifidobaktériumok biokémiai folyamataival foglalkozó publikációkban a glükóz lebontása során ecetsavra és a tejsavra nézve 3:2 moláris arányt találunk, amely természetesen csak elméleti arány és kevés esetben valósul meg [GOMES & MALCATA, 1999]. A tejsav és ecetsav aránya függhet a törzsektől, a tápközegtől és még a fermentációs időtől is [HOU *et al.*, 2000]. Az erjesztés végén a tejsav koncentráció 15-17 mg/ml, az ecetsav koncentráció pedig 3,3-5,3 mg/ml tartományban változott az egyes törzsek esetében.

Az összszénhidrát tartalom is jól jellemzi a törzsek anyagcsere tevékenységét, amelynek a változását a 22. táblázatban tüntettem fel. Mindegyik törzsnél fokozatos egyenletes szénhidrát tartalom csökkenést figyelhettem meg. A Bb-12, a B3.2 és B7.1 törzs esetében hasonló mértékű szénhidrát fogyást (4,36-ról 3,80-3,88 (w/v)%-ra), míg az A4.8 kultúrájánál kisebb fogyást (4,36-ról 4,04 (w/v)%-re) detektáltam. A szénhidrátok közül a szacharóz, a fruktóz és a glükóz koncentráció változását a különböző törzsek esetében az 21. ábrán szemléltetem. A diagramok alapján megállapítható, hogy a törzsek a sárgarépalé glükóz tartalmát hasznosították legjobban (20-22%-ot). A legnagyobb mértékű csökkenést az A4.8 törzsnél detektáltam. A szacharóz esetében kisebb hasznosítást mértem. Az erjesztés végére a Bb-12, B3.2 és a B7.1 törzs a szacharóz tíz százalékát az A 4.8 törzs mindössze a három százalékát hasznosította. A fruktózt

nem hasznosították a törzsek, mely eredmény összhangban van szénhidrát vizsgálatoknál kapott eredményekkel.



21. ábra A szénhidrát hasznosítás, valamint a tejsav és ecetsav-termelés sárgarépalé erjesztésénél

A: *B. lactis* Bb-12, B: *B. bifidum* B3.2, C: *B. bifidum* B7.1, és D: *B. longum* A4.8

A vizsgálataim során arra is kíváncsi voltam, hogy a bifidobaktériumokkal történő erjesztés, milyen hatással van a sárgarépa táplálkozásélettani szempontból fontos komponenseire, a karotinoidokra. Az α -karotin és β -karotin tartalmat az erjesztés 0. és 24. órájában (végén) határoztam meg (23. táblázat).

23. táblázat Az α - és β -karotin koncentráció alakulása különböző bifidobaktérium törzsekkel történő erjesztés során

Erjesztési idő [h]	α - és β -karotin koncentráció [$\mu\text{g/ml}$]							
	<i>B. bifidum</i> B7.1		<i>B. lactis</i> Bb-12		<i>B. bifidum</i> B3.2		<i>B. longum</i> A4.8	
	α -karotin	β -karotin	α -karotin	β -karotin	α -karotin	β -karotin	α -karotin	β -karotin
0	85,80	199,13	85,80	199,13	85,80	199,13	85,80	199,13
24	82,11	182,48	71,90	152,60	68,58	149,40	64,54	140,53
Csökkenés %-ban	4	9	14	24	17	26	22	30

A 24 órás fermentációt követően a sárgarépalé karotinoid tartalma csökkent. Az egyes törzsek esetén különböző mértékű csökkenést detektáltam. Az α - és β -karotin tartalom a *B. bifidum* B7.1

törzzsel történő erjesztés során csökkent legkisebb mértékben (4 és 9%). A legnagyobb veszteséget (22 és 30%) a *B. longum* A4.8 törzzsel erjesztett mintákban detektáltam.

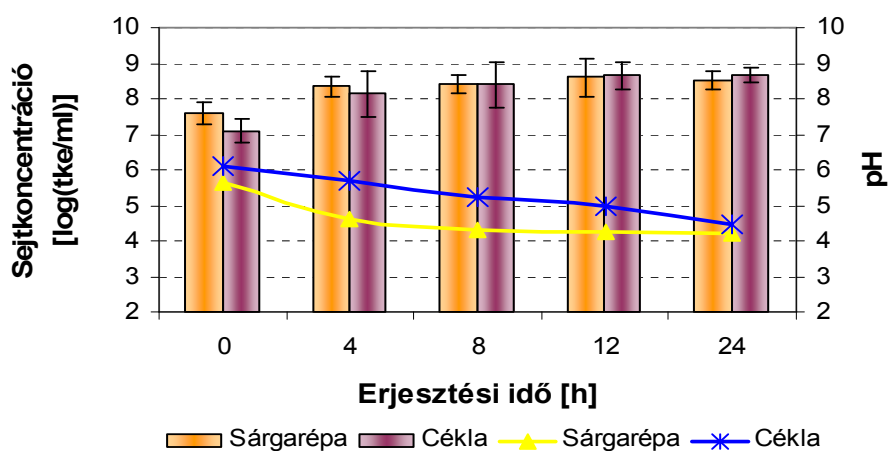
4.4.2.4 Léptéknövelési és tárolási kísérletek

Termékfejlesztési céljaim elérése érdekében léptéknövelési kísérleteket végeztem a sárgarépalé mellett a céklalében is. A céklalét azért vizsgáltam, hogy információt kapjak az e célra kiválasztott és élelmiszeripari célra engedélyezett *B. lactis* Bb-12 erjesztőképességére vonatkozóan egy másik zöldséglé modellben. Az erjesztett sárgarépalé tárolási kísérlete elsődlegesen a táplálkozás-élettani szempontból fontos probiotikum sejtszám változás vizsgálatára irányult.

Léptéknövelés

Mivel a lombikos vizsgálatok során kapott erjesztett sárgarépalében (24. órában) átlagosan 10^2 tke/ml nagyságrendben detektáltam mezofil összcsírát és ebből kifolyólag a zöldséglé (termék) mikrobiológiai szempontból kifogásolható volt, a léptéknövelés során a sűrítmenyből kiinduló technológiát részesítettem előnyben. A sűrítmenyek mikrobiológiailag stabilabbak, nagytételben előállíthatók, beszerezhetők és a hatékony csíramentesítési technológia egy-egy tételre meghatározható. A sűrítmenyek esetében a kiindulási csíraszámok 10^1 és 10^2 tke/ml voltak szemben a nyers répalevek 10^5 - 10^7 nagyságrendű mezofil összcsíra koncentrációjával. (A sárgarépa sűrítmeny: $2,5 \cdot 10^1$ tke/ml és a cékla: $9,9 \cdot 10^2$ tke/ml mezofil összcsíra számmal rendelkezett). Meghatároztam a sűrítmenyekből készült zöldséglevek optimális szárazanyag-tartalmát a szaporodóképesség szempontjából. Ez az optimális érték sárgarépalé esetén 8 (m/m)%, a céklalénél 10 (m/m)% szárazanyag-tartalom. A sűrítmenyből készült tápközegek megfelelő mikrobiológiai biztonságának eléréséhez az erjesztés előtt 80°C -on 10 percig történő hőkezelést végeztem. Ez az előkezelés a kisebb kiindulási mezofil összcsíra koncentrációnak köszönhetően elegendőnek bizonyult.

Figyelembe véve termék előállítási céljaim megvalósítását a léptéknövelési kísérleteket *B. lactis* Bb-12 törzzsel végeztem. Az erjesztés során mért jellemzők változásait az 22. ábrán tüntettem fel.



Oszlopok: sejtkoncentráció; Vonalak: pH érték

22. ábra A sárgarépa- és a céklalé sejtkoncentrációjának és pH értékének változása a *B. lactis* Bb-12 törzzsel történő, léptéknövelt erjesztés során

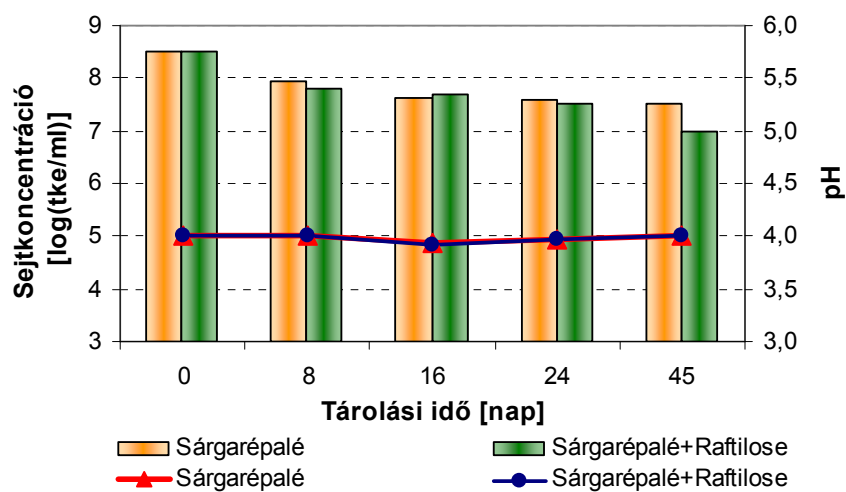
A sárgarépalé erjesztése során egy nagyságrendű sejtkoncentráció növekedést kaptam. A kezdeti 7,59 log(tke/ml) bifidobaktérium koncentráció a fermentáció 12. órájára elérte a maximális 8,59 log(tke/ml) értéket. A gyors erjedési folyamatot a pH 4,3-ra történő csökkenése is alátámasztja. Az erjesztés folyamán nem detektáltam mezofil összcsíraszámot, tehát mikrobiológiai szempontból biztonságos volt az erjesztett sárgarépalé. Az itt kapott sejtkoncentrációkat összehasonlítva a lombikos kísérlet sejt számaival megállapítható, hogy a *B. lactis* Bb-12 törzssel megvalósított erjesztés, léptéknövelés sikeres volt. Ebben a kísérletben nagyobb sejt számot detektáltam, ami köszönhető a kevertetésnek, illetve a kevert gázzal (10% CO₂-nitrogénben) történő átáramoltatásnak. A kísérletek során a tejsav koncentráció 5 és 6 mg/ml, az ecetsav koncentráció pedig 1 és 2 mg/ml között változott.

A *B. lactis* Bb-12 a céklalében is jó szaporodóképességet mutatott. Ebben a zöldséglében szintén a 12. órában detektáltam a maximális sejtkoncentrációt (8,67 log(tke/ml)). A pH kisebb mértékű, fokozatos csökkenését figyelhetjük meg, amely valószínűleg a keletkező kisebb tejsav és ecetsav koncentrációnak tulajdonítható, hiszen az erjesztés végére 2-3 mg/ml tejsav és 0,5-1 mg/ml ecetsav képződött. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a céklalé is alkalmas lehet probiotikus fermentált termék előállítására.

Tárolási vizsgálat

A tárolási kísérlet során arra kerestem a választ, hogy a *B. lactis* Bb-12 törzs életképessége milyen mértékben csökken 4°C hőmérsékleten. A Magyar Élelmiszerkönyv erjesztett probiotikus termékekre vonatkozó előírása ugyanis kimondja, hogy a probiotikus terméknek a minőség megőrzési idő végén is legalább 10⁶ tke/ml élőcsíraszámot kell tartalmaznia. Továbbá vizsgáltam, hogy prebiotikus kiegészítéssel esetleg növelhető-e a bifidobaktérium életképessége a tárolás alatt. A prebiotikumok közül a Raftilose-t alkalmaztam, amelyet a korábbi vizsgálatok során a *B. lactis* Bb-12 törzs jól hasznosított.

Az erjesztett sárgarépalében a tárolás alatt történő sejtkoncentráció és pH változásokat a 23. ábrán mutatom be.



Oszlopok: sejtkoncentráció; Vonalak: pH érték

23. ábra A *B. lactis* Bb-12 törzssel erjesztett, valamint erjesztett és prebiotikummal kiegészített sárgarépalé bifidobaktérium koncentrációjának és pH-jának változása

A *B. lactis* Bb-12 törzs sejtkoncentrációja a tárolási idő 8. napjára a kezdeti $3,23 \cdot 10^8$ tke/ml sejtkoncentrációról $\sim 7,90 \cdot 10^7$ tke/ml sejtsűrűsége csökkent mind a normál, mind a prebiotikumot tartalmazó sárgarépalé esetében. Ezt követően a sejtszám lassú ütemben csökkent tovább a 10^7 nagyságrendű tartományon belül. A 45. napon a *B. lactis* Bb-12 sejtkoncentrációja a normál sárgarépalében $3,16 \cdot 10^7$ tke/ml, a prebiotikummal kiegészítettben pedig $1 \cdot 10^7$ tke/ml volt. A tárolás során jelentősebb pH változást nem tapasztaltam egyik minta esetében sem.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a bifidobaktériumok megőrizték életképességüket a sárgarépalében 45 napos tárolás alatt és a tárolás végén 10^7 tke/ml sejtsűrűséget mutattak. A prebiotikus kiegészítés nem javította a *B. lactis* Bb-12 életképességét. Az így előállított probiotikus erjesztett sárgarépalé a tárolást követően is eleget tett a Magyar Élelmiszerkönyv előírásának. Ezen vizsgálatok mellett szükséges lenne megvizsgálni zöldséglevék érzékszervi jellemzőit is, amely révén prognosztizálható a termék fogyasztói elfogadottsága.

4.4.3 Erjesztési vizsgálatok csicsóka tápközegben

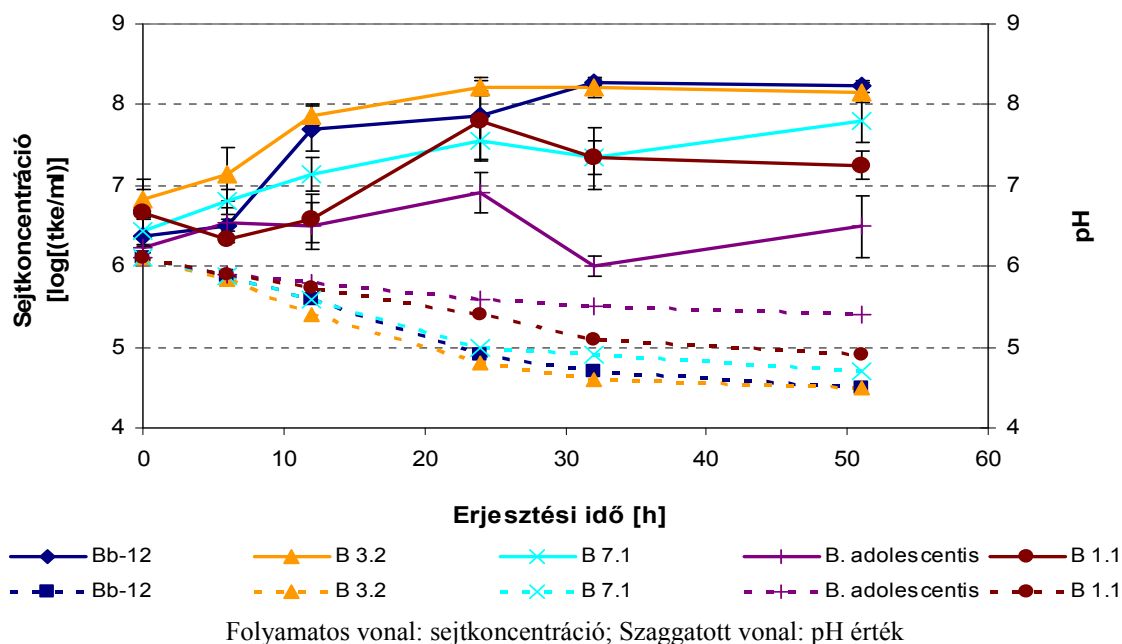
A csicsóka megfelelő nyersanyag lehet a probiotikus, illetve szinbiotikus termékek előállítására, mivel számottevő az inulin típusú fruktán tartalma, ami a bifidobaktériumok jelentős hányadának szelektív növekedési szubsztrátumaként szolgál. Ennek tükrében fogalmaztam meg a csicsóka alapanyagon történő vizsgálataim céljait. Első lépésként feltérképeztem a különböző bifidobaktériumok szaporodási tulajdonságait az adott tápközegen, valamint megvizsgáltam a szárazanyag-tartalom hatását a kiválasztott bifidobaktérium sejthozamára és meghatároztam a csicsókalé a sejthozamra vonatkozó optimális szárazanyag-tartalmát. Ezt követően mono és vegyes kultúras erjesztésekben vizsgáltam az alkalmazott törzsek szaporodóképességét, illetve a bifidobaktériumok és tejsavbaktériumok kölcsönhatását. Végül tanulmányoztam a termékfejlesztés lehetőségét szinbiotikus termék kialakítására.

4.4.3.1 Bifidobaktériumok szaporodóképessége csicsóka tápközegen

A kísérletben a tanszék munkatársai által izolált, humán forrásból származó törzsek (*B. bifidum* B7.1, *B. bifidum* B 3.2, *B. angulatum* B1.1), egy típustörzs (*B. adolescentis*^T), és egy starterkultúra (*B. lactis* Bb-12) szaporodását vizsgáltam a 10 (m/m)% szárazanyag-tartalmú csicsókalében.

A megvizsgált öt törzs közül, amelyek sejtkoncentrációjának alakulását a 24. ábrán szemléltetem, a leggyengébb sejtszaporulatot a *B. adolescentis* típustörzs mutatta csicsóka tápközegen, pedig a korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy jól hasznosítja mind a Raftiline-t, mind a Raftilose-t, amelyek különböző polimerizációs fokkal rendelkező fruktánok. A *B. lactis* Bb-12 és a *B. bifidum* B 3.2 törzsek az erjesztés végére két nagyságrendű, a *B. bifidum* B7.1 kultúra egy nagyságrendű és a *B. angulatum* B1.1 elnyúlt lag fázis (12 óras) után szintén egy nagyságrendű sejtkoncentráció növekedést mutattak. A legjobb szaporodó képességet a *B. lactis* Bb-12 törzsnél detektáltam, amelynek fajlagos szaporodási sebessége $0,11 \text{ óra}^{-1}$ volt. Ezen törzs esetén a sárgarépa- és a céklalében is hasonló nagyságrendű fajlagos szaporodási sebességet kaptam. A közel azonos növekedést mutató *B. bifidum* B3.2 törzs fajlagos szaporodási sebessége pedig $0,088 \text{ óra}^{-1}$ értéknek adódott. A pH alakulása is jól tükrözi a törzsek közötti különbségeket. Ezen

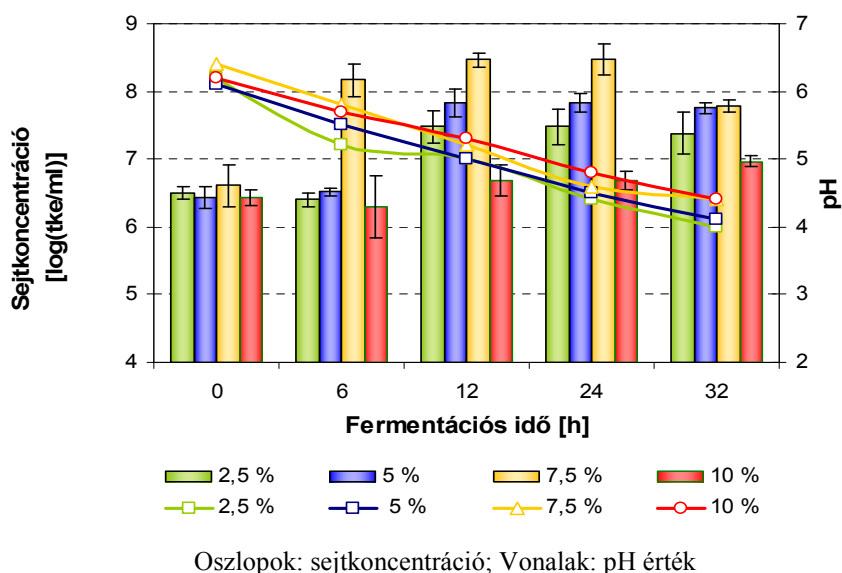
eredmények alapján és a távlati célként megjelölt termékfejlesztést fegyelembé véve a *B. lactis* Bb-12 törzsszel folytattam a kísérleteket.



24. ábra *Bifidobacterium* törzsek szaporodó képessége a 10 (m/m)%-os csicsóka tápközegen

4.4.3.2 Csicsóka tápközeg optimális szárazanyag-tartalma

A kísérletem célja a csicsóka tápközeg szárazanyag-tartalmának optimalizálása volt, ennek érdekében a *B. lactis* Bb-12 szaporodását különböző szárazanyag-tartalmú (2,5; 5; 7,5; 10 (m/m)%) tápközegekben vizsgáltam. A szaporodási eredményeket és a pH értékek változását a 25. ábrán szemléltetem.



25. ábra *B. lactis* Bb-12 szaporodásának vizsgálata különböző szárazanyag-tartalmú csicsókalevelekben

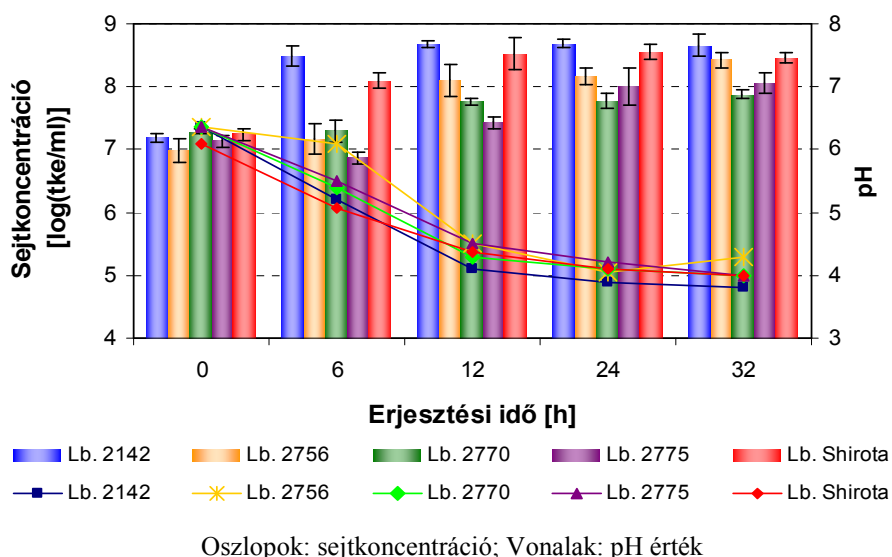
A 25. ábrán jól látható, hogy a *B. lactis* Bb-12 törzs a 7,5 (m/m)% szárazanyag-tartalmú csicsóka tápközegen szignifikánsan nagyobb baktériumszámot ért el a fermentáció első 24 órájában, mint

a többi szárazanyag-tartalomnál. A *B. lactis* Bb-12 kultúra már a 6. óránál két nagyságrendű növekedést mutatott és a 12. órában elérte a legnagyobb sejtszámot ($6,88 \cdot 10^8$ tke/ml). Ez a sejtsűrűség a 24. óráig fenn maradt, majd a csökkenő pH miatt a 32. órára lecsökkent. A 2,5 és 5 (m/m)% szárazanyag-tartalmú csicsókalé esetén a *B. lactis* Bb-12 törzs lassú, elnyúló, míg 10 (m/m)% szárazanyag-tartalom esetében csekély növekedését tapasztaltam. A pH értékek mindegyik esetben hasonlóan alakultak, 4-5 körülire csökkentek, ami már megfelelő lehet az élelmiszerbiztonsági és tárolási követelményeknek is. Az elért eredményeim alapján a további kísérleteimet 7,5 (m/m)% csicsóka tartalmú tápközegben végeztem.

4.4.3.3 Különböző tejsavbaktérium törzsek szaporodásának vizsgálata csicsókalében

A *B. lactis* Bb-12 törzs esetében legjobb eredményeket adó 7,5 (m/m)% szárazanyag-tartalmú csicsókalében vizsgáltam meg a négy nem-starter *Lactobacillus* törzs (*Lb. plantarum* (Lb. 2142), *Lb. casei subsp. casei* (Lb. 2756), *Lb. curvatus* (Lb. 2770) és *Lb. curvatus* (Lb. 2775)) valamint egy starter *Lactobacillus* kultúra (*Lb. casei* Shirota) szaporodóképességét, mivel e törzseket kívántam alkalmazni *B. lactis* Bb-12 törzsszel párosítva a vegyes kultúras erjesztésekben. Az Lb. 2142, Lb. 2756, Lb. 2770 és Lb. 2775 törzsek probiotikus tulajdonságokkal és jó erjesztő képességgel rendelkeznek [BARÁTH *et al.*, 2004; ZALÁN *et al.*, 2005]. A *Lb. casei* Shirota törzs a tejiparban már hosszú ideje alkalmazott kultúra, amelyet humán bélrendszerből izoláltak még 1935-ben. Kiváló savtoleranciával rendelkezik, kiemelkedő a B vitamin termelése és jelentős gátló aktivitást fejt ki a különböző daganatos megbetegedések és a különféle kórokozók, mint például a *Pseudomonas aeruginosa*-val és a *L. monocytogenes*-szel szemben [HORI *et al.*, 2001].

A törzsek szaporodását és az anyagcsere termelésük révén létrejött pH változást a 26. ábrán mutatom be.



26. ábra Különböző tejsavbaktérium törzsek szaporodásának vizsgálata 7,5 (m/m) % szárazanyag-tartalmú csicsókalében

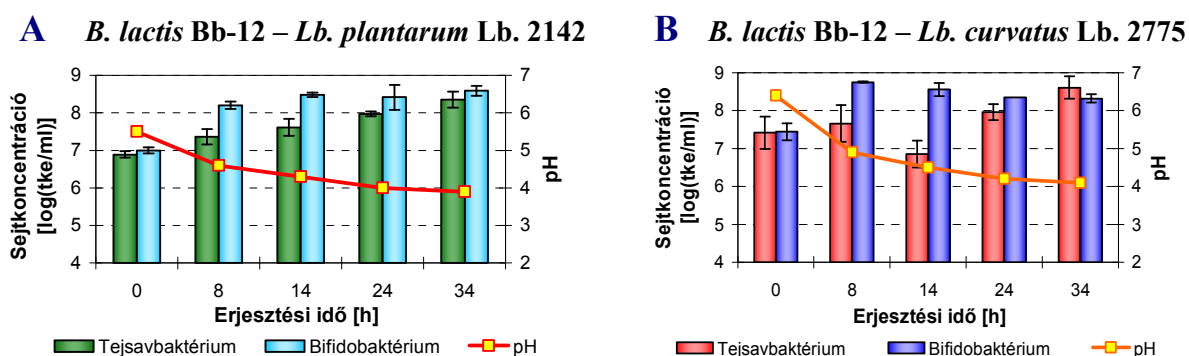
Az eredmények alapján a törzsek közül az Lb. 2142, Lb. 2756 és a *Lb. casei* Shirota törzset emelhetjük ki, amelyek már az erjesztés 6. illetve 12. órájában 10^8 tke/ml nagyságrendű

sejtkoncentrációt mutattak és megőrizték életképességüket az erjesztés végéig. Külön ki kell emelnem az Lb. 2142 törzset, amelynek intenzív szaporodását a tenyészlé gyors savanyodása is igazolja, ugyanis e törzs esetében detektáltam a legkisebb pH értéket (pH=3,8) az erjesztés végén. BARÁTH és munkatársai (2004) vizsgálataiban is jó szaporodást mutatott ez a törzs, ahol növekedési szubsztrátumként céklalevet használtak. Az Lb. 2770 és Lb. 2775 törzsek esetén nagyon lassú szaporodást figyeltem meg, ugyanis az Lb. 2775 törzs csak a 24.-32. órában érte el a 10^8 tke/ml sejtszámot, az Lb. 2770 törzs pedig el sem érte ezt a sejtszámot a 32 órás erjesztés alatt. Valószínűleg e törzsek számára az általam alkalmazott csicsókalé nem nyújtott megfelelő tápanyagforrást a szaporodásukhoz. A pH értékek az erjesztés végén 3,8 és 4,2 közötti értékeket mutattak, ami nem feltételez az anyagcsere tevékenységben olyan különbséget, mint amit a sejtszámok alapján megállapítottam.

4.4.3.4 Vegyes kultúras erjesztések

A vegyes kultúras erjesztések során a *B. lactis* Bb-12 törzssel mindegyik csicsóka tápközegben vizsgált *Lactobacillus* törzset társítottam függetlenül attól, hogy ott milyen szaporodó képességet mutattak. Ugyanis számos publikációban olvashatunk arról, hogy a vegyes kultúra tagjai támogatják egymás növekedését, és más tulajdonságokat mutatnak, mint monokultúras tenyésztések során [OUWEHAND *et al.*, 1999; HELLAND *et al.*, 2004]. Az erjesztéseket a baktériumok egy-egy arányú keverékével indítottam és 32-34 órás erjesztés folyamán követtem az élő sejtszámok és a pH alakulását.

A vegyes kultúras eredményeket a 27. A. és B. ábrán, valamint a 28. A., B. és C. ábrán mutatom be. Az előbb említett ábrák a kedvezőtlen, a termékfejlesztés szempontjából nem megfelelő párosításokat, míg az utóbbiak az ígéretesebb, sikereesebb párosításokat tartalmazzák.



27. ábra Vegyes kultúras erjesztések sejtszámának és pH értékének változása csicsókalében

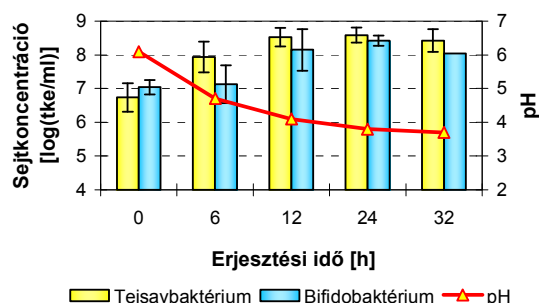
A *B. lactis* Bb-12 törzs és a monokultúras szaporításnál legjobbnak talált *Lb. plantarum* Lb. 2142 törzs együttes erjesztése során a bifidobaktérium jobb szaporodóképességet mutatott, mint a tejsavbaktérium (27. A. ábra). A bifidobaktérium esetén már az erjesztés 8. órájában 10^8 tke/ml nagyságrendű sejtkoncentrációt detektáltam, amely az erjesztés végéig fokozatosan nőtt. Ezzel szemben a Lb. 2142 kultúra csak a 24. órában érte el ezt a sejtkoncentrációt, pedig közel azonos volt a kiindulási koncentrációja a bifidobaktérium sejtszámával. Az eredmények alapján

megállapítható, hogy elsősorban a bifidobaktérium számára volt kedvező ez a párosítás. Valószínűleg a *Lactobacillus* törzs, olyan anyagcsere termékeket (aminosavak, vitaminok) szintetizált, amely támogatta a bifidobaktérium növekedését.

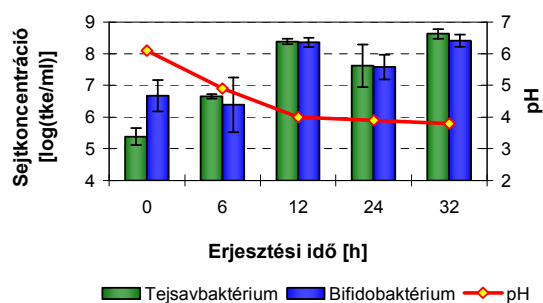
A *B. lactis* Bb-12 és a *Lb. curvatus* Lb. 2775 törzsek társításával végzett fermentáció során egyik törzs eredményei sem meggyőzőek (27. B. ábra). Az erjesztés első felében a bifidobaktériumok túlsúlyát figyeltem meg, amely a 8. órára már közel 10^9 tke/ml koncentrációt mutatott. Majd az ezt követő időpontokban fokozatosan csökkenő élő sejtszámot mértem. A tejsavbaktériumok szaporodása lassabban indult meg, majd fokozatosan növekedett a sejtszám. Az erjesztés végére pedig már e törzs mutatott nagyobb sejtkoncentrációt. Ezek alapján azt a következtetést lehet levonni, hogy ez a párosítás egyik mikroba számára sem volt megfelelő, ugyanis miközben az egyik törzs szaporodott a másik élősejtszáma csökkent.

A *B. lactis* Bb-12 és a *Lb. curvatus* Lb. 2770 törzsek együtt tenyésztése során a tejsavbaktérium gyorsabban szaporodott, mint a bifidobaktérium, de már az erjesztés 12. órájában mindkét törzs élősejt koncentrációja meghaladta a 10^8 tke/ml sejtszámot és a 24. órában közel azonos sejtkoncentrációt mutattak a törzsek (28. A. ábra). Az erjesztés során a pH gyorsan csökkent, és a 12. óránál már 4,1-es, az erjesztés végén pedig 3,8-as értéket mértem. E párosítás esetén tapasztaltam először ilyen mértékű pH csökkenést, amely élelmiszerbiztonsági szempontból kedvező. Az adatok alapján megállapítható, hogy a *Lb. 2770* törzs sokkal jobb szaporodóképességet mutatott, mint a monokultúras erjesztés során.

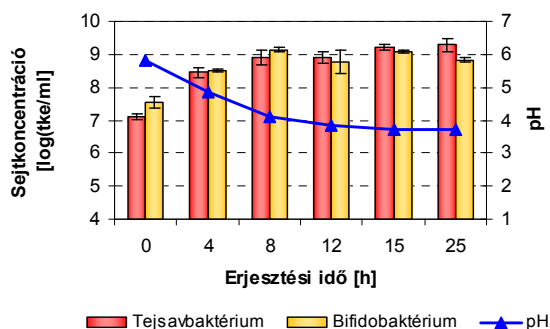
A *B. lactis* Bb-12 – *Lb. curvatus* Lb. 2770



B *B. lactis* Bb-12 – *Lb. casei* Lb. 2756



C *B. lactis* Bb-12 – *Lb. casei* Shirota



28. ábra: Vegyes kultúras erjesztések sejtszámának és pH értékének változása csicsókalében

A *B. lactis* Bb-12 és *Lb. casei* Lb. 2756 törzsek vegyes kultúras szaporításánál a törzsek sejtkoncentrációi teljesen párhuzamosan növekedtek és azonos szaporodási görbéket adtak (28. B. ábra). Az erjedés kezdetén a bifidobaktérium sejtkoncentráció magasabb volt, de ez a különbség a 6. órára eltűnt. Kiemelendő, hogy a szaporodás az erjesztés 12. órájára már befejeződött és mindkét törzs élősejt koncentrációja meghaladta a 10^8 értéket és a baktériumok megtartották életképességüket a 32 órás inkubálás során. A pH az előző kevert kultúras erjesztéshez hasonlóan a 12. órára szintén 4,0 közeli értékre csökkent. Ez a párosítás az eredmények tekintetében már javasolható probiotikus termék előállításához.

A legkedvezőbb párosítást a *B. lactis* Bb-12 és a *Lb. casei* Shirota törzsek alkották. Mind a Bb-12, mind a *Lb. casei* Shirota törzs jó növekedési tulajdonságot mutatott és párhuzamosan egymás mellett szaporodtak (28. C. ábra). A törzsek kiváló szaporodását jelzi, hogy mindkettő törzs elérte a 10^9 tke/ml sejtkoncentrációt az erjesztés 8. – 15. órájában. A gyors erjesztési folyamatnak köszönhetően a pH a 12. órában már 4,0 alatti, az erjesztés végére 3,7 értéket mutatott. Az eredmények alapján megállapítható, hogy ez a két törzs sikeresen társítható és bevonható erjesztett probiotikus termék előállításába.

4.4.4 A Bb-12 és Shirota törzs szaporodóképessége mono és vegyes kultúras erjesztésekben

Annak érdekében, hogy egyértelműen meg tudjuk állapítani, milyen kölcsönhatás van a *B. lactis* Bb-12 és a *Lb. casei* Shirota között monokultúras és újabb vegyes kultúras erjesztéseket végeztem csicsókalében. Ezt követően pedig a vegyes kultúra szaporodóképességét egy másik zöldséglé modellben – 10 (m/m)%-os céklalében – is teszteltem és arra kerestem a választ, milyen erjesztőképességet nyújt a *B. lactis* Bb-12 és *Lb. casei* Shirota vegyes kultúra egy más összetételű tápközegben.

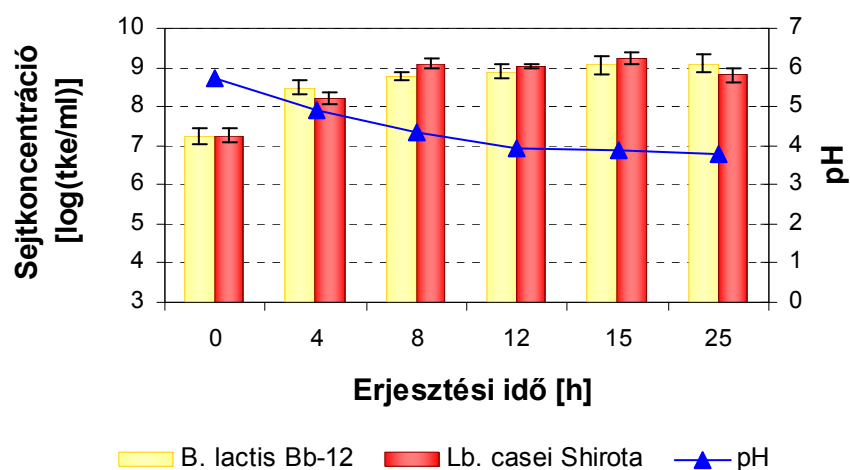
A mono és vegyes kultúras erjesztések során kapott *B. lactis* Bb-12 és *Lb. casei* Shirota sejtszámokat a 24. táblázatban tüntettem fel.

A 24. táblázatban szereplő adatok alapján egyértelműen megállapítható, hogy mindkét törzs magasabb sejtsűrűséget ért el a vegyes kultúras erjesztés során, mint a monokultúras erjesztésnél. Míg a *B. lactis* Bb-12 monokultúras erjesztés 8. órájában a bifidobaktérium koncentráció 10^7 nagyságrendű volt, addig vegyes kultúras erjesztésnél már 10^9 nagyságrendű sejtkoncentrációt detektáltam ebben az időpontban. Ebből arra lehet következtetni, hogy a *B. lactis* Bb-12 erjesztőképességére stimuláló hatású volt a *Lb. casei* Shirota törzs. Valószínűleg a *Lb. casei* Shirota törzs olyan köztes termékeket illetve anyagcsere termékeket hoz létre, amelyet a bifidobaktérium törzs hasznosít és ezáltal jobb szaporodási képességet mutat. Ugyanakkor ez fordítva is igaz lehet, mivel a *Lb. casei* Shirota törzs is nagyobb erjesztőképességet mutat *B. lactis* Bb-12 törzs jelenlétében. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy kommenzalista kölcsönhatás van a két törzs között. HELLAND és munkatársai (2004) vizsgálataik során szintén feltárták egymás szaporodását támogató kapcsolatot például a *Lb. acidophilus* La-5 és a *B. lactis* Bb-12 törzsek között. Korábbi szerzőkre is hivatkozva szimbiotikus kölcsönhatásnak értékelték ezt a kapcsolatot.

24. táblázat *B. lactis* Bb-12 és a *Lb. casei* Shirota törzsek sejt koncentrációjának alakulása csicsókalében történő mono és vegyes kultúrák erjesztéseiben.

Erjesztési idő [h]	Sejt koncentrációk [tke/ml]			
	Monokultúrák erjesztés		Vegyes kultúrák erjesztés	
	<i>B. lactis</i> Bb-12	<i>Lb. casei</i> Shirota	<i>B. lactis</i> Bb-12	<i>Lb. casei</i> Shirota
0	$1,81 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$	$3,23 \cdot 10^7$	$1,30 \cdot 10^7$
4	$1,72 \cdot 10^7$	$6,43 \cdot 10^7$	$3,37 \cdot 10^8$	$2,97 \cdot 10^8$
8	$5,05 \cdot 10^7$	$2,65 \cdot 10^8$	$1,41 \cdot 10^9$	$9,06 \cdot 10^8$
12	$9,40 \cdot 10^7$	$1,25 \cdot 10^8$	$9,25 \cdot 10^8$	$8,58 \cdot 10^8$
15	$1,31 \cdot 10^8$	$1,53 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^9$	$1,69 \cdot 10^9$
25	$7,98 \cdot 10^7$	$3,46 \cdot 10^8$	$6,80 \cdot 10^8$	$2,12 \cdot 10^9$

A kapott kedvező eredmények tükrében a következő vizsgálatom arra irányult, hogy információt szerezzek arra vonatkozóan, hogy milyen szaporodóképességet mutat a *B. lactis* Bb-12 és *Lb. casei* Shirota vegyes kultúra a céklalében, amely más tápanyag összetétellel rendelkezik, mint a csicsókalé. A céklalében történő vegyes kultúrák erjesztés során mért változásokat a 29. ábrán ábrázoltam.

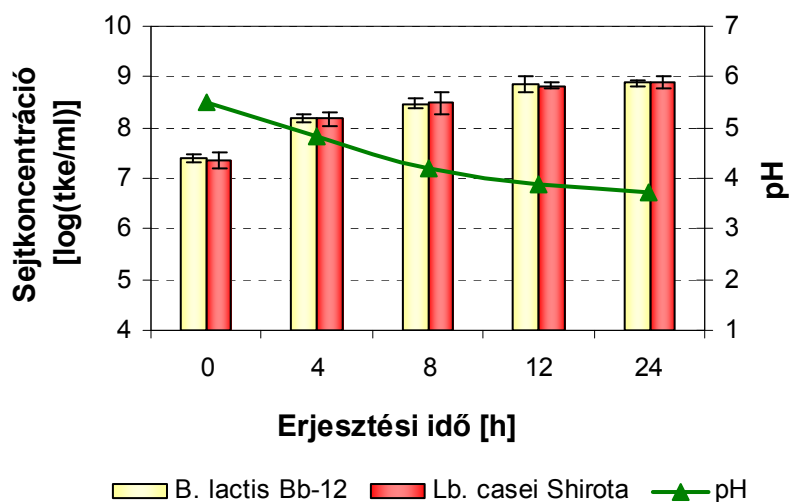


29. ábra A sejt koncentráció és a pH alakulása *B. lactis* Bb-12 és *Lb. casei* Shirota vegyes kultúrával erjesztett céklalében

A sejt koncentráció értékek alapján megállapítható, hogy a törzsek vegyes kultúráként hasonló szaporodóképességet mutattak a céklalében, mint a korábban vizsgált csicsókalében. A céklalében is mind a bifidobaktérium, mind a laktobacillus kultúra esetén két nagyságrendű sejt koncentráció növekedést detektáltam. A bifidobaktérium és a Shirota törzs is a maximális sejt koncentrációját ($1,27 \cdot 10^9$ tke/ml és $1,71 \cdot 10^9$ tke/ml) az erjesztés 15. órájában érte el. A pH változás is alátámasztja az erjedés gyors lefolyását, mivel már 12 órás fermentáció után pH=4 alatti értéket mértem, amely már megfelel az élelmiszerbiztonsági követelményeknek. Az eredményeim előrevetítik a *B. lactis* és *Lb. casei* vegyes kultúra sikeres alkalmazási lehetőségeit egyéb zöldséglevékben vagy zöldségalapú termékekben.

4.4.4.1 Vegyes kultúras erjesztési technológia léptéknövelése

A termékfejlesztési célokat szem előtt tartva, a léptéknövelési kísérleteimben a *B. lactis* Bb-12 és *Lb. casei* Shirota vegyes kultúrát és optimált szárazanyag-tartalmú csicsókalevet alkalmaztam. Az erjesztés követése pH méréssel és az élő baktériumszám fajonkénti meghatározásával történt, amelynek az eredményei a 30. ábrán láthatóak.



30. ábra A *B. lactis* Bb-12 és *L. casei* Shirota vegyes kultúrával erjesztett csicsókale sejtkoncentrációjának és pH értékének változása a léptéknövelés során

Az induló átlagos sejtkoncentráció a Bb-12 törzs esetében $2,54 \cdot 10^7$ tke/ml volt, míg a Shirota törzsnél $2,21 \cdot 10^7$ tke/ml volt. A kisebb térfogatban végzett kísérletekhez hasonlóan már a 12. órában megközelítette mindkét törzs sejtkoncentrációja a 10^9 tke/ml nagyságrendet. A Bb-12 törzs esetében $7,61 \cdot 10^8$ tke/ml maximális sejtkoncentrációt, míg a Shirota törzsnél $7,96 \cdot 10^8$ tke/ml maximális sejtszámot detektáltam. A két törzs kiváló szaporodóképességének és savtermelésének köszönhetően a csicsókale kezdeti pH=5,54 értéke jelentősen lecsökkent – pH=3,72 – a fermentáció 24. órájára. A sárgarépa- és a céklaléhez képest kisebb mértékű tejsav és ecetsav termelődést tapasztaltam az erjesztési folyamat során. Az erjedés végén 1,45 mg/ml tejsavat és 0,15 mg/ml ecetsavat detektáltam. A törzsek anyagcsere-tevékenységét jól jellemzi a csicsóka szénhidrát tartalmának változása, amelyet a 25. táblázatban tüntetek fel.

25. táblázat A szénhidrát koncentráció változása csicsókaleben történő vegyes kultúras erjesztés során

Erjesztési idő [h]	Szénhidrátok koncentrációja [µg/µl]			
	DP4 vagy annál nagyobb	DP3	DP2	Fruktóz
0	3,62	1,63	2,08	0,08
4	3,25	1,93	2,02	0,64
8	2,15	0,98	1,08	1,04
12	1,84	0,54	0,21	1,51
24	1,56	0,39	0	1,74

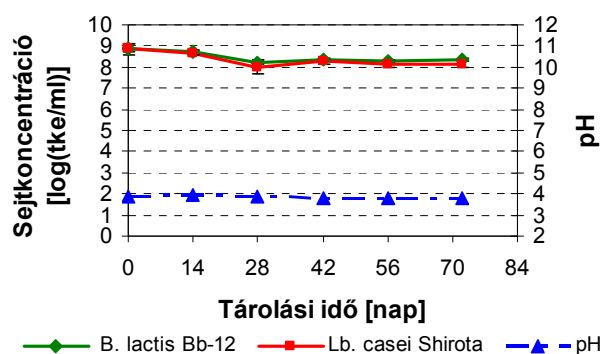
A 25. táblázatban szereplő adatok jól mutatják, hogy az erjesztés végére a négy vagy annál nagyobb polimerizáltságú szénhidrátok koncentrációja körülbelül a felére, míg a három szénatomszámú szénhidrátok koncentrációja negyedére csökkent. A két szénatomszámú szénhidrátok az erjesztés végére fokozatosan lebontódtak és elfogytak a tápközegből. A szénhidrátok kisebb egységekre történő hidrolízisét jól jellemzi az erjesztés végére fokozatosan növekvő fruktóz koncentráció is, amelyet valószínűleg nem vagy nagyon kis mennyiségben használtak fel a törzsek. A jelentős mennyiségű maradék szénhidrát-tartalom arra utal, hogy a növekedési szubsztrátum elegendő mennyiségben tartalmazza növekedéshez szükséges szénforrást. Továbbá levonható az a következtetés is, hogy a négy, illetve a négynél nagyobb polimerizációs fokkal rendelkező prebiotikus szénhidrátok jelenléte miatt a termék szinbiotikumnak tekinthető. A termékben lévő prebiotikum egyfelől védelmet nyújthat, másfelől tápanyagként szolgálhat a benne lévő probiotikumok számára tárolás és az emésztőrendszeren történő áthaladás során. Továbbá szelektíven támogathatja a bélmikrobiótában lévő jótékony baktériumok szaporodását és aktivitását.

Eredményeim alapján megállapítható, hogy léptéknövelési kísérleteim sikeresek voltak és sikerült létrehozni, illetve kialakítani olyan starterkultúrát, amelynek élelmiszeripari szinten is lehet létjogosultsága.

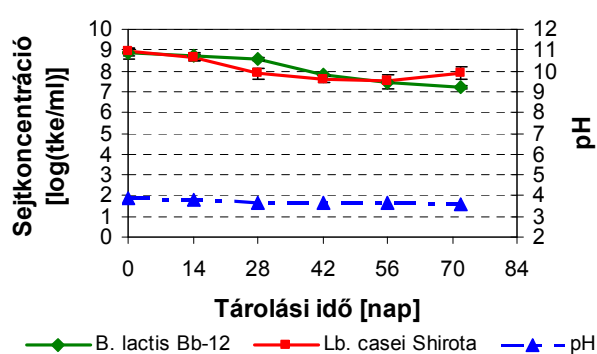
4.4.4.2 Az erjesztett termék formulázása és a tárolás során tapasztalt főbb változások

Az erjesztett csicsókalé tárolási vizsgálatát is elvégeztem. Mivel a céljaim között egy zselé típusú termék kialakítása szerepelt, ezért az erjesztést követően a termék állományának kialakítására, a vízakaktivitás csökkentésére nátrium-alginátot, alma- és citruspektint alkalmaztam 1%-os mennyiségben. Kísérleteim a sűrítőanyag oldhatóságára, gélképzési tulajdonságaira és a besűrített termék ízére irányultak. Ezek alapján a termék formulázásához a nátrium-alginátot találtam a legmegfelelőbbnek. Ezt követően a mintákat 4°C-on és szobahőmérsékleten is 72 napig tároltam (31. ábra). A tárolás kezdetén a *B. lactis* Bb-12 törzs sejtkoncentrációja $6,99 \cdot 10^8$ tke/ml, a *Lb. casei* Shirota törzsé pedig $8,26 \cdot 10^8$ tke/ml értéket mutatott.

Tárolás: 4°C-on



Tárolás: szobahőmérsékleten



31. ábra Az erjesztett csicsókalé tárolása során bekövetkező sejtszám és pH változások

A 4°C-on történő tárolás során mind a Bb-12, mind a Shirota sejtkoncentrációja közel azonos mértékben, 10^8 tke/ml nagyságrenden belül ($2,24 \cdot 10^8$ tke/ml és $1,31 \cdot 10^8$ tke/ml) maradt a 72 napos tárolás alatt. A pH érték csekély változást (3,90→3,76) mutatott. Szobahőmérsékleten mindkét starterkultúra esetében egy nagyságrendű sejtkoncentráció csökkenést tapasztaltam, a Bb-12 törzsnél a 42. napon ($6,12 \cdot 10^7$ tke/ml), a Shirota kultúránál 28. napon ($7,3 \cdot 10^7$ tke/ml) detektáltam a 10^7 nagyságrendű sejtszámot, ami a tárolás végéig fennmaradt. A pH -nál nagyobb mértékű csökkenést (3,90→3,57) figyeltem meg, mint 4°C-on, amely további erjesztési aktivitásra utalhat a tárolt mintában. Ezt a szénhidrát tartalom változása is alátámasztja, ugyanis a triszacharidok elfogytak a 20°C-on tárolt mintákból.

Az eredmények bizonyítják, hogy a 4°C-os tárolási hőmérséklet kedvezőbb a baktériumok életképessége szempontjából. Továbbá megállapítható, hogy a kapott eredmények (20°C-on is) megfelelnek a hatályos Magyar Élelmiszertörvény előírásainak és biztatóak a termékfejlesztés szempontjából.

5 ÖSSZEFOGLALÁS

A XX. század végén a táplálkozástudományban új fogalom, a funkcionális élelmiszer elnevezés jelent meg, amely élelmiszereknek a tápértékük mellett szerepük van az egészség megőrzésében. A funkcionális élelmiszerekkel kapcsolatos kutatások egyik dinamikusan fejlődő területe a probiotikus élelmiszerek tervezése és a probiotikumok fiziológiai hatásainak kimutatása, valamint a hatásmechanizmusukra vonatkozó tudományos bizonyítékok feltárása. A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyek elsődlegesen a vastagbélben fejtik ki hatásukat, ahol mintegy 50 baktérium nemzetség, több mint 500 faja él. A probiotikumok túlnyomó többsége a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségből kerülnek ki. Az eddigi nemzetközi és hazai vizsgálatok adatait tekintve a probiotikumoknak számos kedvező élettani funkciójuk van: fermentálják az élelmi rostokat; serkentik a vastagbél hámsejtjeinek növekedését és a bélperisztaltikát; enyhítik bizonyos típusú hasmenéses megbetegedések tüneteit; elősegítik az ásványi anyagok felszívódását; bontják a tejcukrot és lebontják az antigének egy részét, illetve módosítják az immunválaszt és ezzel az étel-allergiák kialakulásának esélyét is csökkentik; megkötik és/vagy bontják a karcinogén vegyületeket. A probiotikus baktériumoknak azonban számos követelménynek kell megfelelniük, mint például legyenek biztonságosak, álljanak ellen a technológiai folyamatok során fellépő stresszhatásoknak és maradjanak életben az élelmiszer fogyaszthatóságának végéig, legyenek sav- és epetűrők és őrizzék meg életképességüket a gyomor-bélrendszeren való áthaladás során, valamint tapadjanak a bélhámsejtekhez és ott szaporodva erősítsék az egyén immunrendszerét. A probiotikus baktériumokat tartalmazó élelmiszerek kínálata folyamatosan növekszik, viszont ezen élelmiszerek 80 %-át fermentált tejtermékek teszik ki. Probiotikus termékek skálájának bővítésével, új típusú zöldségalapú termékekkel, a társadalom azon rétegei számára is elérhetővé válnának a probiotikumok, akik tejfehérje allergiában, illetve laktóz intoleranciában szenvednek vagy meggyőződésük miatt nem, illetve csak korlátozott mértékben fogyasztanak tejtermékeket. Ezen érvek figyelembe vételével termékfejlesztési célkitűzésem megvalósításához törzs szelekciós kísérleteket végeztem. Ennek keretében meghatároztam a szelektált bifidobaktérium törzsek fiziológiai tulajdonságait, antimikrobás hatásukat, valamint a törzsek bélhámsejtekhez történő tapadását. Továbbá a termékfejlesztés keretében megvizsgáltam a törzsek erjesztő, illetve szaporodó képességét különböző zöldséglevelekben, az előkezelési technológiák alkalmazhatóságát és fermentációs technológia kidolgozásának lehetőségét mono és vegyes kultúras erjesztések során. Végül célom volt a léptéknövelés és a tárolási vizsgálatok megvalósítása.

Elsődleges szelekciós kritériumként a probiotikus bifidobaktériumok vancomycin rezisztenciáját térképeztem fel. Vizsgálataim alapján az összes tesztelt törzs érzékenynek bizonyult a vancomycinnel szemben. Az agar-diffúziós módszer alkalmazásával 18 és 44 mm közötti feltisztulási zónákat, a határhígításos módszernél 0,75-3,0 µg/ml közötti minimális gátló koncentrációkat (MIC) detektáltam.

Mivel a bifidobaktériumok kataláz negatívak, ezért fontos információt szerezni a hidrogén-peroxid toleranciájukra vonatkozóan, amely vegyes kultúrák alkalmazásánál merülhet fel, mint

szelekciós kritérium. A legellenállóbbak a *B. lactis* Bb-12 és *B. bifidum* B7.1 jelzésű törzsek voltak, amelyeknél TPY táplevesben határhígítási módszerrel a MIC értéke 200 µg/ml-nek adódott. A legnagyobb érzékenységet a *Bifidobacterium longum* B2.2 törzs mutatta, amelynél MIC értéként 100 µg/ml koncentrációt határoztam meg. Ezen eredmények ígéretesek a tejsavbaktériumokkal és a bifidobaktériumokkal történő vegyes kultúras erjesztések szempontjából.

Megvizsgáltam a bifidobaktérium törzsek oxigén toleranciáját, amely fontos tényezőként jelentkezik a fermentációs technológia kidolgozása, illetve léptéknövelése során. A késő logaritmikus szaporodási szakaszban lévő törzsek közül 24 órás aerob hatásnak kitett sejtek száma a *B. breve*^T, *B. lactis* Bb-12, *B. dentium* B2.1, *B. bifidum* B7.1, *B. longum* A4.4, A4.8 és a *B. bifidum* B1.2 törzsek esetén egy nagyságrenden belül maradt, de 96. óra után a vizsgált törzsek életképessége jelentősen lecsökkent.

A törzsek szénhidrát (mono-, di-, oligo-, és poliszacharidok) hasznosításának megismerése segítséget nyújthat a megfelelő tápközeg (nyersanyag) kiválasztásában. Továbbá szükséges megvizsgálni, hogy milyen mértékben nyilvánul meg a poli-, és oligoszacharidok prebiotikus hatása. A vizsgált törzsek a glükózt, a laktózt, a szacharózt és a maltózt általában jól hasznosították növekedési szubsztrátumként, míg a fruktózt kevésbé. A vizsgált *Bifidobacterium* törzsek közül a *B. adolescentis* és a *B. lactis* Bb-12 törzs az összes vizsgált prebiotikumot jobban hasznosította, mint a glükózt. A potenciális kórokozó baktériumok vizsgálatánál azt figyeltem meg, hogy a glükóznál rosszabbul hasznosították a Raftiline-t és a xilo-oligoszacharidokat. Ezek alapján megállapítható, hogy a prebiotikumok hasznosítása fajon belül is eltérést mutat, mind a bifidobaktérium, mind egyéb baktérium törzsek esetén, így ez törzsfüggő tulajdonságnak tekinthető. Sikerült vegyes kultúras modellrendszer alapjait megteremteni, ahol értékelhető a kereskedelmi forgalomból származó poli- és oligoszacharidok prebiotikus hatása.

A Maillard-reakció termékei az előkezelések során keletkezhetnek, ezért cél volt e reakció termékek hatásának feltárása a bifidobaktérium törzsekre. Eredményeim arra engednek következtetni, hogy a melanoidinek bizonyos mértékben gátolják a bifidobaktériumok szaporodását és a gátlás mértéke függ az adott törzstől és a melanoidinek molekulatömegétől.

Vizsgáltam a törzsek antimikrobás hatását, illetve a fehérjetermészetű gátlóanyag termelésüket, amelynek szerepe lehet az élelmiszerek biológiai tartósításában.

A kétrétegű spot módszer eredményei azt mutatták, hogy több *B. longum* és *B. bifidum* törzs erőteljes gátlást fejtett ki különösen az *E. coli* ATCC 8439, az *E. coli* O157:H7, *Ec. faecalis* valamint a *L. monocytogenes* 4ab törzsek szaporodására. Továbbá megállapítottam, hogy csupán a *B. longum* A4.8 törzs fejtett ki antagonista hatást a *Lactobacillus* törzsek közül a *Lb. acidophilus* La-5 és *Lb. casei* subsp. *casei* 2756 törzsre, míg *B. bifidum* B5.1 törzs csupán a *Lb. acidophilus* La-5 törzs szaporodását gátolta, amely a többkomponensű starterkultúrák tervezése szempontjából kedvező eredményként értékelhető. Eredményeim rávilágítottak arra is, hogy a törzsek antimikrobás anyag termelése függ a tenyésztési körülményektől is. A blot módszer eredményei szintén megerősítették, hogy egyes bifidobaktérium törzsek felülűszói antimikrobás hatású fehérjéket tartalmaznak. A *B. longum* A4.8 jelű törzs esetén végzett rotatoros elválasztás

után kapott 20 frakció közül a kettes frakció az *Eb. cloacae* kivételével, gátolta a tesztörzsek szaporodását, amely egyértelműen fehérjetermészetű antimikrobás anyag jelenlétére utal.

A szervezet és a baktériumok közötti kölcsönhatás, illetve kommunikáció kialakulásához szükséges a baktériumok tapadása a bélhámsejthez. Ebből a gondolatból kiindulva megvizsgáltam a bifidobaktérium törzsek tapadását Caco-2 szövettenyészetbe, ahol a legjobb tapadóképességet a *B. lactis* Bb-12, a *B. bifidum* B3.2 és B7.1 és a *B. longum* A4.9 törzs mutatta. A kiindulási sejtkoncentráció növelésével arányosan növekszik a tapadó baktériumok száma, viszont az is megállapítható, hogy a tapadó baktériumok százalékos arányának alakulása fordítottan arányos a kiindulási sejtkoncentrációval. A versengő kitapadás alapján megállapítható, hogy *E. coli* Bay100 nem befolyásolta sem a *B. bifidum* B3.2 sem a *B. lactis* Bb-12 törzs tapadását. A bifidobaktérium törzsek közül a *B. bifidum* B3.2 törzs nem gátolta az *E. coli* Bay100 tapadását, míg a *B. lactis* Bb-12 a 10^8 és 10^7 tke/lyuk hozzáadott *E. coli* koncentrációnál kismértékű gátlást, a 10^6 tke/lyuk *E. coli* hozzáadott koncentrációnál egy nagyságrendű gátlást fejtett ki a törzsre az egyedüli tapadásához viszonyítva.

Az erjesztési vizsgálataim során kiderült, hogy a zöldségleveket (sárgarépa-, cékla- és csicsókalé) az alkalmazott mono és vegyes kultúrák jól hasznosítják. Feltérképeztem a bifidobaktériumok szaporodását, anyagcsere tevékenységét a sárgarépalében. A nyers répalé előkezelésére alkalmazott pasztörözés mellett megvizsgáltam a nagy hidrosztatikus nyomású kezelést alkalmazhatóságának lehetőségét. A *B. lactis* Bb-12 törzsnél $2,48 \cdot 10^{10}$ tke/l*h, a *B. bifidum* B7.1 esetén $6,26 \cdot 10^{10}$ tke/l*h, *B. bifidum* B3.2 törzsnél $7,60 \cdot 10^{10}$ tke/l*h és a *B. longum* A4.8 törzsnél $4,50 \cdot 10^{10}$ tke/l*h fajlagos sejthozamokat kaptam a pasztörözött sárgarépalében, amely értékek jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal. Mind a négy törzs sejtszáma már az erjesztés 6. órájában elérte a 10^8 nagyságrendű sejtsűrűséget. Mindegyik törzsnél fokozatos egyenletes szénhidrát-tartalom csökkenést figyeltem meg. A Bb-12, a B3.2 és B7.1 törzs esetében hasonló mértékű szénhidrát fogyást (4,36-ról 3,80-3,88 (w/v)%-ra), míg az A4.8 kultúrájánál kisebb fogyást (4,36-ról 4,04 (w/v)%-re) tapasztaltam. Az erjesztés végén a különböző törzsek esetében a tejsav koncentráció 15-17 mg/ml, az ecetsav koncentráció pedig 3,3-5,3 mg/ml tartományban változott. A sárgarépalé α - és β -karotin tartalma a 24 órás fermentációkat követően különböző mértékű csökkenést mutatott: a B7.1 törzsszel történő erjesztés során legkisebb (4 és 9%), míg az A4.8 törzsnél a legnagyobb (22 és 30%) változást tapasztaltam. A termékfejlesztésre irányuló vizsgálatok alapján megállapítható, hogy mind a sárgarépalében, mind a csicsókalében a léptéknövelési és a tárolási célok teljesültek. Meghatároztam a sűrítményből készített zöldséglevelek optimális szárazanyag-tartalmát: a sárgarépa 8 (m/m) %, a csicsóka 7,5 (m/m) % és a cékla 10 (m/m) %. A léptéknövelés során (2 literes fermentorban) a törzsek a lombikos kísérletekhez hasonlóan jó szaporodó-, illetve erjesztőképességgel rendelkeztek. A *B. lactis* Bb-12 törzs 4°C-on történő tárolás alatti túlélőképességét vizsgálva fermentált termékekben megállapítottam, hogy a bifidobaktérium a sárgarépalében 45 nap után, valamint *Lb. casei* Shirota törzsszel társított vegyes kultúrával erjesztett csicsókalében 72 nap után is megőrizte életképességét. A sárgarépalében egy nagyságrendű, a csicsókalében nagyságrenden belül maradt a sejtszám csökkenése. A csicsókalében szobahőmérsékleten is jó túlélőképességet mutatott az

alkalmazott bifidobaktérium törzs és 72 nap után is csupán egy nagyságrendű sejtszám csökkenést tapasztaltam. A vegyes kultúra másik tagja az *Lb. casei* Shirota törzs is hasonló életképességet mutatott mindkét hőmérsékleten. Termékfejlesztési céljaim maradéktalanul teljesültek, mivel sikerült olyan vegyes starter kultúra (*B. lactis* Bb-12–*Lb. casei* Shirota) kialakítása, amely mind a probiotikumokra vonatkozó, mind a technológiai kívánalmakat kielégíti.

Az eredmények továbbfejlesztési lehetőségei

- Az egyes, szelektált *Bifidobacterium* törzsek (saját humán izolátumok) tömegtenyésztésének megvalósítása, starterkultúra előállítása és a szükséges engedélyeztetés után élelmiszeripari kultúraként történő alkalmazása.
- A *B. longum* A4.8 törzs által termelt antimikrobás anyag vizsgálata: kinyerése (tisztítása), jellemzése és esetleges alkalmazási lehetőségeinek feltárása.
- Az erjesztett zöldséglevelek bioaktív komponenseinek további vizsgálata: az előkezelés és az erjesztés során bekövetkező változásuk felderítése.
- Az erjesztett zöldséglevelek, illetve készítmények érzékszervi jellemzőinek vizsgálata, a fogyasztói elfogadottság felmérése.

6 SUMMARY

At the end of the 20th century a new concept, the *functional food* has appeared in the science of nutrition, which has role in maintenance of health beside its nourishing value. One of the dynamically developing fields of research connecting to functional foods is the design of probiotic foods, demonstration of the physiological effects of probiotics, and exploration of scientific evidence regarding their mode of action. The probiotics are living microorganisms that exerts their activity primarily in the colon, where more than 500 species of some 50 bacterium genera live. Great majority of the probiotics belong to the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera. Considering data of international and national studies probiotics have many beneficent physiological functions, i.e. they ferment dietary fibers; stimulate the growth of the epithelial cells of the large intestine and the intestinal peristalsis; alleviate the symptoms of certain types of diarrhoea; enhance the absorption of minerals; they break down lactose and some of the antigens; modulate the immune response and hereby decrease the occurrence of food allergies; bind and/or break down carcinogenic substances. However, probiotics should meet a number of requirements, for example they have to be safe, they have to resist stress occurring in the course of technological processes and keep their viability in the food until the end of shelf life, they have to be acid and bile resistant and survive during passing through the gastro-intestinal tract, and they should adhere to the epithelial cells of the intestine and enhance the immune system by growing there. Selection of foods containing probiotic bacteria is continuously growing, but 80% of them are fermented dairy products. By the broadening of the choice of probiotic foods with novel vegetable-based products, probiotics will be available for people who suffer from milk protein allergy or lactose intolerance, or who declaredly do not eat dairy products or in a limited degree. Considering these arguments, I had performed strain selection to achieve my aim of product development. Within the frame of this I had defined the physiological properties of the relevant *Bifidobacterium* strains, their antimicrobial activity and adherence to the intestinal epithelial cells. Furthermore, I had studied the fermenting and growth ability of the strains in different vegetable juices. I had investigated the applicability of pre-treatment technologies and the possibility of elaborating a fermentation technology with mono and mixed cultures. Finally, I aimed to carry out scale-up and storage trials.

As the primary selection criterion I had surveyed the vancomycin resistance of the probiotic bifidobacteria. All tested strains proved to be sensitive to vancomycin according to my results. I had detected 18 to 44 mm clear-up zones by the agar diffusion method, and 0.75 to 3.0 µg/ml minimal inhibitory (MIC) concentrations in liquid culture.

Since bifidobacteria are catalase negative microorganisms, it is important to get information on their hydrogen peroxide tolerance which may serve as selection criterion when strains are used in mixed culture. The strains *B. lactis* Bb-12 and *B. bifidum* B7.1 proved to be the most resistant ones: in liquid culture 200 µg/ml was the measured as minimal inhibitory concentrations. The *Bifidobacterium longum* B2.2 strain was the most sensitive with 100 µg/ml MIC value. These

results are promising from the point of view of mixed culture fermentations with lactic acid bacteria and bifidobacteria.

I have examined the oxygen tolerance of *Bifidobacterium* strains, which will emerge as important factor in the elaboration of a fermentation technology and in the scaling-up. The strains *B. breve*^T, *B. lactis* Bb-12, *B. dentium* B2.1, *B. bifidum* B7.1, *B. longum* A4.4, A4.8 and *B. bifidum* B1.2 were exposed to oxygen in the late logarithmic phase for 96-hour period.. Cell counts remained within one order of magnitude for 24 hours, but viability of the tested strains decreased significantly after 96 hours.

Knowledge of the carbohydrate (mono-, di-, oligo- and polysaccharides) utilization of the strains provides help in choosing the right medium (raw material). Furthermore, it is necessary to investigate the extent of the prebiotic effect of oligo- and polysaccharides. The tested strains utilized glucose, lactose, sucrose and maltose generally well as growth substrate, while fructose to a lesser extent. Of the examined *Bifidobacterium* strains *B. adolescentis* and *B. lactis* Bb-12 utilized better all the tested prebiotics than glucose. When studying potentially pathogen bacteria I noticed that they utilize less efficiently Raftiline and the xilo-oligosaccharides than glucose. Based on these results it can be stated that utilization of prebiotics show variation within species in both bifidobacteria and other bacterium strains, and should be considered as a strain-dependent characteristics. I had successfully established the basis of a mixed culture model system in which the prebiotic effect of commercially available oligo- and polysaccharides can be evaluated.

During pretreatment processes Maillard-reaction products may evolve, thus effect of them on the *Bifidobacterium* strains were explored. From my results I had concluded that melanoidins do inhibit the growth of bifidobacteria to a certain extent. The inhibition depends on the molecular mass of the melanoidins and on the strain as well.

I have investigated the antimicrobial activity of the strains and their proteinaceous inhibitory substance production which may have role in the biological preservation of foods.

Results of the spot method showed that several *B. longum* and *B. bifidum* strains exerted strong inhibition on the growth of the *E. coli* ATCC 8439, *E. coli* O157:H7, *Ec. faecalis* and the *L. monocytogenes* 4ab strains. Furthermore, I found out that only the *B. longum* A4.8 strain showed antagonistic effect on *Lactobacillus* strains – *Lb. acidophilus* La-5 and *Lb. casei* subsp. *casei* 2756 – while the *B. bifidum* B5.1 inhibited the growth of only the *Lb. acidophilus* La-5 strain. This result is favourable from the point of view of the design of multi-component starter cultures. My results had highlighted that antimicrobial substance production of the strains depend on the growth conditions. Data obtained from the blot method had also confirmed that the supernatant of some *Bifidobacterium* strains contain antimicrobial proteins. The one (No. 2) of twenty fractions obtained by the separation of protein with Rotofor produced by the *B. longum* A4.8 strain had inhibited the growth of all but one test strains – *Eb. cloacae*. This clearly indicates the presence of proteinaceous antimicrobial substance.

The bacteria have to adhere to the intestinal epithelium for the development of an interaction and communication between the human body and the bacterial cell. Taking this thought as a starting-point I investigated the adherence of *Bifidobacterium* strains to Caco-2 cell line, and the strains *B.*

lactis Bb-12, *B. bifidum* B3.2 and B7.1, and *B. longum* A4.9 showed the best ability to adhere. The number of the adhering bacterial cell increase in direct ratio to the initial cell concentration, but the percentage of adhering bacteria is in inverse ratio to the initial cell count. Based on the results of competitive adherence the *E. coli* Bay100 did not affect the adherence of *B. bifidum* B3.2 or the *B. lactis* Bb-12 strains. Of the tested *Bifidobacterium* strains *B. bifidum* B3.2 did not inhibit the adherence of *E. coli* Bay100. The *B. lactis* Bb-12 showed weak inhibition at 10^8 and 10^7 cfu/well added *E. coli* concentrations, while at 10^6 cfu/well added *E. coli* concentration the extent of the inhibition was one order of a magnitude compared to sole adherence of the *E. coli* strain.

In the course of my fermentation experiment it turned out that the applied mono and mixed cultured utilized well the vegetable juices (carrot, beet and Jerusalem artichoke juice). Beside the pasteurization I have investigated the applicability of high hydrostatic pressure as pre-treatment of the raw carrot juice. I have made a survey of the growth and metabolic activity of bifidobacteria in carrot juice. Specific cell yield in pasteurized carrot juice was the following in the case of the strains: *B. lactis* Bb-12: $2.48 \cdot 10^{10}$ cfu/l*h, *B. bifidum* B7.1: $6.26 \cdot 10^{10}$ cfu/l*h, *B. bifidum* B3.2: $7.60 \cdot 10^{10}$ cfu/l*h, and *B. longum* A4.8 $4.50 \cdot 10^{10}$ cfu/l*h. These values are in accordance with data found in the literature. Cell count of all four strains reached the 10^8 order of magnitude in the 6th hour of the fermentation. The concentration of carbohydrates decreased gradually in all cases. The rate of carbohydrate decrease was similar in case of the Bb-12, B3.2 and B7.1 strains (from 4.36 (w/v)% to 3.80-3.88 (w/v)%). In case of the strain A4.8 the decrease was smaller, from 4.36 (w/v)% to 4.04 (w/v)%). At the end of the fermentations the lactic acid and the acetic acid concentration was 15-17 mg/ml and 3.3-3.5 mg/ml, respectively. The α - and β -carotene concentration showed different decrease after 24 hours of fermentation: the smallest change was in case of the B7.1 strain (4 and 9%, respectively), while the biggest was in case of the A4.8 strain (22 and 30%, respectively). Based on the experiments that were aimed at product development it can be concluded that both in carrot juice and in Jerusalem artichoke juice the scaling-up and storage goals were achieved. I had determined the optimal dry matter content of vegetable juice made of concentrate: they were 8, 7.5 and 10 (m/m)% for carrot, Jerusalem artichoke and beet, respectively. The strains showed as good growth and fermenting abilities in the scaling-up experiments (in 2-liter bench-top fermentor) as in flask scale experiments. I studied the survival of the *B. lactis* Bb-12 strain in fermented products at 4°C. I found that the bifidobacterium as monoculture had kept its viability in carrot juice for 45 days. When Jerusalem artichoke juice was fermented with the mixed culture of *B. lactis* and *Lb. casei* Shirota the bifidobacterium had kept its viability for 72 days. Cell concentration decreased one order of magnitude in carrot juice, while it remained in the order of the initial cell count in Jerusalem artichoke juice. The applied bifidobacterium strain showed good surviving ability in Jerusalem artichoke juice at room temperature, and the cell count decreased only one order of magnitude after 72 days of storage. The other member of the mixed culture, the *Lb. casei* Shirota strain showed similar surviving ability at both storage temperatures. My product development goals

were granted since it was possible to create such a starter culture – *B. lactis* Bb-12 and *Lb. casei* Shirota – that fulfils requirements regarding both probiotics and the production technology.

Possibilities for the further development of the results

- Elaboration of the mass propagation of some of the selected *Bifidobacterium* strains (own human isolates), production of starter culture and obtaining permission for application as culture in the food industry.
- Investigation of the antimicrobial substance produced by the *B. longum* A4.8 strain: purification, characterization and exploration of possible applications.
- Investigation of the biologically active components of fermented vegetable juices: highlighting the changes occurring during pretreatment and fermentation.
- Evaluation of the sensory properties of fermented vegetable juices and products, surveying consumer acceptance.

7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Meghatároztam a vancomycin antibiotikum és a hidrogén-peroxid hatását a szelektált *Bifidobacterium* törzsekre. Megállapítottam, hogy a törzsek vancomycin antibiotikummal szemben érzékenyek mind agardiffúziós, mind folyadék tenyészetben vizsgálva. A folyadék kultúrában az egyedi törzsek vancomycin érzékenysége a minimális gátló koncentrációk (MIC) alapján 0,75-3,0 µg/ml tartományban voltak. A bifidobaktérium törzsek hidrogén-peroxid toleranciája agardiffúziós módszerrel egységesen 375 µg/ml-nek adódott. A folyadék kultúrában az egyes törzsek függetlenül a faji hova tartozásuktól jelentős különbségeket mutattak, és a MIC értékek 100-300 µg/ml koncentráció tartományban változtak. A legnagyobb hidrogén-peroxid toleranciát a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 starter kultúra mutatta.
2. A Maillard reakció eredményeként létrejövő melanoidinek közül mind a kakaó, mind a kenyér melanoidin gátolja a bifidobaktériumok szaporodását. A gátlás mértékét erőteljesen befolyásolja a melanoidin molekulatömege. A különböző eredetű melanoidinokkal szemben a vizsgált törzsek eltérő érzékenységet mutattak.
3. Módszert dolgoztam ki prebiotikumok szelektív hatásának kimutatására. A modell rendszerben *B. lactis* Bb-12 és *E. coli* O157:H7, valamint *B. adolescentis*^T és *E. coli* O157:H7 törzsek párosításával értékeltem két kereskedelmi forgalomban kapható prebiotikum készítményt (Raftilose és Xylo-oligo 95P). Megállapítottam, hogy mind a *B. lactis* Bb-12, mind a *B. adolescentis*^T törzsek jobban hasznosították növekedési szubsztrátumként a két prebiotikumot, mint a glükózt, tehát bifidogén faktoroknak tekinthetők. Együtt tenyésztésnél a Raftilose jelenlétében a bifidobaktériumok nagyobb sejtszámot értek el, mint az *E. coli* O157:H7 törzs.
4. Kimutattam, hogy néhány *B. bifidum*, *B. longum* törzs gátló hatást fejt ki a *L. monocytogenes* 4ab, az *Ec. faecalis*, az *E. coli* O157:H7 és ATCC 8439 jelű törzsek szaporodására, és ez nem a pH hatás következménye. Megállapítottam, hogy az antagonista hatás mértékét befolyásolják a tenyésztési körülmények. Az antimikrobás hatást mutató törzsek tenyészleveiben egy 5-7 kDa molekulatömegű fehérjét találtam, amely gátolta a *L. monocytogenes* 4ab szaporodását.
5. A versengő tapadás során igazoltam, hogy a *B. bifidum* B3.2 nem, míg a *B. lactis* Bb-12 törzs gátolta az *E. coli* Bay100 törzs tapadását.
6. *B. lactis* Bb-12 starter kultúra számára elegendő tápanyagot szolgáltatnak a vizsgált növényi nyersanyagok – a sárgarépa-, a cékla- és a csicsókalé - a szaporodáshoz. Vegyes kultúras fermentációs technológiát dolgoztam ki *B. lactis* Bb-12 és *Lb. casei* Shirota starter kultúrák alkalmazásával. A két törzs stimulálja egymás szaporodását, amely kommenzalista kölcsönhatásra utal.

MELLÉKLETEK

IRODALOMJEGYZÉK

- AHN J.B., HWANG H.J., PARK J. (2001): Physiological responses of oxygen tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11 (3) 443-451. p.
- ALANDER M., KORPELA R., SAXELI M., VILPPONEN-SALMELA T., MATTILA-SANDHOLM T., VON WRIGHT A. (1997): Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Letters in Applied Microbiology*, 24 (5) 361-364. p.
- ALPAS H., BOZOGLU F. (2000): The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogen in milk and orange juice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (4) 387-392. p.
- ALTENA K., GUDER A., CRAMER C., BIERBAUM G. (2000): Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6) 2565-2571. p.
- AMES J.M., WYNNE A., HOFMANN A., PLOS S., GIBSON G.R. (1999): The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. *British Journal of Nutrition*, 82 (6) 489-495. p.
- ANAND S.K., SRINIVASAN R.A., RAO L.K. (1984): Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-I. *Cultured Dairy Products Journal*, 11, 6-7. p.
- ANDERSSON R., HEDLUNG B. (1983): HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A, European food research and technology*, 176 (6) 440-443. p.
- ANGELI, I., BARTA, J., MOLNÁR, L. (2000): A gyógyító csicsóka. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 160 p.
- ANGELOV A., GOTCHEVA V., KUNCHEVA R., HRISTOZOVA T. (2006): Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, 112 (1) 75-80. p.
- ARUNACHALAM K.D. (1999): Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*, 19(10) 1559-1597. p.
- ASAHARA T., NOMOTO K., SHIMIZU K., WATANUKI M., TANAKA R. (2001): Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection by synbiotic administration of *Bifidobacteria* and transgalactosylated oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (6) 985-996. p.
- BANERJEE S., HANSEN J.N. (1988): Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (19) 9508-9514. p.
- BARÁTH Á., HALÁSZ A. NÉMETH E., ZALÁN ZS. (2004): Selection of LAB strains for fermented red beet juice production. *European Food Research and Technology*, 218 (2) 184-187. p.
- BARTA J., PÁTKAI GY. (2007): Chemical composition and storability of Jerusalem artichoke tubers. *Acta Alimentaria*, 36 (2) 257-267. p.
- BECH-LARSEN T., SCHOLDERER J. (2007): Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspect. *Trends in Food Science and Technology*, 18 (4)231-234 p.
- BEERENS H. (1990): An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Letters of Applied Microbiology*, 11 155-7. p.
- BEERENS H., GAVINI F., NEUT C. (2000): Effect of exposure to air on 84 strains of Bifidobacteria. *Anaerobe*, 6 (2) 65-67. p.
- BENGMARK S. (1998): Immunonutrition: Role of biosurfactants, fiber, and probiotic bacteria. *Nutrition*, 14 (7-8) 585-594. p.
- BERNER L. A., O'DONNELL J. A. (1998): Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. *International Dairy Journal*, 8, 355-362 p.

- BERNET M.F., BRASSART D., NEESER J.R., SERVIN A.L. (1993): Adhesion of human Bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (12) 4121-4128. p.
- BIANCHI M.A., DEL RIO D., PELLEGRINI N., SANSEBASTIANO G., NEVIANI E., BRIGHENTI F. (2004): A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology*, 39 (3) 301-305. p.
- BIAVATI B., SGORBATI B., SCARDOVI V. (1991): The Genus *Bifidobacterium*. 816-833. p. In: BALOWS A., TRUPER G., DWORKIN M., HARDER, W., SCHLEIFER K.H. (eds): *The Prokaryotes*, 2nd ed, Volume 1, New York: Springer-Verlag,
- BIAVATI B., VESCOVO M., TORRIANI S., BOTTAZZI V. (2000): Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50 (2) 117-131. p.
- BIBILONI R., PÉREZ P.F., DE ANTONI G.L. (1999): Factors involved in adhesion of Bifidobacterial strains to epithelial cells in culture. *Anaerobe*, 5 (3-4) 483-485. p.
- BLANCHETTE L., ROY D., GAUTHIER S. F. (1995): Production of cultured cottage cheese dressing by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 78 (7) 1421-1429. p.
- BLANDINO A., AL-ASEERI M.E., PANDIELLA S.S., CANTERO D., WEBB C. (2003): Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36 (6) 527-543. p.
- BORELLI R.C., VISCONTI A., MENNELLA C., ANESE M., FOGLIANO V. (2002): Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (22) 6527-6533. p.
- BORRIELLO S.P., HAMMES W.P., HOLZAPFEL W., MARTEAU P., SCHREZENMEIR J., VAARA M., VALTONEN V. (2003): Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 36 (6) 775-780. p.
- BRANDT K., CHRISTENSEN L.P., HANSEN-MØLLER J., HANSEN S.L., HARALDSDOTTIR J., JESPERSEN L., PURUP S., KHARAZMI A., BARKHOLT V., FRØKIÆR H., KOBÆK-LARSEN M. (2004): Health promoting compounds in vegetables and fruits: A systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (7-8) 384-393. p.
- BROWN I.L., WANG X., TOPPING D.L., PLAYNE M.J., CONWAY P.L. (1998): High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. *Food Australia*, 50 (12) 603-609. p.
- BUCKENHÜSKES H., SCHNEIDER M., HAMMES W.P. (1986): Die milchsäure Vergärung pflanzlicher Rohware unter besonderer Berücksichtigung der Herstellung von Sauerkraut. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 10 (1-2) 42-53. p.
- CAUSEY J.L., FEIRTAG J.M., GALLAHER D.D., TUNGLAND B.C., SLAVIN J.L. (2000): Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutrition Research*, 20 (2) 191-201. p.
- CHARALAMPOPOULOS D., WANG R., PANDIELLA S.S., WEBB C. (2002): Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (1-2) 131-141. p.
- CHARTERIS W.P., KELLY P.M., MORELLI L., COLLINS J.K. (1998): Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (5) 333-337. p.
- CHEN Y., LUDESCHER R.D., MONTVILLE T.J. (1997/a): Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12) 4770-4777. p.
- CHEN Y., SHAPIRA R., EISENSTEIN M., MONTVILLE T.J. (1997/b): Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2) 524-531. p.

- CHEVALIER F., CHOBERT J.M., GENOT C., HAERTLE T. (2001): Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of beta-lactoglobulin glycosylated with several sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10) 5031-5038. p.
- CHOU L.S., WEIMER B. (1999): Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82 (1) 23-31. p.
- CLEVELAND J., MONTVILLE T.J., NES I.F., CHIKINDAS M.L. (2001): Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservations. *International Journal of Food Microbiology*, 71 (1) 1-20. p.
- COLLADO M.C., HERNÁNDEZ M., SANZ Y. (2005): Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. *Journal of Food Protection*, 68 (5) 1034-1040. p.
- COLOMBEL J.F., CORTOT A., NEUT C., ROMOND C. (1987): Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effect. *The Lancet*, 330 (8549) 43. p.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003): Proposal for a regulation of the European Parliament and of the Council on nutrition and health claims made on foods. COM/2003/0424. Brussels: Commission of the European Communities. <http://europa.eu/scadplus/leg/en/lvb/121306.htm>, 2008.01.08.
- CRITTENDEN R.G., PLAYNE M.J. (1996): Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 7 (11) 353-361. p.
- CUMMINGS J. H., POMARE E. W., BRANCH W. J., NAYLOR C.P., MACFARLANE G. T. (1987): Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28 1221-27. p.
- CUMMINGS J.H., ENGLYST H.N. (1987): Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45 (5) 1243-1255. p.
- CUMMINGS J.H., MACFARLANE G.T. (2002): Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87 (Supplement 2) S145-S151. p.
- CUNNINGHAM-RUNDLES S., AHRNÉ S., BENGMARK S., JOHANN LIANG R., MARSHALL F., METAKIS L., CALIFANO C., : DUNN A. M. : GRASSEY C., HINDS G., : CERVIA J. (2000): Probiotics and immune response. *American Journal of Gastroenterology*, 95 (Supplement 1) S22-25. p.
- DABA H., PANDIAN S., GOSSSELIN J.F., SIMARD R.E., HUANG J., LACROIX C. (1991): Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (12) 3450-3455. p.
- DAESCHEL M.A. (1993): Applications and Interactions of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Foods and Beverages, pp. 63-91. In: Hoover D.G. and Stevenson L.R. (eds.): *Bacteriocins of lactic acid bacteria (Food science and Technology)*, San Diego, Ca: Academic Press, INC., 265. p.
- DAMIANI P., GOBBETTI M., COSSIGNANI L., CORSETTI A., SIMONETTI M.S., ROSSI J. (1996): The sourdough microflora. Characterisation of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 29 (1-2) 63-70. p.
- DANIELLS S. (2006): Valio continues research into probiotic fruit juice. Nutraingredients. <http://www.nutraingredients.com/news/ng.asp?id=67086>, 2007.11.17.
- DE VUYST L., AVONTS L., MAKRAS L. (2004): Probiotics, prebiotics and gut health. 416-482. p. In: REMACLE C., REUSENS B. (Eds): *Functional foods, ageing and degenerative disease*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. 792. p.
- DEÁK T. (2006): Élelmiszer-mikrobiológia. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 382. p.
- DEGNAN B.A., MACFARLANE G.T. (1994): Effect of dilution rate and carbon availability on *Bifidobacterium breve* fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40 (6) 800-805. p.
- DEL RE B., Busetto A., VIGNOLA G., SGORBATI B., PALENZONA D. L. (1998): Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Letters in Applied Microbiology*, 27 (5) 307-310. p.

- DEL RE B., SGORBATI B., MIGLIOLI M., PALENZONA D. (2000): Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31 (6) 438-442. p.
- DEMIR N, BAHCECI K.S., ACAR J. (2006): The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal Food Processing and Preservation*, 30 (3) 352-63. p.
- DIEP D.B., HÄVARSTEIN L.S., NISSEN-MEYER J., NES I.F. (1994): The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (1) 160-166. p.
- DIEP D.B., HAVARSTEIN L.S., NES I.F. (1996): Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178 (15) 4472–4483. p.
- DOLEYRES Y., PAQUIN C., LEROY M., LACROIX C. (2002): *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (1-2) 168-173. p.
- DONG X., XIN Y., JIAN W., LIU X., LING D. (2000): *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (1) 119-125. p.
- DRIESSEN A.J., VAN DEN HOOVEN H.W., KUIPER W. VAN DE K.M. SAHL H.G. KONINGS R.N. KONINGS W.N. (1995): Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34 (5) 1606–1614. p.
- DUFOUR A. RINCE A. UGUEN P. LEPENNEC J.P. (2000): IS1675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lacticin 481 lantibiotic operon. *Journal of Bacteriology*, 182 (19) 5600-5605. p.
- DUNNE C., MURPHY L., FLYNN S., O'MAHONY L., O'HALLORAN S., FEENEY M., MORRISSEY D., THORNTON G. (1999): Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76 (1-4) 279-292. p.
- EIJSINK V.G.H., AXELSSON L., DIEP D.B., HÄVARSTEIN L.S., HOLO H., NES I.F. (2002): Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81 (1-4) 639-654. p.
- ENGELKE G. GUTOWSKI-ECKEL Z. HAMMELMANN M. ENTIAN K.D. (1992): Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (11) 3730–3743. p.
- ENGELKE G., GUTOWSKI-ECKEL Z., KIESAU P., SIEGERS K., HAMMELMANN M., ENTIAN K.D. (1994): Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (3) 814–825. p.
- ENTIAN K.D., DE VOS W.M. (1996): Genetics of subtilin and nisin biosyntheses: biosynthesis of lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69 (2) 109-117. p.
- ESKIN N. A., TAMIR S. (2006): Dictionary of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press Inc. Taylor & Francis Group, Abington, England. 507. p.
- EUROPEAN COUNCIL DIRECTIVE 79/112/EEC of 18 December 1978 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs for sale to the ultimate consumer. (*Official Journal of the European Communities* - 08.02.1979, L 33, 1-14 p.) http://www.biosafety.be/GB/Dir.Eur.GB/FF/79_112/79_112.html, 2008.07.14.
- FERGUSON L.R., TASMAN-JONES C., ENGLYST H., HARRIS J.P. (2000): Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. *Nutrition and Cancer*, 36 (2) 230-237. p.
- FOOKS L.J., FULLER R., GIBSON G.R. (1999): Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9 (1) 53-61. p.

- FOOKS L.J., GIBSON G.R. (2003): Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe*, 9 (5) 231-242. p.
- FRANKEL W.L., ZHANG W., SINGH A. (1994): Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology*, 106 (2) 375-380. p.
- FRANKS A.H., HARMSSEN H.J.M., RAANGS G.C., JANSEN G.J., SCHUT F., WELLING G.W. (1998): Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9) 3339-3345. p.
- FUJIWARA S., HASHIBA H., HIROTA T., FORSTNER J.F. (1997): Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglioside. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2) 506-512. p.
- FUJIWARA S., HASHIBA H., HIROTA T., FORSTNER J.F. (1999): Purification and characterization of a novel protein produced by *Bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 (CFA/II) to ganglioside. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (4) 615-621. p.
- FULLER R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66 (5) 365-378. p.
- GAÁL-LABÁTH K. (2001): A sárgarépa. *Élelmészvezetők lapja*, V. évf. (június-július). <http://www.elelmezesvezetok.hu/szamok/05/06/16.htm>
- GAGNON M., KHEADR E.E., BLAY G.L., FLISS I. (2004): In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 92 (1) 69-78. p.
- GARCIA A.F., BUTZ P., BOGNÁR A., TAUSCHER B. (2001): Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*, 213 (4-5) 290-296. p.
- GARNEAU S., MARTIN N. I., VEDERAS J. C. (2002): Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84 (5-6) 577-592. p.
- GARRO M.S., DE VALDEZ G.F., DE GRIORI G.S. (2004): Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiology*, 21 (5) 511-518. p.
- GAVINI F., VAN ESBROECK M., TONZEL J.P., FOURMENT A., GOOSSENS H. (1996): Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the Bifid-Shunt, in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe*, 2 (3) 191-193. p.
- GERRARD J.A. (2006): The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead - Conference Report from the Eighth International Symposium on the Maillard Reaction. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6) 324-330. p.
- GIBSON G. R., WILLIAMS C. M. (Eds) (2000): Functional food. Concept to product. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC, 1-5. p.
- GIBSON G.R., ROBERFROID M.B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125 (6) 1401-1412. p.
- GIBSON G.R., WANG X. (1994/a): Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiology*, 11 (6) 490-498. p.
- GIBSON G.R., WANG X. (1994/b): Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77 (4) 412-420. p.
- GILL H.S. (1998): Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal*, 8 (5-6) 535-544. p.
- GIONCHETTI P., RIZZELLO F., VENTURI A., BRIGIDI P., MATTEUZZI D., BAZZOCCHI G., POGGIOLI G., MIGLIOLI M., CAMPIERI M. (2000): Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 119 (2) 305-309. p.

- GOMES A.M.P., MALCATA F.X. (1999): *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10 (4-5) 139-157. p.
- GOPAL P.K., PRASAD J., SMART J., GILL H.S. (2001): In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67 (3) 207-216. p.
- GRAF F., GROB P., BRASSART D. (2006): Lactic acid bacteria strains useful against gastrointestinal pathogens and compositions containing same. WO/2006/045474, www.Wipo.int/pctdb/en
- GRAJEK W., OLEJNIK A., SIP A. (2005): Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*, 52 (3) 665-671. p.
- GRILL J.-P., CROCIANI J., BALLONGUE J. (1995): Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. *Letters in Applied Microbiology*, 20 (5) 328-330. p.
- GUARNER F., MALAGELADA J.R. (2003): Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 360 (9356) 512-519. p.
- GUEIMONDE M., MARGOLLES A., DE LOS REYES-GAVILÁN C.G., SALMINEN S. (2007): Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile – A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 113 (2) 228-232. p.
- GUEIMONDE M., NORIEGA L., MARGOLLES A., DE LOS REYES-GAVILÁN C.G., SALMINEN S. (2005): Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology*, 101 (3) 341-346. p.
- HA C.L., LEE J.H., ZHOU H.R., USTUNOL Z., PESTKA J.J.(1999): Effects of yogurt ingestion on mucosal and systemic cytokine gene expression in the mouse. *Journal of Food Protection*, 62 (2) 181-188. p.
- HAMILTON-MILLER J.M.T. (2003): The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22 (4) 360-366. p.
- HANSEN Å., HANSEN B. (1994): Influence of wheat flour type on the production of flavour compounds in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*, 44 (2) 456-459. p.
- HANSEN J.N. (1993): The molecular biology of nisin and its structural analogues, 93- 119. p. In: HOOVER D.G., STEVENSON L.R. (eds.): *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. San Diego, California: Academic Press, INC., 265 p.
- HARLANDER S.K. (1993): Regulatory aspects of bacteriocin use, 233-249. p. In: HOOVER D. G., STEENSON L. R. (eds.): *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. San Diego, California: Academic Press, INC., 265 p.
- HART A.L., LAMMERS K., BRIGIDI P., VITALI B., RIZZELLO F., GIONCHETTI P., CAMPIERI M., KAMM M.A., KNIGHT S.C., STAGG A.J. (2004): Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53 (11) 1602-1609. p.
- HE F., MORITA H., OUWEHAND A.C., HOSODA M., HIRAMATSU M., KURISAKI J., ISOLAURI E., BENNO Y., SALMINEN S. (2002): Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiology and Immunology*, 46 (11), 781-785. p.
- HE F., OUWEHAND A. C., HASHIMOTO H., ISOLAURI E., BENNO Y., SALMINEN S. (2001/a): Adhesion of *Bifidobacterium spp.* to human intestinal mucus. *Microbiology and Immunology*, 45 (3), 259-262. p.
- HE F., OUWEHAND A. C., ISOLAURI E., HOSODA M., BENNO Y., SALMINEN S. (2001/b): Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Current Microbiology*, 43 (5) 351-354. p.
- HE F., OUWEHAND A. C., ISOLAURI E., HOSODA M., BENNO Y., SALMINEN S. (2001/c): Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 30 (1) 43-47. p.

- HEENAN C.N., ADAMS M.C., HOSKEN R.W., FLEET G.H. (2002): Growth medium for culturing probiotic bacteria for application in vegetarian food products. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35 (2) 171-176. p.
- HELLAND M.H., WICKLUND T., NARVHUS J.A. (2004): Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. *International Dairy Journal*, 14 (11) 957-965. p.
- HELLER K.J. (2001): Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (suppl), 374S-379S. p.
- HERRMANN K. (2001): *Inhaltstoffe von Obst und Gemüse*. Stuttgart:Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., 95-140. p.
- HILTON E., KOLAKOWSKI P., SINGER C., SMITH M. (1997): Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal preventive in Travelers. *Journal of Travel Medicine*, 4 (1) 41-43. p.
- HOLM F. (2003): New functional food ingredients. Cancers and oxidative degradations. Flair-Flow 4 Synthesis report. Institut national de la Recherche, Paris, France, 32. p.
- HOLZAPFEL W.H. (2002): Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75 (3) 197-212. p
- HOLZAPFEL W.H., SCHILLINGER U. (2002): Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35 (2-3) 109-116. p.
- HOMMA N. (1988): Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria and Microflora* 7 (1) 105-113. p.
- HOOD S.K., ZOTTOLA E.A. (1988): Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science*, 53 (5) 1514-1516. p.
- HORI T., KIYOSIMA J., SHIDA K., YASUI H. (2001): Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (3) 593-597. p.
- HOSONA A., TONO-OKA T. (1995): Binding of cholesterol with lactic acid bacterial cells. *Milchwissenschaft*, 50 (20) 556-560. p.
- HOU J.-W., YU R.-C., CHOU C.C. (2000): Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International*, 33 (5) 393-397. p.
- HUEBNER J., WEHLING R.L., HUTKINS R.W. (2007): Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17 (7) 770-775. p.
- IBRAHIM S.A., BEZKOROVAINY A. (1993): Inhibition of *Escherichia coli* by Bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 56 (8) 713-715. p.
- ISHIBASHI N., YAMAZAKI S. (2001): Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (Supplement) 465S-470S. p.
- ISOLAURI E., SALMINEN S., OUWEHAND A.C. (2004): Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18 (2) 299-313. p.
- ISOLAURI E., SÜTAS Y., KANKAANPÄÄ P., ARVILOMMI H., SALMINEN S. (2001): Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (Supplement) 444S-450S. p.
- JIAN W., ZHU L., DONG X. (2002): Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov, comb. nov, and *Parascardovia denticolens* gen. nov, comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 (3) 809-812. p.
- JIANG T., MUSTAPHA A., SAVAIANO D.A. (1996): Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*, 79 (5) 750-757. p.
- JIMENEZ-DIAZ R., RUIZ-BARBA J.L., CATHCART D.P., HOLO H., NES I.F., SLETTEN K.H., WARNER P.J. (1995): Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin

- produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12) 4459-4463. p.
- JOHNSON A.P., UTTLEY A.H.C., WOODFORD N., GEORGE R.C. (1990): Resistance to vancomycin and teichoplanin: an emerging clinical problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 3 (3) 280-291. p.
- JOHNSON H., WILLIAMS G., MUSK S.R. (1994): Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients? *Nutrition Research Review*, 7 (1) 175-205. p.
- JUNTUNEN M., KIRJAVAINEN P.V., OUWEHAND A.C., SALMINEN S.J., ISOLAURI E. (2001): Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (2) 293-296. p.
- KAALIOMAKI M., SALMINE S.J., ARVILOMMI H., KERO P, KOSKINEN P, ISOLAURI E. (2001): Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 357 (9262), 1076-1079. p.
- KHEADR E., BERNOUSSI N., LACROIX C., FLISS I. (2004): Comparison of the sensitivity of commercial strains and infant isolates of bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins. *International Dairy Journal*, 14 (12) 1041-1053. p.
- KIM H.Y., BAE H.S., BAEK Y.J. (1991): *In vivo* Antitumor Effects of Lactic Acid Bacteria on Sarcoma 180 and Mouse Lewis Lung Carcinoma. *Journal of the Korean Cancer Association*, 23 (2) 188-196. p.
- KIRJAVAINEN P.V., OUWEHAND A.C., ISOLAURI E., SALMINEN S.J. (1998): The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167 (2) 185-189. p.
- KLAENHAMMER T.R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3) 39-85. p.
- KLAVER F.A.M., VAN DER MEER R. (1993): The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (4) 1120-1124. p.
- KLEIN C., ENTIAN, K.D. (1994): Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8) 2793-2801. p.
- KLEIN C., KALETTA C., SCHNELL N., ENTIAN K.D. (1992): Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. (published erratum appears in *Applied and Environmental Microbiology* 1992. May, 58 (5) 1795). *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (1) 132-142. p.
- KLEIN C., KALETTA C., ENTIAN K.D. (1993): Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase response regulator system. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (1) 296-303. p.
- KONTRASZTI M., BARNA É., GERGELY A., KERTÉSZNÉ LEBOVICS V., LUGASI A., NESZLÉNYI K. (2005): Élelmi anyagok, élelmiszerek, ételek, ételkészítmények tápanyag összetétele. 233-443. p. In: RODLER I. (szerk.): Új tápanyagtáblázat. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt., 765. p.
- LANKAPUTHRA W.E.V., SHAH N.P. (1998): Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutation Research*, 397 (2) 169-182. p.
- LAUER E., KANDLER O. (1983): DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of genus *Bifidobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4 (1) 42-64
- LE BLAY G., FLISS I., LACROIX C. (2004): Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *Journal of Microbiological Methods*, 59 (2) 211-221. p.
- LEAHY S.C., HIGGINS D.G., FITZGERALD G.F., SINDEREN D. (2005): Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (6) 1303-1315. p.
- LEE Y.-J., YU W.-K., HEO T.-R. (2003): Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21 (4) 340-346. p.

- LEPORANTA K. (2005): Probiotics for juice-based products – Case Valio GEFILUS®. International sales, May 23, 2005. www.valio.fi, 2007.11.17.
- LEROY F., DE VUYST L. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67-68. p.
- LEUSCHNER R.G., HEIDEL M., HAMMES W.P. (1998): Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39 (1) 1-10. p.
- LIÉVIN V., PEIFFER I., HUDAULT S., ROCHAT F., BRASSART D., NEESER J.-R., SERVIN A.L. (2000): *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47 (5) 646-652. p.
- LILLY D.M., STILLWELL R.H. (1965): Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 (3659) 747-748. p.
- LO P.-R., YU R.-C., CHOU C.-C., TSAI Z.-H. (2002): Antimutagenic activity of several probiotic Bifidobacteria against benzo[a]pyrene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (2) 148-153. p.
- LORRI W., SVANBERG U. (1993): Lactic-fermented cereal gruels with improved *in vitro* protein digestibility. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 44 (1) 29-36. p.
- LOVEGROVE J. A., JACKSON K. G. (2000): Coronary heart disease. 97-139. p. In: GIBSON G.R., WILLIAMS C.M. (Eds.): Functional food. Concept to product. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC 374. p.
- LUCKOW T., DELAHUNTY C. (2004): Which juice is healthier? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference*, 15 (7-8) 751-759. p.
- MACFARLANE G.T., CUMMINGS J.H., ALLSON C. (1986): Protein degradation by human intestinal bacteria. *Journal of General Microbiology*, 132 (6) 1647-56. p.
- MAKRAS L., DE VUYST L. (2006): The *in vitro* inhibition of Gram-positive pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, 16 (9) 1049-1057. p.
- MANNING T.S., GIBSON G.R. (2004): Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2) 287-298. p.
- MARIN M.L., TEJADA-SIMON M.V., LEE J.H., MURTHA J., USTUNOL Z., PESTKA J.J. (1998): Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cells models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Protection*, 61 (7) 859-861. p.
- MARTEAU P., FLOURIÉ B., POCHART P., CHASTANG C., DESJEUX J.F., RAMBAUD J.C. (1990): Role of microbial lactase (EC 3.2.123) activity from yogurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase deficient humans. *British Journal of Nutrition*, 64 (1) 71-79. p.
- MARTEAU P.R., DE VRESE M., CELLIER C.J., SCHREZENMEIR J. (2001): Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2) Supplement 430S-436S. p.
- MATRICARDI P.M. (2002): Probiotics against allergy: data, doubts, and perspectives. *Allergy*, 57 (3) 185-187. p.
- MATSUMOTO M., OHISHI H., BENNO Y. (2004): H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 93 (1) 109-113. p.
- MATSUZAKI T. (1998): Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*, 41 (2) 133-140. p.
- MATTILA-SANDHOLM T., BLUM S., COLLINS J.K., CRITTENDEN R., DE VOS W., DUNNE C., FODÉN R., GRENOV G., ISOLAURI E., KIELY B., MARTEAU P., MORELLI L., OUWEHAND A., RENIERO R., SAARELA M., SALMINEN S., SAXELIN M., SCHIFFRIN E., SHANAHAN F., VAUGHAN, E., VON WRIGHT A. (1999): Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science & Technology*, 10 (12) 393-399. p.

- MATTLA-SANDHOLM T., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. (2002): Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12 (2-3) 173-182. p.
- MAYER Á., REZESSY-SZABÓ J., BOGNÁR CS., HOSCHKE Á. (2003): Research for creation functional foods with bifidobacteria. *Acta Alimentaria*, 32 27-39. p.
- MAYER Á. (2004): Bifidobaktériumok izolálása, azonosítása, fiziológiai, biokémiai és funkcionális jellemzésük. Doktori értekezés. Budapesti Közgazdaságtudományi és Államigazgatási Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Budapest. 138. p.
- McAULIFFE O., ROSS R.P., HILL C. (2001): Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25 (3) 285-308. p.
- MEGHROUS J. EULOGE P. JUNELLES A.M. BALLONGUE J. PETITDEMANGE H. (1990): Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnology Letters*, 12 (8) 575-580. p.
- MEILE L., LUDWIG W., RUEGER U., GUT C., KAUFMANN P., DASEN G., WENGER S., TEUBER M. (1997): *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a Moderately Oxygen Tolerant Species Isolated from Fermented Milk. *Systematic and Applied Microbiology*, 20 (1) 57-64. p.
- MENRAD K. (2003): Market and marketing of functional foods in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56 (2-3) 181-188. p.
- MERCENIER A., PAVAN S., POT B. (2003): Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (2) 175-191. p.
- MODLER H.W. (1994): Bifidogenic factors, sources, metabolism and application. *International Dairy Journal*, 4 (5) 383-407. p.
- MOLIN G. (2001): Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (Suppl.), 380S-385S. p.
- MOLL G.N., KONINGS W.N., DRIESSEN A.J.M. (1999): Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76 (1-4) 185-198. p.
- MONTVILLE T.J. KAISER A.L. (1993): Antimicrobial Proteins: Classification, Nomenclature, Diversity, and Relationship to Bacteriocins, pp.1-22. In HOOVER D.G., STEVENSON L.R. (eds.): Bacteriocins of lactic acid bacteria (Food science and Technology), San Diego, California: Academic Press, INC 265. p.
- MOUBARECK C., GAVINI F., VAUGIEN L., BUTEL M. J., DOUCET-POPULAIRE F. (2005): Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (1) 38-44. p.
- MUSSATTO S.I., MANCILHA I.M. (2007): Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68 (3) 587-597. p.
- NAGY F. (1998): A vastagbél. 255-363. p. In: VARRÓ V. (szerk.): *Gastroenterologia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 727. p.
- NAGY-GASZTONYI M, BIEKMAN E, KREBBERS B. (2002): Working up a lactofermented vegetable product. *Acta Alimentaria*; 31 (4) 407-12.
- NEESER J.-R., GERMAN J.B. (2004): Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals. New York: Marcel Dekker, Inc., 611. p.
- NES I.F., DIEP D. B., HAVARSTEIN L.S., BRURBERG M.B., EIJSINK V., HOLO H. (1996): Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70 (2-4) 113-128. p.
- NILSSON L., CHEN Y., CHIKINDAS M.L., HUSS H. H., GRAM L., MONTVILLE T.J. (2000): Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2) 769-774. p.
- NOBAEK S., JOHANSSON M.L., MOLIN G. (2000): Alteration of intestinal microflora associated with reduction in abdominal bloating and pain in the patients with irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology*, 95 (5) 1231-1238. p.

- NÓGRÁDY N., BARROW, P.A., NAGY B. (2000): A baktériumok „quorum sensing” szignálmechanizmusa. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2000/11, www.univet.hu/mal/2000/11m.htm, 2008.02.11.
- O'BRIEN J., MORRISSEY P.A. (1989): Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28 (3) 211-248. p.
- O'RIORDAN K., FITZGERALD G.F. (1998): Evaluation of bifidobacteria for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 85 (1) 103-114. p.
- O'SULLIVAN D.J., KULLEN M.J. (1998): Tracking of probiotic Bifidobacteria in the intestine. *International Dairy Journal*, 8 (5-6) 513-525. p.
- OP DEN CAMP H.J.M., OSTERHOF A., VEERKAMP J.H. (1985): Interaction of bifidobacterial lipoteichoic acids with human intestinal cells. *Infection and Immunity*, 47 (1) 332-334. p.
- OUWEHAND A.C., ISOLAURI E., KIRJAVAINEN P.V., TÖLKKÖ S., SALMINEN S.J. (1999): The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 is increased in the presence of *Lactobacillus* GG and *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology*, 30 (1) 10-13. p.
- OUWEHAND A.C., SALMINEN S.J. (1998): The health effect of viable and non-viable cultured milks. *International Dairy Journal*, 8 (9) 749-758. p.
- OUWEHAND A.C., SALMINEN S. (2003): Safety evaluation of probiotics. 317-336. p. In: MATTILA-SANDHOLM T., SAARELA M. (Eds): *Functional dairy products*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC 395. p.
- OUWEHAND A.C., SALMINEN S., ISOLAURI E. (2002): Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82 (1-4) 279-289. p.
- OUWEHAND A.C., SALMINEN S., ROBERTS P.J., OVASKA J., SALMINEN E. (2003): Disease-dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10 (4) 643-646. p.
- OUWEHAND A.C., TÖLKKÖ S., KULMALA J., SALMINEN S., SALMINEN E. (2000): Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 31 (1) 82-86. p.
- OUWEHAND A.C., TÖLKKÖ S., SALMINEN S. (2001): The effect of digestive enzymes on the adhesion of probiotic bacteria *in vitro*. *Journal of Food Science*, 66 (6) 856-859. p.
- PARK H.K., SO J.S., HEO T.R. (1995): Acid adaptation promotes survival of *Bifidobacterium breve* against environmental stress. *Foods and Biotechnology*, 4 (4) 226-230. p.
- PARKER R.B. (1974): Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29 (1) 4-8. p.
- PELTO L., ISOLAURI E., LILIUS E. M., NUUTILA J., SALMINEN S. (1998): Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clinical and Experimental Allergy*, 28(12) 1474-1479. p.
- PERDIGÓN G., LOCASCIO M., MEDICI M., HOLGADO A.P.R., OLIVER G. (2003): Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. *Biocell*, 27 (1) 1-9. p.
- PÉREZ P.F., MINNAARD Y., DISALVO E.A., DE ANTONI G.L. (1998): Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (1) 21-26. p.
- POL I.E., MASTWIJK H.C., BARTELS P.V., SMID E.J. (2000): Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1) 428-430. p.
- POOL-ZOBEL B.L., NEUDECKER C., DOMIZLAFF I., JI S., SCHILLINGER U., RUMNEY C., MORETTI M., VILARINI I., SCASSELLATI-SFORZOLINI R., ROWLAND I. (1996): *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutrition and Cancer*, 26 (3) 365-380. p.

- PRADO F.C., PARADA J.L., PANDEY A., SOCCOL C.R. (2008): Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41 (2) 111-123. p.
- RAKIN M., VUKASINOVIC M., SILER-MARINKOVIC S., MAKSIMOVIC M. (2007): Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. *Food Chemistry*, 100 (2) 599-602. p.
- RASTALL R.A., FULLER R., GASKINS H.R., GIBSON G.R. (2000): Colonic functional foods. 71-95. p. In: GIBSON G. R., WILLIAMS C. M. (Eds.): *Functional food. Concept to product*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC 374. p.
- RAUCH P.J., DE VOS W.M. (1992): Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 174 (4) 1280-1287. p.
- RAUTAVA S., KALLIOMÄKI M., ISOLAURI E. (2005): New therapeutic strategy for combating the increasing burden of allergic disease: Probiotics – A nutrition, allergy, mucosal immunology and intestinal microbiota (NAMI) research group report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116 (1) 31-37 p.
- REYNOLDS P.E. (1989): Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8 (11) 943-950. p.
- RIEDEL C.U., FOATA F., GOLDSTEIN D.R., BLUM S., EIKMANN B.J. (2006): Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells – adhesion and impact on expression profiles. *International Journal of Food Microbiology*, 110 (1) 62-68. p.
- RILEY M.A., WERTZ J.E. (2002): Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*. 84 (5-6) 357-364. p.
- ROBERFROID M.B. (1999/a): What makes food functional? Volume 1, 3-10. p. In: *Proceedings of the Euro Food Chem X. Functional Foods – A New Challenge for the Food Chemist*. Budapest
- ROBERFROID M.B. (1999/b): Caloric value of inulin and oligofructose. *The Journal of Nutrition*, 129 (7) (Supplement) S1436-S1437. p.
- ROBERFROID M.B. (2000): Defining functional foods. 9-27. p. In: GIBSON G. R., WILLIAMS C. M. (Eds.): *Functional food. Concept to product*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC 374. p.
- ROSS R.P., DESMOND C., FITZGERALD G.F., STANTON C. (2005): Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (6) 1410-1417. p.
- ROY D., CHEVALIER P., WARD P., SAVOIE L. (1991): Sugars fermented by *Bifidobacterium infantis* ATCC 27920 in relation to growth and α -galactosidase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34 (5) 653-655. p.
- RYCROFT C.E., JONES M.R., GIBSON G.R., RASTALL R.A. (2001): A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (5) 878-887. p.
- SAARELA M., LÄHTEENMÄKI L., CRITTENDEN R., SALMINEN S., MATTILA-SANDHOLM T. (2002/a): Gut bacteria and health foods – the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78 (1-2) 99-117. p.
- SAARELA M., MATTÖ J., SANDHOLM M. T. (2002/b): Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotics products. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14 (4) 233-240. p.
- SAARELA M., MOGENSEN G., FONDÉN R., MÄTTÖ J., MATTILA-SANDHOLM T. (2000): Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84 (3) 197-215. p.
- SAAVEDRA J.M., BAUMAN N.A., OUNG I., PERMAN J.A., YOLKEN R.H. (1994): Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet*, 344 (8929) 1046-1049. p.
- SALMINEN S. (1996): Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutrition Newsletter* 5 16-18. p.

- SALMINEN S., OUWEHAND A.C., ISOLAURI E. (1998/a): Clinical application of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8 (5-6) 563-572. p.
- SALMINEN S., VON WRIGHT A., MORELLI L., MARTEAU P., BRASSART D., DE VOS W., FONDÉN R., SAXELIN M., COLLINS K., MOGENSEN G., BIRKELAND S-E., MATTILA-SANDHOLM T. (1998/b): Demonstration of safety of probiotics – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44 (1-2) 93-106. p.
- SALMINEN S., BOULEY C., BOUTRON-RUAULT M.C., CUMMINGS J.H., FRANCK A., GIBSON G.R., ISOLAURI E., MOREAU M.C., ROBERFROID M., ROWLAND I. (1998/c): Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80 (Supplement 1) S147-S171. p.
- SANDERS M.E. (1998): Overview on functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8 (5-6) 341-347 p.
- SAVARD T., GARDNER N., CHAMPAGNE C.P. (2003): Growth of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cultures in a vegetable juice medium, and their stability during storage in a fermented vegetable juice. *Sciences des Aliments*, 23 (2) 273-283. p.
- SAXELIN M., CHUANG N.H., CHASSY B., RAUTELIN H., MÄKELÄ P.H., SALMINEN S., GORBACH S.L. (1996): Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. *Clinical Infectious Diseases*, 22 (3) 564-566. p.
- SCARDOVI, V. (1981): The Genus *Bifidobacterium*. In: *The Prokaryotes Vol 2* eds. Starr MP, Stolp H et.al., Springer-Verlag, New York:1951-1961. p.
- SCHAAFSMA G. (1996): State of art concerning probiotic strains in milk products *IDF Nutrition Newsletter*, 5 23-24. p.
- SCHIFFRIN E.J., ROCHAT F., LINK-AMSTER H., AESCHLIMANN J.M., DONNET-HUGHES A. (1995): Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 78 (3) 491-497. p.
- SCHNELL N., ENTIAN K.D., SCHNEIDER U., GÖTZ F., ZAHNER H., KELLNER R., JUNG G. (1988): Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide rings. *Nature*, 333 (6170) 276-278. p.
- SCHOLZ-AHRENS K.E., SCHAAFSMA G., VAN DEN HEUVEL E.G.H.M., SCHREZENMEIR J. (2001): Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Society for Clinical Nutrition*, 73 (2) Supplement 459S-464S. p.
- SERVIN A L., COCONNIER M-H. (2003): Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (5) 741-754. p.
- SERVIN A.L. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (4) 405-440. p.
- SGORBATI B., BIAVATI B., PALENZONA D. (1995): The genus *Bifidobacterium*. 279-306. p. In: WOOD B. J. B., HOLZAPFEL W. H. (Eds.): *The genera of lactic acid bacteria*, Volume 2. Glasgow, England, Blackie Academic & Professional, 398. p.
- SHAH N.P. (2000): Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83 (4) 894-907. p.
- SHAH N.P. (2007): Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17 (11) 1262-1277. p.
- SHIMAMURA S., ABE F., ISHIBASHI N., MIYAKAWA H., YAESHIMA T., ARAYA T., TOMITA M. (1992): Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *Journal of Dairy Science*, 72 (12) 3296-3306. p.
- SHU Q., GILL H.S. (2001): A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Medical Microbiology and Immunology* (Berlin), 189 (3) 147-152. p.

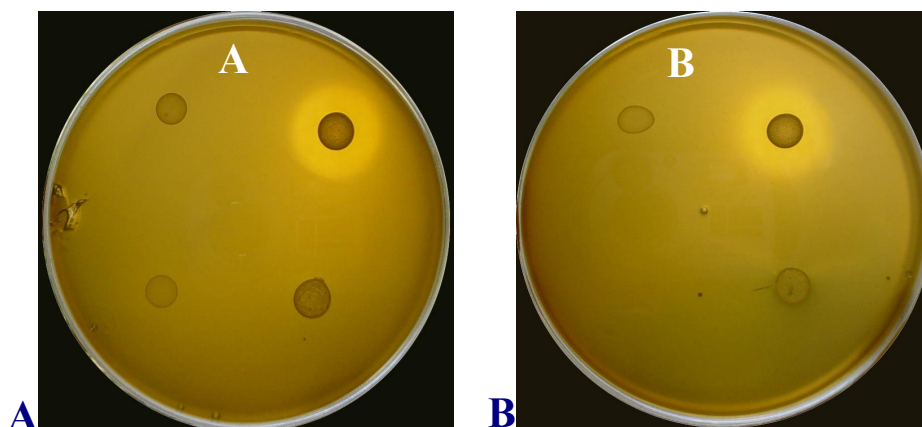
- SHU Q., LIN H., RUTHERFURD K.J., FENWICK S.G., PRASAD J., GOPAL P.K., GILL H.S. (2000): Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiology and Immunology*, 44 (4) 213-222. p.
- SIEBER R., BUTIKOFER U., BOSSET J.O. (1995): Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *International Dairy Journal*, 5 (3) 227-246. p.
- SIMPSON P.J., ROSS R.P., FITZGERALD G.F., STANTON C. (2004): *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (2) 401-406. p.
- SIMPSON P.J., STANTON C., FITZGERALD G.F., ROSS R.P. (2005): Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (3) 493-501. p.
- SLAČANAC V., HARDI J., PAVLOVIĆ H., ČURZIK D., LUČAN M. (2007): Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* by goat's and cow's milk fermented with *Bifidobacterium longum* BB-46. *Acta Alimentaria*, 36 (2) 163-172. p.
- SOMOS A. (1983): Zöldségtermesztés. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 516. p.
- SPENCE J.T. (2006): Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (Supplement 1) S4-S6 p.
- STANTON C., GARDINER G., MEEHAN H., COLLINS K., FITZGERALD G., LYNCH P.B., ROSS R.P. (2001): Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2) 476-483 p.
- STEWART-TULL D.E.S. (1980): The immunological activities of bacterial peptidoglycans. *Annual Reviews in Microbiology*, 34 (1) 311-340. p.
- SULTANA, K., GODWARD, G., REYNOLDA, N. ARUMUGASWAMY, R. PEIRIS, P., KAILASAPATHY, K. (2000): Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 62 (1-2) 47-55. p.
- SUMMA C., MCCOURT J., CÄMMERER B., FIALA A., PROBST M., KUN S., ANKLAM E., WAGNER K-H. (2008): Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effect of cocoa bean Maillard reaction products with degree of roasting. *Molecular Nutrition of Food Research*, 52 (3) 342-351. p.
- SZABÓ I. (2001): Gyökérszöldségfélék. Budapest: Szaktudás Kiadó Ház. 119. p.
- SZEKÉR K., BECZNER J., HALÁSZ A., MAYER Á., REZESSY-SZABÓ J.M. (2005): *In vitro* adhesion of lactic acid bacteria and bifidobacteria to Caco-2 P and IEC-18 cells. *Acta Alimentaria*, 34 (1) 91-99. p.
- SZEKÉR K., CSIBRIK-NÉMETH E., KUN SZ., BECZNER J., GÁLFI P. (2007): Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells-evaluation of different detection methods. *Acta Alimentaria*, 36 (4) 365-371. p.
- TAHRI K., CROCIANI J., BALLONGUE J., SCHNEIDER F. (1995): Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 21 (3) 149-151. p.
- TALWALKAR A., KAILASAPATHY K. (2003): Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science*, 86 (8) 2537-2546. p.
- TALWALKAR A., KAILASAPATHY K. (2004): The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5 (1) 1-8. p.
- TALWALKAR A., KAILASAPATHY K., PEIRIS P., ARUMUGASWAMY R. (2001): Application of RBGR – a simple way for screening of oxygen tolerance in probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71 (2-3) 245-248. p.
- TAMINE A.Y., MARSHALL V.M., ROBINSON R.K. (1995): Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 62 (1) 151-187. p.

- TARANTO M.P., MEDICI M., PERDIGON G., RUIZ-HOLGADO A.P., VALDEZ G.F. (1998): Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypocholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science*, 81 (9) 2336-2340. p.
- TEMMERMAN R., POT B., HUYS G., SWINGS J. (2002): Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* 81 (1) 1-10. p.
- TEO A.Y.-L., RAVISHANKAR S., SIZER C.E. (2001): Effect of low-temperature, high-pressure treatment on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in unpasteurized fruit juices. *Journal of Food Protection* 64 (8) 1122-1127. p.
- TOURÉ R., KHEADR E., LACROIX C., MORONI O., FLISS I. (2003): Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (5) 1058-1069. p.
- TREJO F.M., MINNAARD J., PEREZ P.F., DE ANTONI G.L. (2006): Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants. *Anaerobe*, 12 (4) 186-193. p.
- TRINDADE M.I., ABRATT V.R., REID S. (2003): Induction of sucrose utilization genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1) 24-32. p.
- TULASSAY T. (2004): Megelőzhető-e a civilizációs betegségek? www.mindentudas.hu/doc/tulassay, 2008.01.17.
- TUOHY K.M., PROBERT H.M., SMEJKAL CH.W., GIBSON G.R. (2003): Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8 (15) 692-700. p.
- TUOMOLA E.M., SALMINEN S.J. (1998): Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strain to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41 (1) 45-51. p.
- TYNKKYNNEN S., SINGH K. V., VARMANEN P. (1998): Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *International Journal of Food Microbiology*, 41 (3) 195-204. p.
- UMESAKI Y., SETOYAMA H., MATSUMOTO S., OKADA Y. (1993): Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ free mice and its independence from thymus. *Immunology*, 79 (1) 32-37. p.
- URALA N., LÄHTEENMÄKI L. (2007): Consumers' changing attitudes towards functional foods. *Food Quality and Preference*, 18 (1) 1-12. p.
- VAGNARELLI P., SARIO A.D., CUZZONI M.T., MAZZA P., CARLI L.D. (1991): Cytotoxicity and clastogenic activity of ribose-lysine browning model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (12), 2237-2239. p.
- VALIO (2006): Evolus® fermented milk drink. Functional products. www.valio.fi, 2007.11.17
- VAN KRANENBURG R., KLEEREBEZEM M., VAN HYLCKAMA Vlieg J., URSING B.M., BOEKHORST J., SMIT B. A., AYAD E.H., SMIT G., SIEZEN R. J. (2002): Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12 (2-3) 111-121. p.
- VAN OPSTAL I., VANMUYSEN S.C.M., WUYTACK E.Y., MASSCHLACK B., MICHIELS C.W. (2005): Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International Journal of Food Microbiology*, 98 179-191. p.
- VANDENBERGH P.A. (1993): Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3) 221-238. p.
- VENTLING B.L., MISTRY V.V. (1993): Growth characteristics of bifidobacteria in ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science*, 76 (4) 962-971. p.
- VENTURA M., VAN SINDEREN D., FITZGERALD G.F., ZINK R. (2004): Insight into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86 (3) 205-223. p.

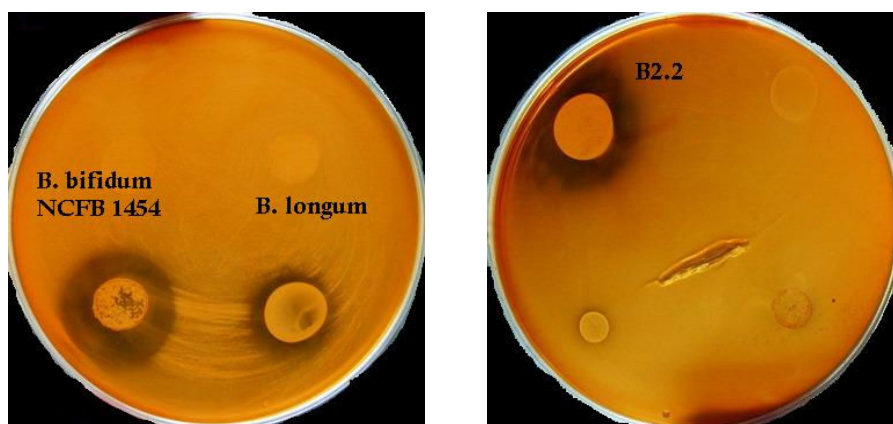
- VERBEKE W. (2005): Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference*, 16 (1) 45-47 p.
- VERECZKEY G., GASZTONYI M., BIACS Á. P. (1997): A tejsavasán fermentált zöldséglevelek előállítására. *Élelmiszeripar*. 51 (6): 180-182. p.
- VESTERLUND S., PALTTA J., KARP M., OUWEHAND A.C. (2005/a): Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Research in Microbiology*, 156 (2) 238-244. p.
- VESTERLUND S., PALTTA J., KARP M., OUWEHAND A.C. (2005/b): Measurement of bacterial adhesion – in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60 (2) 225-233. p.
- VINDEROLA C.G., MOCCHIUTTI P., REINHEIMER J.A. (2002): Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85 (4) 721-729. p.
- VINDEROLA C.G., PROSELLO W., GHIBERTO D., REINHEIMER J. A. (2000): Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83 (9) 1905-1911. p.
- VON WRIGHT A., VILPPONEN-SALMELA T., LLOPIS M.P., COLLINS K., KIELY B., SHANAHAN F., DUNNE C. (2002): The survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patients with ulcerative colitis. *International Dairy Journal*, 12 (2-3) 197-200. p.
- WADSTROM T., ANDERSSON K., SYDOW M., AXELSSON L., LINDGREN S., GULLMAR B. (1987): Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 62 (6) 513-520. p.
- WAGNER K-H., DERKITS S., HERR M., SCHUH W., ELMADFA I. (2002): Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model. *Food Chemistry*, 78 (3) 375-382. p.
- WAGNER R.D., BALISH E. (1998): Potential hazards of probiotic bacteria for immunodeficient patients. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 96 (6) 165-170. p.
- WANG K.Y., LI C.S., PERNG D.S., SU Y.C., WU D.C., JAN C.M., WANG T.N., WANG W.M. (2004): Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (3) 737-741. p.
- WARD P., ROY D. (2005): Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait*, 85 (1-2) 23-32. p.
- YAMAZAKI S., MACHII K., TSUYUKI S., MOMOSE H., KAWASHIMA T., UEDA K. (1985): Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunology*, 56 (1) 43-50. p.
- YEN G.C., CHAU C.F., LII D.J. (1993): Isolation and characterization of most antimutagenic Maillard reaction products derived from xylose and lysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (5) 771-776. p.
- YILDIRIM Z., JOHNSON M.G. (1998): Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*, 61 (1) 47-51. p.
- YILDIRIM Z., WINTERS D.K., JOHNSON M.G. (1999): Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (1) 45-54. p.
- YOON K.Y., WOODAMS E.E., HANG Y.D. (2004): Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology*, 42 (4) 315-318. p.
- YOON K.Y., WOODAMS E.E., HANG Y.D. (2005): Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 38 (1) 73-75. p.
- YOON K.Y., WOODAMS E.E., HANG Y.D. (2006): Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97 (12) 1427-1430. p.

- ZALÁN ZS., NÉMETH E., BARÁTH Á., HALÁSZ A. (2005): Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (3), 219-225. p.
- ZHONG S-S., ZHANG Z-S., WANG J-D., LAI Z-S., WANG Q-Y., PAN L-J., REN Y-X. (2004): Competitive inhibition of adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* to intestinal epithelial cell line Lovo by purified adhesin of *Bifidobacterium adolescentis* 1027. *World Journal of Gastroenterology*, 10 (11) 1630-1633. p.
- ZHOU J. S., PILIDGE C. J., GOPAL P. K., GILL H. S. (2005): Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98 (2) 211-217. p.

ANTIMIKROBÁS HATÁS KIMUTATÁSÁNAK DOKUMENTÁLÁSA

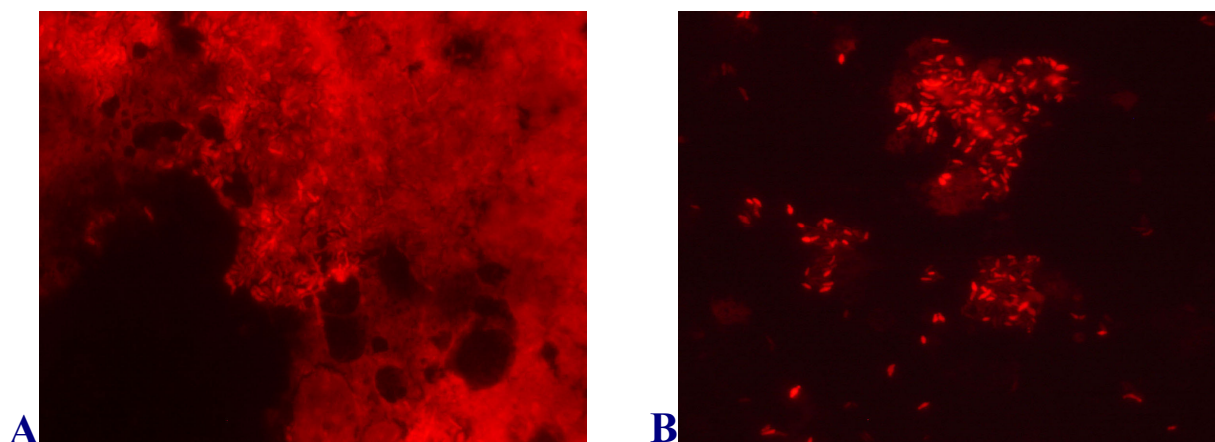


I/a. ábra: A *B. longum* A4.8 törzs antimikrobás aktivitása *E. coli* O157:H7 (A) és *Listeria monocytogenes* 4ab (B) törzsszel szemben



I/b ábra: Bifidobaktériumok *E. coli* O157:H7 törzsszel szemben kifejtett antimikrobás aktivitása

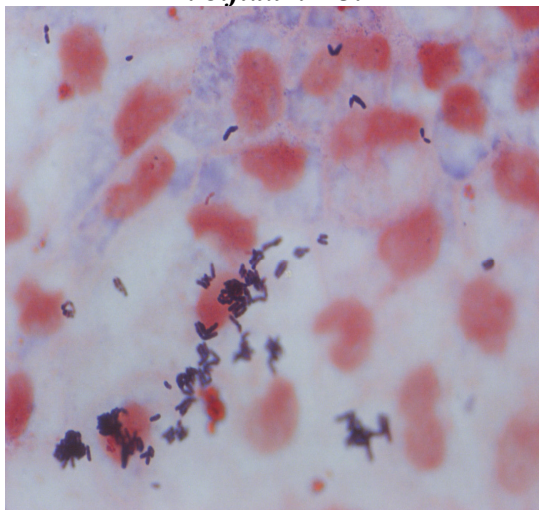
TAPADÁSI VIZSGÁLATOK DOKUMENTÁCIÓJA



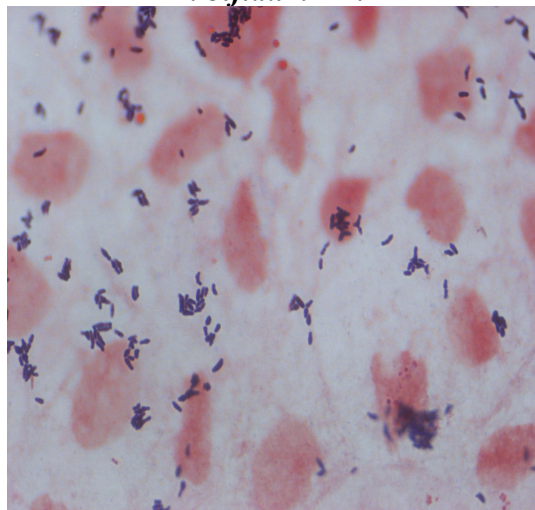
II. ábra *B. bifidum* B3.2 törzs festődése hexidim-jodidos festéssel (1000x nagyítás)
A: Caco-2 sejtek is megfestődtek, baktériumok nehezen elkülöníthetők (beleolvadnak a háttérbe)

B: A baktériumok nagy része jól megfestődött, elkülöníthető és a Caco-2 sejtek nem zavarják az értékelést

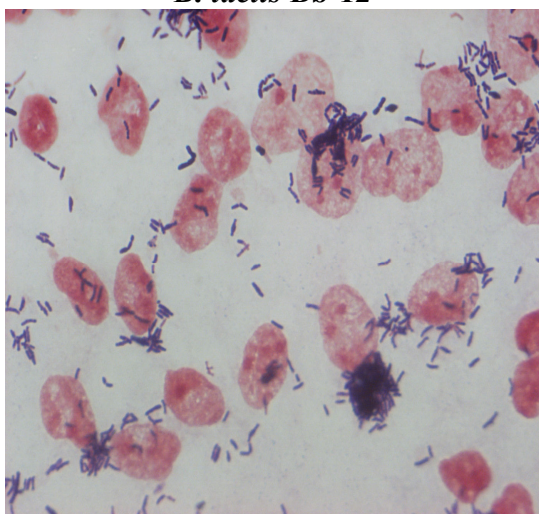
B. bifidum B3.2



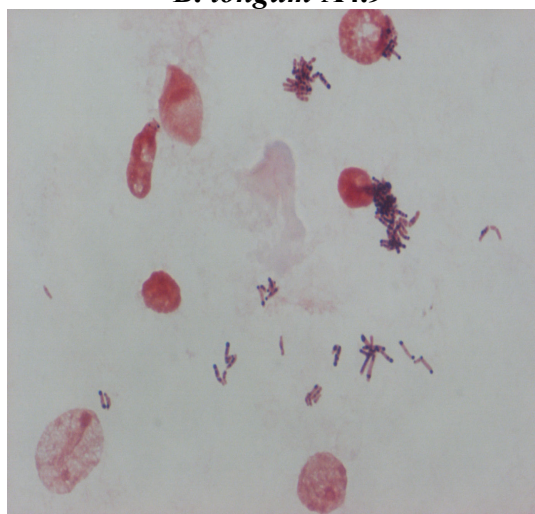
B. bifidum B7.1



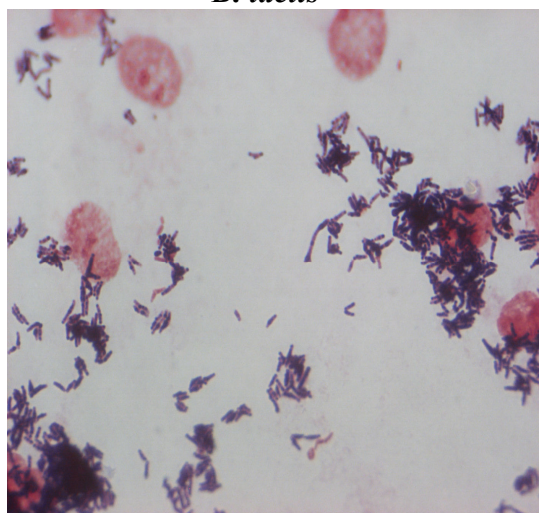
B. lactis Bb-12



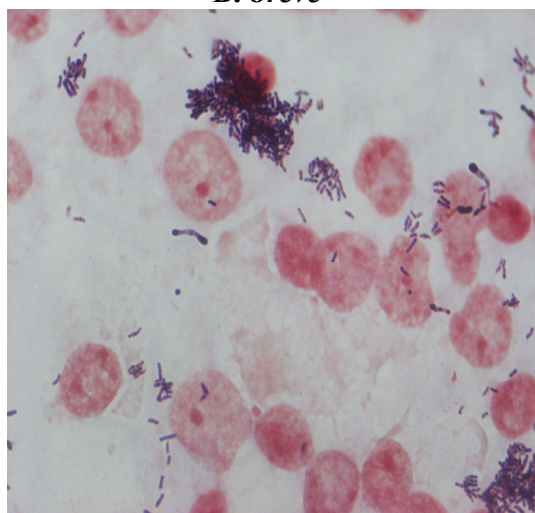
B. longum A4.9



B. lactis^T

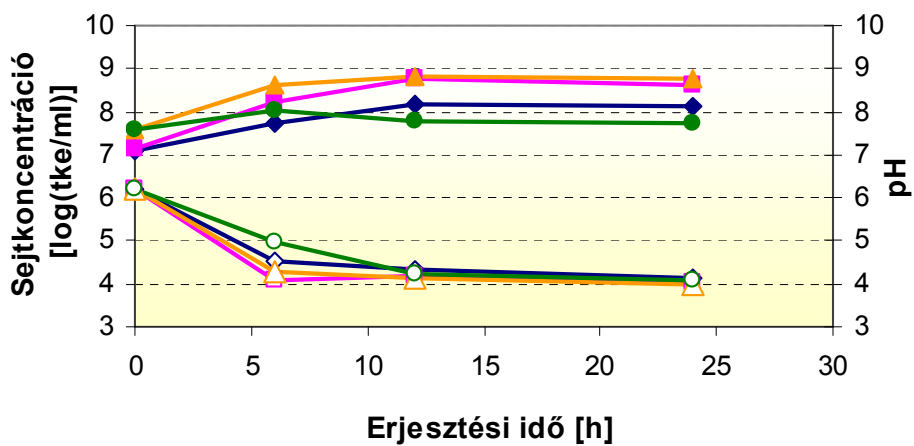
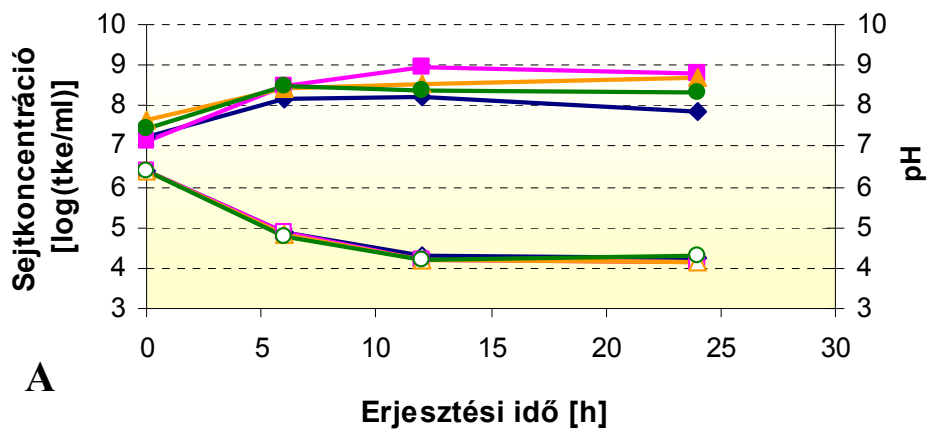


B. breve^T



III. ábra Bifidobaktériumok tapadása Caco-2 sejtvonalhoz (Gram-festés, 1000x nagyítás)

BIFIDOBAKTÉRIUMOK SZAPORODÁSA PASZTÓRÖZÖTT ÉS HHP KEZELT RÉPALEVEKBEN



Teli jelölők: sejtkoncentrációk; Üres jelölők: pH értékek

IV. ábra Bifidobaktériumokkal erjesztett pasztőrözött (A) és a HHP kezelt (B) sárgarépa-levek sejtkoncentrációjának és pH-jának változása

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Hoschke Ágoston egyetemi tanárnak, hogy minden lehetséges eszközzel támogatta a kutatómunkám elvégzését.

Külön köszönettel tartozom Rezessyné dr. Szabó Juditnak, hogy időt és fáradságot nem kímélve segítette munkámat. Szakmai tanácsai és tapasztalatai nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy az elem kerülő nehézségeket leküzdjem és elkészítsem a doktori dolgozatomat.

Köszönettel tartozom a Sör- és Szeszipari Tanszék munkatársainak, hogy önzetlen segítségükkel és tanácsaikkal támogatták a kutatásaimat, valamint kellemes és családias légkört teremtettek, ahol jól lehetett dolgozni. Külön köszönöm szobatársamnak Dr. Nguyen Duc Quangnak, hogy segített a kísérletek technikai megvalósításában és az analitikai vizsgálatok elkészítésében.

Köszönöm Dr. Gálfi Péternek a SZIE Állatorvostudományi Kar egyetemi tanárának, valamint Szekér Krisztinának és Csibrikné Németh Edinának, hogy rengeteg segítséget nyújtottak a tapadási vizsgálatok elvégzésében.

Köszönöm hallgatóimnak, Kaldenecker Krisztinának, Nagy Zitának, Bihari Editnek, Sasvári Ágnesnek, Vizi Tímeának és Németh Szilviának, hogy az általuk elvégzett munkával hozzájárultak a dolgozatom eredményeinek megszületéséhez.

Külön köszönettel tartozom Dalmadi Istvánnak a nagy hidrosztatikus nyomású kezelések elvégzéséért.

Köszönetet szeretnék mondani Ibrahim Elmadfa és Karl-Heinz Wagner professzoroknak, hogy lehetővé tették a Maillard-reakció termékekkel kapcsolatos vizsgálataimat.

Köszönettel tartozom Dr. Daood Hussein és Dr. Hajós Gyöngyi[†] segítségéért az analitikai és a gélelektroforézises vizsgálatok elvégzésében.

Köszönöm Édesapám és Édesanyám biztatását és támogatását a doktori tanulmányaim során.

Köszönöm páromnak, Farkas Gabriellának biztatását, türelmét és nélkülözhetetlen segítségét a dolgozatom elkészítésében.