

# KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSA EGYES LAKTOBACILLUSOK BIOGÉN AMIN ÉS BAKTERIOCIN SZINTÉZISÉRE

## A kutató munka célja:

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

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

A fentiek értelmében a kutatómunka programja a következő volt:

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

## **EREDMÉNYEK**

### A tápközeg összetétel hatása autentikus tejsavbaktériumok szaporodására

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

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

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

A növényi alapú táplevek: 10% porított szárítmány + 90 % fiziológiás sóoldat (0,9% NaCl) → sterilizálás autoklávban, 121<sup>0</sup>C, 15 perc.

Növesztési körülmények: MRS táplevesen való 24 órás előszaporítás után a steril növényi szubsztrátumra oltottuk a tejsavbaktérium szuszpenzióját úgy, hogy az indulási sejtkoncentráció 10<sup>6</sup> MPN/mL legyen. Ezt követően 30<sup>0</sup>C-on 72 órát inkubáltuk.

2. táblázat: Növényi szubsztrátumon elérhető sejtkoncentráció

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

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

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

### Mikroba gátló hatás tápközeg függése

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

A vizsgálat menete: 1,5%-os nutrient agart öntöttünk petri csészékbe, majd megdermedés után 7 mm átmérőjű kutakba fúrtunk a gélbe. A baktériumtenyészet centrifugálása után a felülúszó pH-ját 6,8-ra állítottuk a savak gátló hatásának kiküszöbölése érdekében, majd sejtmentesre szűrtük. A szűrletből 3x150 µl-t pipettáztunk a kutakba. A pipettázások között a lemezeket 50°C-on inkubáltuk, melynek során az anyag bediffundált a gélbe. Öt ml felolvasztott BHI lágyagarba (0,7%) belekevertünk 0,5 ml cca 10<sup>5</sup> sejt/ml csíraszámú tesztorganizmust és óvatosan a nutrient agar tetejére öntöttük. Megdermedés után a lemezeket 30°C-on inkubáltuk 24 órán át. A feltisztulási zónákat vizuálisan értékeltük.

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

3. táblázat: Az antibakteriális aktivitás tápközeg összetétel függése

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. táblázat: *Fusarium* törzsek gátlása LAB törzsekkel

**a) Agar – diffúziós módszer**

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

**b) Agar - diffúziós módszer - felülúszó**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Biogén amin képzés

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

A táptalaj összetétele a következő: tripton, 0,5 %, élesztő extrakt, 0,5 %, NaCl, 0,5 %, glükóz, 0,1 %, Tween 80<sup>®</sup>, 0,05%, MgSO<sub>4</sub>, 0,02 %, MnSO<sub>4</sub>, 0,005 %, FeSO<sub>4</sub>, 0,004 %, CaCO<sub>3</sub>, 0,01 %, aminosav, 2,0 %, brómkrezol bíbor, 0,006 %, agar, 2,0 %, pH=5,0.

A vizsgálat menete: a táptalaj 15 ml-ét petri csészébe öntöttük, szilárdulás után a vizsgálandó törzs előszaporított szuszpenzióját a táptalaj felületére cseppentettük, majd 30<sup>0</sup>C-on, 24-48 órát inkubáltuk. A kinövő telep körüli rózsaszín gyűrű (indikátor színváltozás) dekarboxiláz-pozitív baktériumot jelölt.

9. táblázat: Néhány tejsavbaktérium aminosav dekarboxiláz aktivitása

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

HDC - hisztidin dekarboxiláz

ODC - ornitin dekarboxiláz

LDC - lizin dekarboxiláz

TDC - tiramin dekarboxiláz

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



10. táblázat: Laktobacillus törzsek biogén aminosav termelése MRS tápoldaton való szaporítás során

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

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

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

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

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

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

### A tápközeg összetétel hatása a LAB törzsek hisztamin termelésére

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

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

Az előkészített minták hisztamin tartalmát kompetitív ELISA teszttel (RIDASCREEN® Hisztamin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Németország) határoztuk meg, a teszt kitéhez mellékelt protokoll szerint. A meghatározás antigén-antitest reakción alapszik. A mikrotiter lyukak hisztaminnal borítottak. Az anti hisztamin antitestek, a standardok, valamint a vizsgálandó oldatok lyukakba való pipettázásával a szabad és immobilizált hisztamin között versengés indul meg az antitest kötőhelyekért. Mosási lépést követően peroxidázzal jelzett antitesteket adagolunk a lyukakba, amelyek kötődnek az antitest-hisztamin komplexekhez, a kötetlen enzim konjugátum eltávolítása mosással történik. Enzim szubsztrátum és kromogén adagolása után az előírt inkubációs idő alatt a kötött enzim konjugátum a színtelen kromogént kékszínűvé alakítja. Végül a reakció leállításához használt 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldat hatására a kék színeződé sárgára változik, amelynek színintenzitását 450 nm hullámhosszon

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

Ezeket az eredményeket foglaltuk össze a 12. táblázatban.

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

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

Kontrol – beoltatlan tápközeg, TJ – tomato juice

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

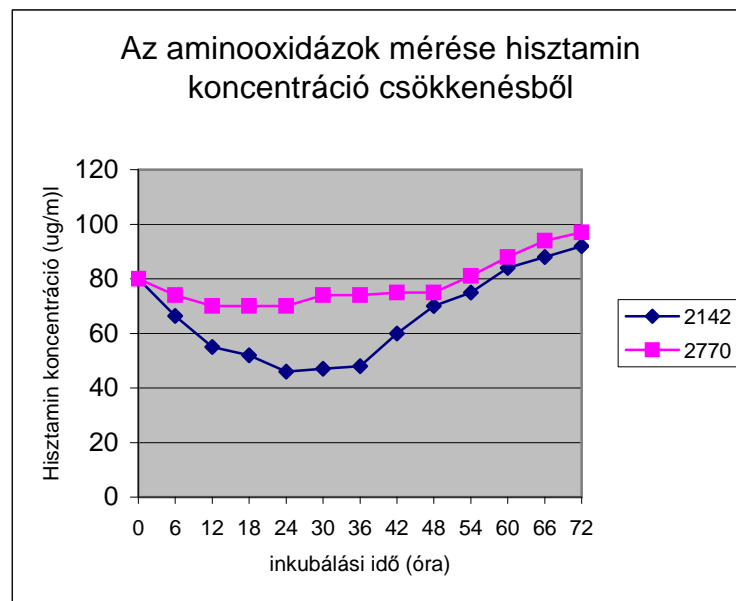
Az MRS tápközegnek már 0,1 % hisztidinnel való kiegészítése is a hisztamin képzést növelte. Ehhez viszonyítva a 0,5 és 1,0 % hisztidin hozzáadás az elérhető maximális hisztamin koncentrációra nem volt hatással, de a maximum érték időben előbb következett be.

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

#### Aminoxidázok vizsgálata

A hisztamin metabolizmusa monoamino- és diaminoxidáz enzimekkel (MAO és DAO) megy végbe. Ezeknek az enzimeknek a működését indirekt úton, a tápközeghez adagolt hisztamin mennyiségének fogyásával követtük. A tápközeg (MRS) hisztaminnal úgy egészítettük ki, hogy a végkoncentráció 80 µg/ml legyen, ezt követően oltottuk rá a vizsgálni kívánt törzseket (1% oltóanyag koncentrációval), majd 30<sup>0</sup>C-on 72 órán át inkubáltuk. A

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



### **Proteináz aktivitás**

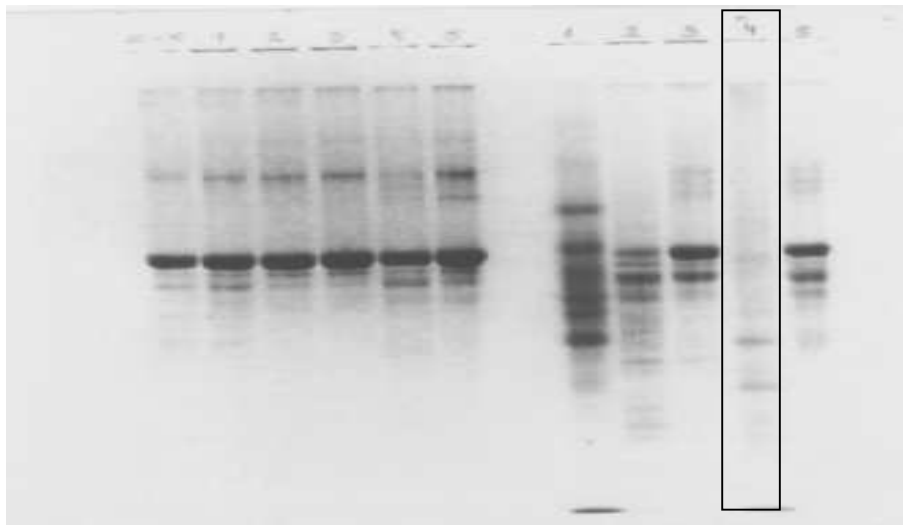
A maximális aminoszavak koncentráció már 24 órás inkubálás után beáll mind MRS, mind pepton + élesztőkivonat tápközegen, ugyanakkor a proteáz aktivitás további jelentős növekedést mutatott.

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

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

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

2. ábra:  $\alpha$ -kazein emésztése LAB proteínázokkal.



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

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

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

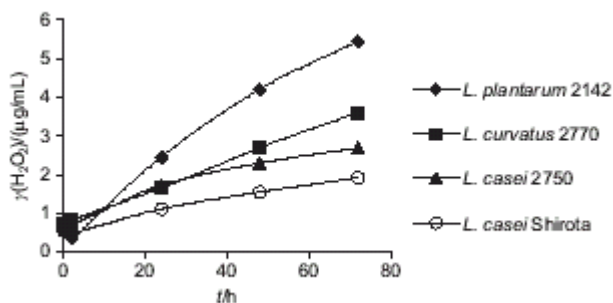
### Hidrogén peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) termelés

A tejsavbaktériumok által termelt  $\text{H}_2\text{O}_2$  antimikrobiális szempontból előnyös, de nagyobb koncentrációban a termelő sejtet valamint a humán bélhámsejteket is károsíthatja. Kutatásaink során az egyes tejsavbaktériumok  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelését vizsgáltuk a szubsztrátum függvényében. A baktérium sejteket de Man Rogosa Sharpe (MRS), paradicsomlé (TJ), csicsóka és cékla alapú szubsztrátumon szaporítottuk. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  szintézist 24 órás sejtekkel határoztuk meg, melyeket a táplétól centrifugálással elkülönítve kétszeres steril foszfát pufferes mosást (1M, pH 6.5) követően, foszfát pufferbe szuszpendáltunk és 5 °C-on inkubálva 0, 2, 24, 48 és 72 óra után határoztuk meg a hidrogén peroxid koncentrációt (részletesen Zalán et al. 2005). A négy vizsgált törzs között szignifikáns különbséget tapasztaltunk  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésben minden vizsgált tápközeg esetén. A legnagyobb  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációt az *L. plantarum* 2142 képezte

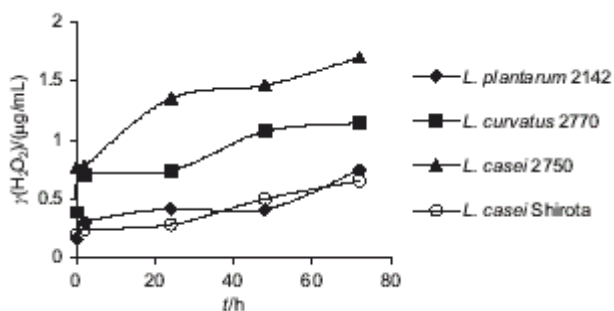
MRS táptalajon (72 óra után 5.5 µg/ml), míg TJ táptalajon az *L. casei* 2750 (72 óra után 1.7 µg/ml). A hidrogén peroxid szintézis és a képződő H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tehát jól láthatóan törzs és szubsztrátfüggő, de *L. casei* Shirota minden esetben 0.5 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alatti szintet eredményezett. Valamennyi általunk vizsgált törzs lényegesen kisebb mennyiségben termelt hidrogén peroxidot, mint Jaroni és Brashears (2000) által *L. delbrueckii* subsp. *lactis* törzsről közölt 7.5 µg/10<sup>7</sup> CFU. Ito et al. (2003) *L. casei lactis* subsp. *lactis* A1 törzs esetén 300-380 ppm hidrogén peroxid koncentrációt mért, ami már jelentős baktericid hatással volt *Listeria*, *Yersinia* valamint *E. coli* törzsről.

Az *L. plantarum* 2142 által 24-48 h alatt termelt hidrogén peroxid *L. monocytogenes* és *B. cereus* teszt organizmusokra fejtett ki gátló hatást, de *E. coli*-val szemben nem (Zalán et al. 2005). A tejsavbaktériumok által termelt 0.0.3 mM hidrogén peroxid nem okozott sejtkárosodást *L. plantarum* 2142-re végzett vizsgálatok alapján. A laktobacillus törzsek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése és a fermentált cékla pigment összetevőinek változása a fermentáció során jó egyezést mutat, mert 2142-vel következett be a legnagyobb csökkenés a kiindulási értékekhez viszonyítva, míg *L. casei* 2750 ami csak kb. fele H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot termel jobban megőrzi a színanyagot.

3. ábra Tejsavbaktériumok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése MRS táptalajon



4. ábra Tejsavbaktériumok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése TJ táptalajon



táblázat *L. plantarum* 2142 által termelt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gátló hatása

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

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

Irodalom:

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

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

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

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

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

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