

Doktori értekezés

TEJSAVBAKTÉRIUMOK SZELEKTÁLÁSA
ROMLÁST OKOZÓ ÉLESZTŐK
SZAPORODÁSÁNAK GÁTLÁSÁRA

Zalán Zsolt

Budapest
2008.

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

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

Témavezető: Dr. Halász Anna
tudományos tanácsadó, DSc
Élelmiszer-biztonsági Főosztály
Biológiai Osztály
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

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 témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2008. június 10-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS

Tagjai

Lásztity Radomir, DSc
Mohácsiné Farkas Csilla, PhD
Incze Kálmán, CSc
Nyeste László, DSc

Opponensek

Rezessyné Szabó Judit, PhD
Sarkadi Livia, CSc

Titkár

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. A tejsavbaktériumok általános jellemzése	9
2.1.1. <i>Lactobacillus</i> -ok	9
2.2. Laktobacillusok az élelmiszerben	11
2.2.1. A kezdetek	11
2.2.2. A fermentáció	12
2.2.3. Tejsavbaktériumok a fermentációban.....	14
2.2.3.1. Laktobacillusok a zöldséglé-fermentációban	15
2.2.4. Laktobacillusok hasznos szerepe az élelmiszeriparban.....	16
2.2.5. A laktobacillusok káros élelmiszeripari tevékenysége.....	18
2.2.5.1. A laktobacillusok biogén aminosav termelése.....	18
2.2.5.2. A hisztamin.....	19
2.3. A laktobacillusok antimikrobiális termékei	20
2.3.1. Tejsav	21
2.3.2. Ecetsav	22
2.3.3. Szén-dioxid.....	23
2.3.4. Etanol.....	23
2.3.5. Hidrogén-peroxid	23
2.3.6. Diacetil	24
2.3.7. Bakteriocinek.....	24
2.3.8. Antifungális fehérjék	28
2.4. Az élesztőgombákról	29
2.4.1. Az élesztőgombák alkalmazása az élelmiszeriparban	30
2.4.2. Romlást okozó élesztőgombák	31
2.4.3. A vizsgált élesztőkről	31
2.4.3.1. <i>Candidák</i>	31
2.4.3.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	32
2.4.3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.5. Pár szóban a csicsókáról	33
3. CÉLKITŰZÉSEK	36
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	37
4.1. A kísérletben alkalmazott mikrobák	37
4.1.1. A vizsgált tejsavbaktérium törzsek.....	37
4.1.2. Vizsgált élesztőtörzsek	37
4.2. Alkalmazott táptalajok és összetételük.....	38
4.3. Alkalmazott módszerek.....	42
4.3.1. A vizsgált mikroorganizmusok szaporodásának vizsgálata	42
4.3.1.1. Telepszámlálós módszer	42
4.3.1.2. Turbiditásmérésen alapuló módszer (MEGHROUS et al. szerint (1999)).....	42
4.3.2. Sejtek által kiválasztott antimikrobiális anyagok vizsgálata	43
4.3.2.1. A tápléba kiválasztott szerves savak mérése izotachoforézissel	43
4.3.2.2. Sejtmentes felülúszó előállítás.....	44
4.3.2.3. Savval kiegészített táplevek előállítása.....	44

4.3.2.4. A savval kiegészített táplevek hatásának vizsgálata agardiffúziós módszerrel (Lyuk-teszt)	45
4.3.2.5. Hidrogén-peroxid mérése	45
4.3.2.6. Hidrogén-peroxid-tartalmú táplevek előállítása	46
4.3.2.7. A hidrogén-peroxid-tartalmú táplevek hatásának vizsgálata agardiffúziós módszerrel (Lyuk-teszt).....	46
4.3.3. Élesztőgátló hatás vizsgálata	46
4.3.3.1. Sejtek által termelt anyagok közvetlen hatásának vizsgálata (Telep-teszt).....	46
4.3.3.2. Agar puffer-hatásának vizsgálata	46
4.3.3.3. Sejtmentes, neutrális felülúszó előállítása	47
4.3.3.4. Sejtmentes, neutrális felülúszó vizsgálata agardiffúziós módszerrel (Lyuk-teszt)	47
4.3.3.5. Sejtmentes, neutrális felülúszó hatásának kimutatása turbiditás méréssel	47
4.3.4. Fehérjejellegű komponens vizsgálata	47
4.3.4.1. Fehérjejellegű gátló komponens tisztítása	47
4.3.4.2. ELEGADO és munkatársai (1997) szerint	48
4.3.4.3. YANG és munkatársai (1992) szerint	48
4.3.4.4. MEGHROUS és munkatársai (1999) szerint	48
4.3.4.5. A tisztított komponens fehérjejellegének meghatározása vékonyréteg-kromatográfiával EL-ADAWY szerint (2001).....	48
4.3.4.6. A mikroba-szaporodásgátló komponens fehérjejellegének meghatározása enzimkezeléssel	49
4.3.4.7. A mikroba-szaporodásgátló fehérjejellegű komponens molekulatömegének meghatározása gél-elektroforézissel.....	49
4.3.5. Hisztamin termelés vizsgálata	50
4.3.6. Vizsgálatok vegyes kultúra kialakításához.....	50
4.3.6.1. Kereszt-vonal módszer	50
4.3.6.2. A sejtmentes felülúszó hatása egymás termelő törzseire.....	50
4.3.7. Vegyes kultúra hatásának vizsgálata	51
4.3.8. <i>Lactobacillus</i> törzsek, felülúszók és a tisztított fehérjejellegű komponens hatásának vizsgálata élesztők szaporodására zöldséglé-modellen	51
4.3.8.1. <i>Lactobacillus</i> törzsek hatásának vizsgálata élesztők szaporodására	51
4.3.8.2. <i>Lactobacillus</i> törzsek felülúszóinak hatás-vizsgálata élesztők szaporodására	51
4.3.8.3. Vegyes kultúra és felülúszó hatásának vizsgálata	52
4.3.8.4. Tisztított fehérjejellegű komponens vizsgálata	52
5. EREDMÉNYEK.....	53
5.1. Laktobacillusok által termelt antimikrobiális anyagok meghatározása és hatásvizsgálata	53
5.1.1. Savtermelés összehasonlítása a különböző tápleveken	53
5.1.2. Savval kiegészített táplevek hatása a <i>Candida glabrata</i> szaporodására	57
5.1.3. Hidrogén-peroxid termelés a különböző tápleveken	60
5.1.4. Hidrogén-peroxid hatása a <i>Candida glabrata</i> élesztő szaporodására	61
5.2. Laktobacillusok élesztőgátló hatásának vizsgálata	62
5.2.1. A <i>Lactobacillus</i> törzsek közvetlen hatása élesztőkre	62
5.2.2. Neutrális pH-ra állított felülúszó hatása az élesztőkre	65
<i>Gátlási zóna a teszt-élesztőre</i>	66
5.2.3. Töményített, közel neutális pH-ra állított felülúszó hatása az élesztők szaporodására.....	69
5.3. Fehérjejellegű komponens vizsgálata	72
5.3.1. Fehérjejellegű komponens tisztítása.....	72
5.3.2. A tisztított komponens fehérjejellegének igazolása	74

5.3.3. A fehérjejellegű komponens enzimkezelése.....	75
5.3.3. A fehérjejellegű komponens molekulatömegének meghatározása.....	75
5.4. A <i>Lactobacillus</i> törzsek hisztamin termelése.....	77
5.5. Vizsgálatok vegyes kultúra kialakításához	79
5.5.1. Tejsavbaktériumok egymásra kifejtett közvetlen hatása	79
Törzsek	80
Törzsek	80
5.5.2. Tejsavbaktériumok felülúszóinak hatása egymás termelő törzseire.....	81
5.6. Vegyes kultúrák élesztőgátló hatásának vizsgálata	82
5.6.1. Vegyes kultúrák közvetlen hatása élesztők szaporodására.....	82
5.6.2. Vegyes kultúrák által termelt, közel neutrális pH-ra állított felülúszók hatása élesztők szaporodására	86
5.7. <i>Lactobacillus</i> törzsek és felülúszóik hatása élesztők szaporodására zöldséglé- modellen.....	88
5.7.1. <i>Lactobacillus</i> törzsek és felülúszóik egyedi hatása élesztők szaporodására zöldséglé-modellen	88
5.7.2. Kevert tenyészet és azok felülúszóinak hatása élesztők szaporodására zöldséglé- modellen	92
5.8. Tisztított, fehérjejellegű gátló anyag hatása élesztőre zöldséglé-modellen	95
5.9. Tisztított, fehérjejellegű gátló anyag hatása élesztőre, hűtvetárolás mellett, zöldséglé modellen	95
5.10. Új tudományos eredmények	97
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	98
7. ÖSSZEFOGLALÁS	100
8. SUMMARY	102
9. MELLÉKLETEK.....	103
M1. IRODALOMJEGYZÉK	103
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	121

1. BEVEZETÉS

Az emberek régi vágya, hogy a megszerzett, megtermelt táplálékát mind hosszabb ideig megtartsa fogyasztható állapotában, s e probléma a mai napig foglalkoztatja. Évszázadok hosszú során át a kezdeti tapasztalati, megfigyelésen alapuló módszerekből kiindulva fejlesztette az élelmiszer tartósítást egészen a molekuláris mikrobiológia és a besugárzásos tartósítás dimenzióiba, miközben az e témakörben szerzett tudása egyre nagyobb lett. Mindazonáltal máig megoldatlan és újabb problémák is léteznek - és lesznek is-, amelynek megoldása komoly kihívások elé állítja a ma és a jövő emberét is. Az élelmiszerben bekövetkező kémiai, fiziológiai változások mellett a termék fogyasztásra való alkalmatlanságának fő okai a nem kívánt mikroorganizmusok elszaporodása, az azok által okozott negatív változások. Ezek kiküszöbölése az élelmiszer megfelelő tárolásával részben megoldható, de hosszabb ideig történő tárolás esetén szükséges a termék egyéb módon történő tartósítása. Ez megoldható fizikai (hőkezelés/hűközlés, hőelvonás/, víztartalom-csökkentés, sugárzásos tartósítás), fizikai-kémiai (sózás, pácolás, füstölés, stb.) és kémiai (tartósítószeres adagolása) módszerekkel, amelyek közül sok a termék fizikai állagát, ill. kémiai összetételét, ezáltal természetes mivoltát változtatja meg. A fogyasztók körében azonban egyre inkább megnő az igény a kémiai tartósítószerektől mentes, kíméletesen kezelt, azaz úgymond „természetes” élelmiszerek iránt. Az élelmiszer tartósítás széles palettájának része a biológiai tartósítás is, amely a termék természetes mikroflóráján, és/vagy azok antimikrobiális termékein alapul, ezek segítségével növelve a termék élettartamát és biztonságát (STILES 1996). E célra leggyakrabban alkalmazott mikroorganizmus a tejsavbaktérium, amely amellet, hogy széles körben megtalálható a természetben, az emberi béltraktus mikroflórájának is fontos tagja. Élelmiszer előállításra, és -tartósításra évezredek óta alkalmazzák, de hogy ezt maguk a tejsavbaktériumok végzik, csak mintegy másfél évszázada tudjuk (CAPLICE et al. 1999, ROSS et al. 2002). Ez idő alatt számos fontos dolgot megtudtunk róluk, kezdve a metabolitjaiktól a fermentációs tulajdonságaikon és életünkben betöltött fontos szerepükön át egészen a genetikájukig.

Azonban a napjainkban is megjelenő, tejsavbaktériumokkal foglalkozó publikációk nagy száma azt mutatja, hogy még számos újdonságot rejtenek magukban, főleg ha figyelembe vesszük, hogy egy nemzetségen belül az egyes fajok, de azon belül maguk a törzsek is változatos, különböző tulajdonságokat mutathatnak. A tejsavbaktériumok egyik legjelentősebb és legjobban vizsgált nemzetsége a *Lactobacillus*-oké. E nemzetség tagjai amellet, hogy egyes élelmiszereink természetes, hasznos mikroflórájának fontos szereplői és ebből adódóan starter-, illetve védő kultúrák gyakori tagjai (DEVLEIGH et al. 2004,

KATIKOU et al. 2005), bizonyítottan probiotikus tulajdonságokkal is rendelkeznek (HOLZAPFEL & SCHILLINGER 2002, ISOLAURI et al. 2004, SZAKÁLY 2004). Ezért e nemzettséggel foglalkozó kutatások kiemelt jelentőséggel bírnak.

A tejsavbaktériumok és a mikrobavilág egyéb tagjainak kapcsolatát sokan vizsgálták, mind a hatékony együttélés és az ebből adódó hasznos tulajdonságaik szempontjából (MONTAÑO et al. 1997, CHEIRSILP et al. 2003), mind a számunkra káros (romlást okozó, patogén) mikroorganizmusokra kifejtett gátló hatásuk szempontjából (LAITILA et al. 2002, AMMOR et al. 2006). Élelmiszereink egyik fő romlást okozói a gombák nagyszámú országának tagjai, a - köznapi nevükön - penészek és élesztők. A tejsavbaktériumok együttélését, hatását ezen gombákra már sokan vizsgálták (DAMIANI et al. 1996, GOURAMA & BULLERMAN 1997, LAITILA et al. 2002, NARVHUS et al. 2003, SCHWENNINGER & MEILE 2004), mindazonáltal ezen hatásokat nagyban befolyásolja a fajok, törzsek változatossága, különböző viselkedése és maga a környezet, amelyben ezen hatásokat vizsgálták.

Ezért dolgozatomban céljaim az, hogy a *Lactobacillus* nemzetség tagjai közül szelektálok élesztő-szaporodás gátló tulajdonsággal rendelkező törzseket, s megvizsgálom e gátló tulajdonság hátterét, az ebben részt vevő anyagcseretermékek tulajdonságát, tápközegtől való függését, az élesztőgátló tulajdonsággal rendelkező törzsekből kevert tenyészetek kialakíthatóságát és e törzsek élelmiszeripari alkalmazhatóságát, különös tekintettel a zöldséglevelek biotartósításában betölthető szerepükre.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A tejsavbaktériumok általános jellemzése

A tejsavbaktériumok általánosan a Gram-pozitív baktériumok Firmicutes osztályába tartozó nem spóráképző, pálca-, vagy gömb alakú organizmusok, amelyek szénhidrátokat és magasabb rendű alkoholokat erjesztenek, főként tejsavvá. Ezen heterotróf baktériumok közé tartozó mikroorganizmusok közös jellemzője, hogy kizárólag tejsavas erjedéssel történő energianyerésre képesek, akár aerob, akár anaerob körülmények között. Az oxigénhez való viszonyuk különleges. Mint obligát erjesztők, valójában anaerobok, de elviselik az oxigén jelenlétét is, tehát aerob körülmények között is erjesztenek, szaporodnak. Ezért aerotoleráns anaeroboknak, olykor helytelenül fakultatív aeroboknak, vagy mikroaerofileknek nevezik őket. A tejsavbaktériumok magját a *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* és *Streptococcus* nemzetségek alkotják, ám számos nemzetséget alakítottak ki e korábbiakból, mint a *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Weisella* illetve új nemzetségeket is leírtak, mint például az *Abiotrophia*, *Helcococcus*, *Desemzia*. E nemzetségek kialakítása napjainkban molekuláris szempontok alapján történik, így az egyes nemzetségbe sorolt fajok alaktani és élettani tulajdonságai között kisebb-nagyobb eltérések vannak. A tejsavbaktériumok legnagyobb fajsza-mú és leginkább vizsgált nemzetsége a *Lactobacillus*-oké (DEÁK 1979, DEÁK 2005).

2.1.1. *Lactobacillus*-ok

A *Lactobacillus* (Lb.) nemzetséget, mint nem spóráképző, Gram-pozitív, pálca alakú tejsavbaktériumok heterogén csoportját tartják számon (STILES & HOLZAPFEL 1997). A lactobacillusok klasszikus felosztása azok erjesztési tulajdonságain alapul, ami szerint megkülönböztethetők obligát homofermentatív, fakultatív heterofermentatív és obligát heterofermentatív fajok. Az obligát homofermentatív törzsek a glikolízis útvonalat használják a cukrok lebontására, és fő végtermékük a tejsav, míg a heterofermentatívok a 6-foszfoglükonsav/foszfoketoláz úton hasznosítják a cukrokat, amiből azonos mennyiségű tejsav, etanol/ecetsav és szén-dioxid képződik (AXELSSON 1998). A fakultatív törzsek viszont amíg a hexózokat a glikolízisen keresztül hasznosítják, a pentózokat a 6-foszfoglükonsav/foszfoketoláz úton. Az 1. táblázatban példaként feltüntettem néhány, e

fermentációs csoportokban található fajt, kiemelve az általam későbbiekben vizsgált törzsek fajait.

1. táblázat: A *Lactobacillus* nemzetség, fermentációs tulajdonságokon alapuló fő csoportjai (STILES & HOLZAPFEL 1997)

obligát homofermentatív	fakultatív heterofermentatív	obligát heterofermentatív
<i>Lb. acidophilus</i>	Lb. casei	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Lb. curvatus	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. helveticus</i>	Lb. plantarum	<i>Lb. kefír</i>
<i>Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	Lb. rhamnosus	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	Lb. paracasei subsp. paracasei	<i>Lb. sanfrancisco</i>

A *Lactobacillus* nemzetség heterogén abban a tekintetben is, hogy DNS-ükben a G+C összetétel 33-55 mol% között mozog (STILES & HOLZAPFEL 1997), amely távolság kétszerese az általánosan elfogadott, egy nemzetségre vonatkozó összetételnek. Ezért filogenetikailag 8 csoportot is megkülönböztetnek a *Lactobacillus* nemzetségen belül (amelyeket egy-egy jellemző fajról neveztek el), ezeket a 2. táblázatban tüntettem fel, itt is kiemelve az általam későbbiekben vizsgált törzsek fajait.

2. táblázat: A *Lactobacillus* fajok filogenetikai csoportjai és erjesztési módozatai (DEÁK 2005)

Filogenetikai	Egyéb faj (példa)	Erjedési mód szerinti fajok száma		
		Homofermentatív	Fakultatív	Heterofermentatív
<i>Lb. buchneri</i>	<i>hilgardii, lindneri</i>	0	1	11
Lb. casei	rhamnosus, paracasei	3	4	0
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>acidophilus, helveticus</i>	14	5	0
Lb. plantarum	<i>alimentarius, pentosus</i>	1	7	2
<i>Lb. reuteri</i>	<i>fermentum, vaginalis</i>	0	0	12
<i>Lb. sakei</i>	curvatus, graminis	0	4	0
<i>Lb. salivarius</i>	<i>mali, murinus</i>	7	5	0
<i>Lb. coryniformis</i>	<i>brevis, bifermentans</i>	0	3	1

E táblázatból látható, hogy a *Lactobacillus* fajok közti fejlődéstörténeti kapcsolatok alapján kialakítható filogenetikai csoportok és az erjesztési módok között nagy átfedések vannak. Molekuláris alapon tehát jól meghatározhatóak az egyes fajok közötti szorosabb illetve tágabb rokoni kapcsolatok, viszont az egyes fajok, és az egyes törzsek szintjén is fontos azok viselkedésének, fermentációs tulajdonságainak, termelt metabolitjainak vizsgálata.

2.2. Laktobacillusok az élelmiszerben

2.2.1. A kezdetek

Az táplálék tartósításának igénye a történelem előtti időkből eredeztethető, hiszen minden bizonnyal már a gyűjtögető emberben felmerült a kérdés, hogy hogyan tudná az összegyűjtött, zsákmányolt táplálékát elraktározni a természet nyújtotta táplálékban kevésbé gazdag évszakokra, hosszabb időre. Ez a probléma a letelepedő életformára, a mezőgazdasági termelésre történő áttérés után, a megtermelt táplálék-felesleggel még inkább előtérbe került. Tudjuk, hogy a társadalmi rétegződés, a kezdeti civilizációk kialakulásának egyik alappillére az élelmiszerfelesleg megjelenése volt. Azonban az élelmiszerfelesleg elosztása, annak a termelés helyéről történő elszállítása illetve hosszabb ideig való tárolása felerősíthette a tartósítás iránti igényt. A korai civilizációk kialakulásának helyén a száraz éghajlat kedvezett az alapvető élelmiszer, a gabona tárolásához, amelyet tapasztalati, empirikus módszerekkel igen hatékony szintre fejlesztettek, amelyre jó példa, hogy már 5000 évvel ezelőtt a Közel-keleten a begyűjtött gabonaszemeket vízhatlan kecskebőrrel légmentesen lezárt agyag-amfórákban tárolták (HULSE 2004). Azonban amellett, hogy a korai ember felismerte a tárolás megfelelő körülményeit, letette az élelmiszertartósítás alapköveit is. A hús, hal, gyümölcs, zöldség napon történő szárítása után hamar rájött a sózás, sós leves pácolás tartósító hatására is. Azonban eme, főként a vízáktívitás csökkentésén alapuló módszerek mellett, a húsok tűz feletti egyidejű hőkezeléses és füstöléses tartósítását szintén korán felfedezte (HUGO 1995). Ezek mellett olyan speciális tartósítási eljárásokat is használt a régi korok embere, mint a dél-amerikai indiánok az Andok magas hegyein, ahol az alacsony hőmérséklet, a száraz levegő és a kis atmoszférikus nyomás egyidejű hatására megvalósította a burgonya-szeletek kezdeti fagyasztva-szárítását. Az ókori Rómában a gyümölcsöket mézben, és ahogy Seneca is megírta, a rákokat az Appeninekről származó hóban tartósították (HULSE 2004). Bár a hűtve tárolás igénye és megvalósítása jóval korábbi, hiszen már a suméroktól, 4500 évvel ezelőtről fennmaradt írásos emlékek a Zagros hegységből származó jég segítségével kialakított jégveremről szólnak (HUGO 1995). Ezen legrégebbi

élelmiszer tartósítási technológiák közé sorolható egy, szintén a mai napig használt módszer, a fermentáció.

2.2.2. A fermentáció

E tartósítási módszerről a legkorábbi, mintegy 8000 éves feljegyzések a termékeny félhold vidékéről, a Tigris és Eufrátesz folyók által közrefogott területről származnak, ahol e technológiát a tej-fermentációnál, a sajt készítésénél alkalmazták először (CAPLICE & FITZGERALD 1999, ROSS et al. 2002). Emellett a zöldségek fermentációja is hasonlóan hosszú múltra tekint vissza, mind a Földközi-tenger vidékén, mind az Ázsiai régióban (HULSE 2004). Természetesen e módszer is tapasztalati úton alakult ki, hogy mi módon kell kezelni, tárolni az egyes nyersanyagokat, hogy azok megőrizzék minőségüket, illetve kialakuljanak a kívánt érzékszervi és állományi tulajdonságaik. Az ily módon kitapasztalt módszert és megszerzett tudást azután generációról generációra adták tovább, egy szűk körön belül. Évszázadokon keresztül alkalmazták e fermentációs módszereket, kisebb módosításokkal, egészen a XIX. század közepéig, amikor nagy áttörés következett be. Ennek egyik oka az ipari forradalom, az emberek nagyméretű koncentrálódása a városokba, ahol már nem lehetett a kisméretű, hagyományos technológiákkal kiszolgálni az igényeket, illetve a másik ok, a mikrobiológia akkori nagyfokú fejlődése. Ekkor jöttek rá a mikrobák fermentációban betöltött alapvető szerepére, és hogy miként lehet befolyásolni a szaporodásukat, életműködésüket, ami által kialakíthatták a nagy, ipari méretű fermentációs módszereket (CAPLICE & FITZGERALD 1999, ROSS et al. 2002). Az 1800-as évek végére már a hasonló mikrobák különböző tulajdonságainak felismeréséből következően, a starterkultúrák kialakítása is megtörtént. De mi is tulajdonképpen a fermentáció? Szigorúan véve olyan anaerob kémiai reakciók csoportja, amelyben összetett, szerves komponensek viszonylag egyszerű anyaggá bontódnak le. Biológiai szempontból az élő sejtek, azok enzimeik által véghezvitt oxidációs, anaerob lebontó folyamat, amelyben a tápanyag-molekulák (pl. glükóz) egyszerűbb anyagokká (savak, alkohol, szén-dioxid) alakulnak miközben ez energiát nyújt a sejteknek. Élelmiszertudományi szempontból tágabb értelmezést takar ez a szó, mivel a fermentált élelmiszerek olyan, a fogyasztó számára kívánatos és biztonságos, mikroorganizmusok tevékenysége által létrejött termékek, amelyben a mikrobák enzimeik, főként amilázok, proteázok, lipázok, a nyersanyag poliszacharidjait, fehérjéit és lipidjeit nem mérgező állomány-kialakító-, íz-, illat-, és tápanyagokká hidrolizálják, alakítják (STEINKRAUS 2002). Mindemellett a részleges oxidáció folytán elegendő energiaforrás marad a termékben ahhoz, hogy megőrizze táplálkozási előnyeit a fogyasztó számára. A

fermentált élelmiszereket sokféleképpen lehet csoportosítani, kezdve a nyersanyag fajtájától (pl. hús, tej, zöldség), a terméket kialakító mikrobákon át (pl. baktérium, gomba), az azok által termelt anyagokig (pl. alkohol, tejsav, ecet). Az 3. táblázatban a teljesség igénye nélkül, néhány jelentősebb fermentált terméket, azok létrehozásában résztvevő mikroorganizmust és a kiindulási nyersanyagot tüntettem fel, az élelmiszer előállításának helye mellett, amely utóbbiból jól látható, hogy a fermentált termékek a föld minden részén előfordulnak. A fermentáció eredeti és elsődleges célja a nyersanyag tartósítása volt, ami a különböző tartósítási módszerek fejlődésével - főként a nyugati országokban - háttérbe szorult, s e termékek előállítását már „csak” egyedi ízük, aromájuk, állaguk miatt végzik (CAPLICE & FITZGERALD 1999).

3. táblázat: Néhány jelentősebb fermentált élelmiszer (CAPLICE & FITZGERALD 1999)

Termék	Előfordulás	Mikroorganizmus(ok)	Nyersanyag
Kenyér	Nemzetközi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , élesztők, tejsavbaktérium	Búza, rozs, más gabonák
Gari	Nyugat-Afrika	<i>Corynebacterium manihot</i> , más élesztők, tejsavbaktérium (<i>Lb. plantarum</i> , <i>Streptococcus</i> spp.)	Manióka gyökér
Idli	Dél-India	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> , <i>Trichosporon pullulans</i>	Rizs
Kimchi	Korea	Tejsavbaktérium	Káposzta, zöldségek, néha tengeri hal, magvak
Szójaszós	Japán, Kína, Fülöp-szigetek	<i>Aspergillus oryzae</i> vagy <i>A. soyae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Szójabab és búza
Sajt	Nemzetközi	<i>L. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. shermanii bulgaricus</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i> , néha penészek (<i>Penicillium</i> spp.)	Tej
Joghurt	Nemzetközi	<i>S. thermophilus</i> <i>Lb. bulgaricus</i>	Tej
Fermentált szalámi	Közép-, és Dél-Európa, Amerikai Egyesült Államok	Tejsavbaktérium (lactobacillusok, pediococcusok), kataláz pozitív kokkusok (<i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>), néha élesztő és/vagy penész	Általában sertés-, és/vagy marhahús, néha baromfi
Savanyú-káposzta	Nemzetközi	Tejsavbaktérium (<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sake</i>	Káposzta
Olajbogyó	Mediterrán	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Zöld olajbogyó

A tartósítás elsődlegesen a nem kívánt, romlást okozó mikroorganizmusok növekedésének gátlását célozza, melyet a fermentált termékekben, a hasznos mikroflóra által termelt különböző anyagok végeznek, többek között az alkohol, a szén-dioxid, a szerves savak (tejsav, ecetsav, stb.) és egyéb, szintén a mikrobák által kiválasztott antimikrobiális anyagok (pl.: bakteriocinek). A hatékonyságukat jól jelzi, hogy kifogásolható higiéniai körülmények között, szakmailag nem képzett személyek által, a trópusi vidékeken előállított fermentált termékek is megfelelő mikrobiológiai biztonsággal rendelkeznek (STEINKRAUS 1997, NOUT & SARKAR 1999). Ahogy az a 3. táblázatból is látható, igen sok fermentált termék kialakításában vesznek részt a tejsavbaktériumok, olyannyira, hogy a nyugati világ legfőbb fermentált termékei is velük hozható összefüggésbe.

2.2.3. Tejsavbaktériumok a fermentációban

Amint azt a 2.2.2. pontban már kifejtettem, a tejsavas fermentáció gyakorlati alapjait a tej-tartósítás és a sajtkészítés kapcsán rakták le, mintegy 8000 éve, amit a zöldségek, majd a húsok követtek (CAPLICE & FITZGERALD 1999, ROSS et al. 2002, HULSE 2004). A tejsavas fermentáció széleskörű kialakulásának egyik oka, hogy az abban szerepet játszó tejsavbaktériumok általánosan megtalálhatók a természetben, többek között előfordulnak a talajban, a vízben, a szennyvizekben, a trágyában, a növényeken és növényi részekben. Ebből adódóan, a nyersanyagok spontán tejsavas fermentációja, megfelelő körülmények között, könnyen bekövetkezik. Ezt már a korai kultúrákban hasznosították, hiszen a fent említett nyersanyagokon, illetve termékeken kívül, olyan alapvető élelmiszerben is szerepet játszott, mint a kovászos kenyér, ahol a kovászban a tejsavbaktériumok és élesztők különleges ökoszisztémája alakul ki. A kovászról már a Biblia is ír (Máté, 13:33), de ásatások igazolják, hogy Svájc területén már 5000 éve az általános táplálkozás része volt a kovászos kenyér. Mindemellett a kenyér első folyékony változatai, a babilóniai és egyiptomi sörök is tejsavas fermentáltak voltak az alkoholos fermentáció mellett (STILES & HOLZAPFEL 1997). Az évezredes alkalmazásuk után az újkori tudósok figyelme is már korán a tejsavas fermentációra, annak kutatására irányult, s az első jelentős publikációt e témában Pasteur jelentette meg, már 1857-ben (SCHWARTZ 2001). Ezt nem sokkal később követte az első tiszta tejsavbaktérium kultúra kialakítása (1873), s 1890-ben már tejsavbaktérium-starterkultúrákat is alkalmaztak a sajtkészítéshez (STILES & HOLZAPFEL 1997). A tejsavas fermentációért felelős tejsavbaktériumok szénhidrát-lebontó folyamatainak végtermékei azonban nemcsak a termék mikrobiológiai biztonságáért felelősek, hanem az íz-, aroma-, és a szerkezetkialakításért is. A modern élelmiszeripar a tejsavbaktériumokat főként már csak ez

utóbbi tulajdonságaik miatt alkalmazza, azonban napjainkban a természetes tartósítás jegyében újra előtérbe kerültek tartósító, mikrobagátló tulajdonságaik, azok vizsgálata.

2.2.3.1. Laktobacillusok a zöldséglé-fermentációban

A zöldségek (amely elnevezés valójában egy konyhaművészeti műszó és nem botanikai kifejezés) többnyire olyan, lágyszárú, emberi fogyasztásra alkalmas, a gyümölcsökhöz képest kevésbé édes növények, növényi részek, amelyek fogyaszthatóvá tételéhez általában szükséges azokat valamilyen eljárás alá vetni. Ugyanakkor természetes savtartalmuk is olyan kicsi, hogy az élelmiszer-romlást okozó mikroorganizmusoknak ideális szubsztrátot jelentenek (BATTCOCK & AZAM-ALI 1998). E „problémák” kiküszöbölésére sózzák, ecettel savanyítják a zöldségeket, ám egy természetesebb módja ennek a tejsavas fermentáció. A tejsavbaktériumok, amellet, hogy a fermentáció során tartósítják a zöldségeket, növelik az emészthetőségét, jobb ízt, aromát adnak neki, nagyobb hozzáadott értékű terméket képeznek a szubsztrátból és egészségi szempontból is javítják azt (KAROVIČOVÁ et al. 2005). A megfelelő minőségű nyersanyagon kívül ezért igen fontosak a zöldség fermentációjában résztvevő tejsavbaktériumok tulajdonságai. Noha bizonyos esetekben a zöldségek spontán tejsavas fermentációjával is megfelelő minőségű, gyakran egyedi karakterű termékeket lehet előállítani, mindazonáltal az állandó minőség és a mikrobiológiai biztonság érdekében hasznos a starter kultúrák alkalmazása. A megfelelő starterkultúrák iránti kíváncsiságról, azok szelekciójáról már sok publikáció született, melyekben megfogalmazták a starter törzsek biztonságosságának, a gyors szaporodás és pH csökkentés, a hatékony antimikrobiális termékek termelésének fontosságát, amellet, hogy alacsony biogén aminosavak (sőt, esetleg biogén aminosav bontók), kis hidrogén-peroxid termelők legyenek és antinutritív komponensek lebontó képességével is rendelkezzenek (BUCKENHÜSKES 1993, HALÁSZ et al. 1999, KAROVIČOVÁ et al. 1999, ŠPIČKA et al. 2002, BARÁTH et al. 2004, LEROY et al. 2004, TOLONEN et al. 2004). A szilárd, darabolt zöldségek tejsavas fermentációja által létrejött termékek (savanyúkáposzta, kovászos uborka, olajbogyó, stb.) mellett a zöldségek feldolgozásából készült levek fermentációjával lehet megőrizni és a fogyasztó számára elérhetővé tenni a zöldségek hasznos táplálkozási értékeit.

A fermentált zöldséglevek előállításához a *Lactobacillus* nemzetség fajainak használata egyrészt abból adódik, hogy megtalálhatók magukon a zöldségeken, illetve a spontán fermentált termékekben (JÍMÉNEZ-DÍAZ et al. 1993, MAIFRENI et al. 2004, RANDAZZO et al. 2004), másrészt e nemzetség tagjai nagymértékben kutatott és a különböző fermentációkban gyakran használt mikroorganizmusok (CAPLICE & FITZGERALD 1999,

LEAL-SÁNCHEZ et al. 2003), valamint természetes szereplői az egészséges emberi bélflórának is (ISOLAURI et al. 2004, SALMINEN et al. 1998). Ez utóbbi okból a *Lactobacillus*-ok nemzetségének tagjait, mint probiotikus fajokat tartják számon, s alkalmazzák is őket a fogyasztó bélflórájára, így egészségére is kedvezően ható termékek előállítására. Mindemellett a tejsavbaktériumok az általánosan biztonságosnak elismert (GRAS) mikroorganizmusok csoportjába tartoznak (SCHNÜRER & MAGNUSSON 2005).

A laktofermentált zöldséglé tehát ötvözi a zöldségekben található vitaminok, ásványi-, és rostanyagok táplálkozásélettani előnyeit a tejsavbaktériumok bélflórára kifejtett pozitív hatásaival, mindamellett, hogy egy könnyebben emészthető, ízletesebb, élelmiszermikrobiológiailag biztonságosabb terméket kapunk. Így a zöldséglé egy ideális élelmiszer-mátrix, a tejsavbaktériumok természetes közegben történő viselkedésének, metabolittermelésének, mikrobagátló aktivitásának vizsgálatára.

2.2.4. Laktobacillusok hasznos szerepe az élelmiszeriparban

Amint azt a 2.2.3. pontban említettem, a tejsavbaktériumok, és köztük a *Lactobacillus* nemzetség tagjai, széles körben előfordulnak a természetben és részt vesznek az ember által már évezredek óta fogyasztott fermentált termékek kialakításában. Mivel az emberiség kezdetektől fogva fogyasztja e termékeket és ezáltal az azok kialakításában résztvevő mikroorganizmusokat, kétség sem férhet hozzá, hogy a fermentációs folyamatokban résztvevő tejsavbaktériumok nincsenek semmiféle negatív hatással az emberre, sőt, Metchnikoff óta tudjuk, hogy a fermentált tej jótékony hatással bír az ember bél-mikroflórájára, ezáltal egészségére (KALANTZOPOULOS 1997, PARVEZ et al. 2006). Azóta nyilvánvalóvá vált, hogy a tejsavbaktériumok fontos szerepet töltenek be bélrendszerünk mikroflórájában és egészségünk fenntartásában.

A mai élelmiszeripar az évezredek tapasztalat alapján szintén alkalmazza a tejsavbaktériumokat, ezen belül a laktobacillusokat, azonban már tudatosan, és főként starter vagy védőkultúraként. Előfordulásuk és alkalmazásuk igen széleskörű az élelmiszereket tekintve, amelyet néhány példán keresztül a 4. táblázatban tüntettem fel.

4. táblázat: Laktobacillusok az élelmiszeriparban

Élelmiszeripari termék	Faj	Forrás
Sajtok	<i>Lb. delbrueckii subsp. lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i>	LEROY & DE VUYST 2004, KASIMOĞLU ET AL. 2004
Joghurt	<i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. paracasei</i>	LEROY & DE VUYST 2004, SCHILLINGER ET AL. 2005
Fermentált, probiotikus tej	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ,	CAPLICE & FITZGERALD 1999, LEROY & DE VUYST 2004
Kefír	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. kefiri</i> , <i>Lb. parakefiri</i> , <i>Lb. plantarum</i>	LEROY & DE VUYST 2004, WITTHUHN ET AL. 2005
Fermentált szalámi	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. casei</i>	AYMERICH ET AL. 2000, LEROY & DE VUYST 2004, AMMOR & MAYO 2007
Fermentált zöldségek (káposzta, uborka, olajbogyó, stb.)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. casei</i>	LEAL-SÁNCHEZ ET AL. 2003, LEROY & DE VUYST 2004, RANDAZZO ET AL. 2004
Kovászos kenyér	<i>Lb. sanfransicensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. johnsonii</i>	MESSENS ET AL. 2002, LEROY & DE VUYST 2004
Rizs bor	<i>Lb. sakei</i>	LEROY & DE VUYST 2004

2.2.5. A laktobacillusok káros élelmiszeripari tevékenysége

Meg kell említeni azonban, hogy a tejsavbaktériumok jelenléte és tevékenysége nem minden élelmiszerben hasznos, egyes élelmiszeripari termékek esetében romlást okozóként tartják számon őket. Néhány példa káros tevékenységeikre:

- Részt vesznek a pácolt, a vákuum-csomagolt húskészítmények romlásában (*Lb. sake*, *Lb. curvatus*) (BÍRÓ et al. 1979, BORCH et al. 1996)
- Összefüggésbe hozhatók a marinált és a vákuum-csomagolt halak romlásával (*Lb. sake*, *Lb. curvatus*, *Lb. alimentarius*) (LYHS et al. 1999, 2001)
- A hőtűrő laktobacillusok a dobozolt félkonzervek hőkezelést túlélő mikroflórájának tagjai, minőségromlást és főként színváltozást okozhatnak
- A nyers és pasztörözött tejben, a tej nem kívánt savanyodásához járulhatnak hozzá
- A sörben savanyodást, ecetesedést, nem teljes kierjedést, nyúlósságot, mellékszagot, rossz ízt okozhatnak (*Lb. brevis*, *Lb. lindneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. buchneri*, *Lb. coryneformis*, *Lb. planturum*) (JESPERSEN & JAKOBSEN 1996)
- A borászatban a nagy erjedési hőmérséklet kísérőjeként fellépő tejsavas erjedés, és ennek következtében a borokban keletkező tejsav íz okozói
- Nagy mennyiségben képezhetnek biogén amint az élelmiszerekben

A legutolsó káros tulajdonságukra részletesebben is kitérek a következőkben, mivel amíg a felsorolás korábbi tagjai észrevehető minőségi romlással kapcsolatosak, addig a nagy mennyiségben termelt biogén amin jelenléte közvetlenül nem érzékelhető, de ugyanakkor elfogyasztva súlyos egészségügyi problémákat okozhat.

2.2.5.1. A laktobacillusok biogén amin termelése

A biogén aminok olyan alacsony molekulatömegű, biológiailag aktív, természetes, szerves bázisok, amelyek általánosan előfordulnak az élő organizmusokban és ott számos alapvető funkcióval rendelkeznek. A normális metabolikus aktivitás eredményeként képződnek illetve bontódnak le a mikroorganizmusoktól kezdve a növényekben és az állatokban is (HALÁSZ et al. 1999a, SUZZI & GARDINI 2003). A biogén aminok általában az aminosavak dekarboxilációjával képződnek, de aldehidek és ketonok aminációjával vagy transzaminációjával is kialakulhatnak (SANTOS 1996). A legfontosabb biogén aminok az alifás putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, az aromás tiramin, feniletilamin és a

heterociklikus hisztamin és triptamin. Egyes biogén aminok, mint a putrescin, spermidin, spermin és kadaverin igen fontos szerepet töltenek be a nukleinsavak működésének szabályozásában, a fehérjeszintézisben és a membránok stabilizálásában is, így az élő sejtek nélkülözhetetlen komponensei (SANTOS 1996). Ebből következően számos élelmiszerben, úgymint a gyümölcsök, zöldségek, hús, hal, csokoládé, tej, természetes módon előfordulnak a nyersanyag endogén aminosav dekarboxiláza által, de mindemellett az élelmiszerekben előforduló dekarboxiláz-pozitív mikroorganizmusok is nagy mennyiségben képezhetik (SUZZI & GARDINI 2003). Ezért ez utóbbi tényből kiindulva, a magas biogén amin tartalom a nem fermentált élelmiszerekben jó indikátora lehet a mikrobiológiai romlásnak. A fermentált élelmiszerekben előforduló változatos mikroflóra egyes tagjai képesek biogén amin-termelésre, köztük a tejsavbaktériumok is, így azon termékek többsége, amelyben e baktériumok előfordulnak, jelentős mennyiségű putrescint, kadaverint, hisztamint és tiramint tartalmazhat (SANTOS 1996). Az egyes vizsgálatok azt mutatják, hogy ezen aminok közül a tejsavbaktériumok legnagyobb mennyiségben tiramint képeznek (BARÁTH et al. 1999, BOVER-CID & HOLZAPFEL 1999, SUZZI & GARDINI 2003). Mindazonáltal meg kell említeni, hogy nem csak a biogén amin termelésben, de annak lebontásában, mennyiségének csökkentésében is részt vehetnek a lactobacillusok egy termék esetén (SPIČKA et al. 2002., SUZZI & GARDINI 2003). A biogén amin tartalom önmagában nem okoz egészségügyi problémákat, mivel az emberi szervezet a bevitt biogén aminokat az amin oxidázokkal gyorsan hatástalanítja, viszont abban az esetben, ha az elfogyasztott étel nagy mennyiségű amin tartalmaz, vagy a lebontás természetes folyamata gátolódik illetve genetikai hiányosságból adódóan nem működik, súlyos egészségügyi problémákat okozhat. A leggyakoribb és legközismertebb biogén amin okozta élelmiszermérgeзések a hisztaminnal hozhatók összefüggésbe (SANTOS 1996, HALÁSZ et al 1999b), ezért én ennek vizsgálatát tartottam kiemelten fontosnak kísérleteim során.

2.2.5.2. A hisztamin

A hisztamin (2-(4-imidazol)etilamin) a hisztidin aminosavból származtatható biológiailag aktív amin. Fontos szerepet játszik az emberi szervezet működésében mint neurotranszmitter, illetve közreműködik a helyi immunválaszban és a bélrendszer fiziológiai funkcióinak szabályozásában (WIKIPEDIA). Az emlősökben, így az emberben is, a hízósejtek és a bazofil granulociták tartalmaznak nagy mennyiségben hisztamint, ami kiszabadulva e sejtekből, élettani értelemben is jelentős hatást fejt ki oly módon, hogy a légző-, emésztési-, ér-, és immunrendszer és a bőr sejtjeinek membránján található receptorokhoz kapcsolódik, amely

által allergiás illetve egyéb reakciókat vált ki. Az élelmiszerrel elfogyasztott hisztamin számos úton katabolizálódhat a szervezetünkben, többek között a mono-, ill. diamin-oxidázok és a hisztamin-metil-transzferázok által, amely folyamatok a bélrendszerben és a májban mennek végbe. Azonban ha nagy mennyiségű hisztamint fogyasztunk el, illetve gátolva vannak a lebontó folyamatok, akkor e biogén amin a perifériális erek kitágulását idézi elő, ezáltal bőrpírt, alacsony vérnyomást, fejfájást okozva. Továbbá a bélrendszeri simaizmok összehúzódását is indukálja, ami gyomorgörcsöt, hasmenést, hányást okozhat (LEHANE & OLLEY 2000).

A hisztamin előfordulása a *nem fermentált élelmiszerek*ben, ahogy azt korábban említettem, jó indikátora lehet a mikrobiológiai romlásnak. Mindazonáltal egyes táplálékaink tartalmazhatnak nagyobb mennyiségű hisztamint, természetes módon is, mint például a tengeri halak (ahol annak normál mikroflórája képes nagy mennyiségben termelni), de bizonyos mennyiségben előfordul máshol is, például a paradicsomban, a spenót levélben, húsban (HALÁSZ et al. 1994, SANTOS 1996). A *fermentált élelmiszerek*ben a mikrobák tevékenysége által nagyobb mennyiségű hisztamin is előfordulhat, ezt mutatja, hogy a halak után a sajtok a hisztamin-mérgezéssel leggyakrabban összefüggésbe hozott termékek. Továbbá bizonyos típusú szalámik fermentációja és érése alatt figyeltek meg növekvő hisztamin-tartalmat (SANTOS 1996, SUZZI & GARDINI 2003), de a borokban és sörökben is mérték (SANTOS 1996, LANDETE et al. 2005).

A tejsavbaktériumok és köztük a *Lactobacillus*ok hisztamintermelő képességét már többen kimutatták különféle élelmiszerekből, kezdve a sajttól, a húson át a borokig (SANTOS 1996, ROIG-SAGUÉS et al. 2002, MORENO-ARRIBAS et al. 2003, LANDETE et al. 2005, PIRCHER et al. 2006). A *Lactobacillus*-ok számos faja közt találhatók hisztamin-termelők, mindazonáltal ugyanazon fajon belül is az aminosav-dekarboxiláz jelenléte és működése törzs-specifikus, az adott törzstől függő tulajdonság (SUZZI & GARDINI 2003). Ezért fontos a fermentációhoz, starterkultúraként használt törzsek mindegyikének vizsgálata, hisztamintermelő képességük szempontjából.

2.3. A *Lactobacillus*ok antimikrobiális termékei

A tejsavbaktériumok - és köztük a *Lactobacillus*-ok - által termelt egyes komponensek antimikrobiális hatékonyságát és pontos hatását nehéz meghatározni egy olyan komplex rendszerben, mint egy élelmiszer, mivel ezen komponensek mind a környezettel, mind egymással kölcsönhatásban fejtik ki hatásukat. Sok esetben e komponensek együttesen, szinergens hatást mutatva okoznak gátlást (OUWEHAND 1998, NIKU-PAAVOLA et al.

1999). Az egyes anyagok gátló hatását és annak mechanizmusát külön-külön, in vitro rendszerekben határozták meg, így egy összetett rendszert jelentő élelmiszerben hatásukat együttesen, az adott környezeti paramétereknek megfelelően fejtik ki. Ezért az egyes tejsavbaktériumok, illetve az általuk termelt komponensek hatásának vizsgálata mindig az adott körülmények között szükséges.

2.3.1. Tejsav

E baktériumok legfontosabb végterméke, ahogy az a nevükben is szerepel, a tejsav. Energiájukat a tejsavas fermentáción keresztül nyerik, azaz leegyszerűsítve, az életszükségleteikhez, szaporodásukhoz szükséges energiát a szénhidrátok tejsavvá alakításából nyerik, tehát a tejsavtermelés alapvetően szükséges számukra. A környezetbe kiválasztott tejsav ott fejt ki összetett gátló aktivitását. Alapvető és elsődleges hatása gyenge sav tulajdonságából ered, mivel lecsökkenti a környezet pH-ját, ami által sok, neutrális pH-kedvelő mikroorganizmus szaporodását gátolja. Másrésről a tejsav, lipofil tulajdonsága okán, képes egyes mikroorganizmusok membránján átjutni és a sejtplazmában, annak neutrális pH-ján, hidrogén-kationná és sav-anionná disszociálnak, az így képződött ionok pedig már nem tudnak áthatolni a membránon, így kijutni sejtből, ezáltal felhalmozódnak a citoplazmában, lesavanyítva azt. Ez a folyamat számos módon gátolja a sejt működését, kezdve a membrán roncsolásától az alapvető metabolikus reakciók gátlásán és a sejten belüli pH homeosztázisra kifejtett stresszen át a toxikus sav-anionok felhalmozódásáig (ADAMS & NICOLAIDES 1997, BRUL & COOTE 1999). Ugyanakkor a gyengesav-hatásnak kitett sejt megpróbálja helyreállítani a belső pH-ját a protonok eltávolításával, a környezetbe történő kipumpálásával, amit főként a plazmamembrán H^+ -ATPázukkal visznek végbe, azonban ez energiaigényes művelet, mely energiát az egyéb életműködésétől, ezáltal szaporodásától von el (LAMBERT & STRATFORD 1999). A Gram-pozitív sejtek esetén a nem-disszociált savak könnyen átjutnak a sejtmembránon, kifejtve hatásukat, azonban a Gram-negatív sejtek szerkezetileg nagyban különböző, kettős membránnal rendelkező sejtfa bizonyos védelmet nyújt e sejteknek. Ez utóbbi baktériumok esetén azt tapasztalták, hogy a tejsavnak permeabilizáló hatása van a külső sejtmembránra (ALAKOMI et al. 2000), amely tulajdonságot kombinálva egy másik antimikrobiális komponenssel, szinergens hatás érhető el, ahogy azt NYKÄNEN és munkatársai (1998) is kimutatták tejsav és nizin tartalmú savó kombinált alkalmazása esetén. Az élesztőkre szintén, a fent leírtak szerint, gátlólag hatnak a gyenge szerves savak, de egyes élesztők is képesek a savas környezethez való alkalmazkodásra. Ezt egyrészt szintén a H^+ -ATPáz plazmamembrán fehérjék fokozott működésével magyarázzák (HOLYOAK et al.

1996), másrészt egy feltételezhetően membránhoz kapcsolódó transzport rendszerrel, amely a sav-anionokat távolítja el a sejt belsejéből (BRUL & COOTE 1999). Mindemellett fontos, hogy a gyenge szerves savak, mikrobagátló hatásukat csak alacsony pH értéken fejtik ki, mivel a pH emelkedésével egyre jobban disszociálnak és így már nem képesek áthatolni a sejtmembránon. A tejsav disszociációs állandója (pKa) 3,86, vagyis ez az a pH érték, ahol a disszociált és nem disszociált savak koncentrációja azonos. Amint az az 5. táblázatból is látszik, a pH emelkedésével drasztikusan csökken a még disszociálatlan állapotban lévő savmolekulák aránya, egyúttal azok antimikrobiális hatása, tehát a tejsav - és általánosságban a gyenge savak - e tulajdonságára jelentős befolyással bír a környezet pH-ja.

5. táblázat: A nem-disszociált savak aránya különböző pH értékeken, %-ban kifejezve (LIND et al. 2005)

Szerves savak	pH értékek				
	3	4	5	6	7
Tejsav	88	42	6,8	0,72	0,07
Ecetsav	98	85	37	5,4	0,57

2.3.2. Ecetsav

A heterofermentatív tejsavbaktériumok képesek nagyobb mennyiségben ecetsavat is termelni, amely gyengébb sav (pKa 4,75), mint a tejsav (pKa 3,86), de mivel a pH emelkedésével egy bizonyos értékig kevésbé disszociál, jobban kifejti antimikrobiális tulajdonságát (5. táblázat). Ennek köszönhetően jobb antimikrobiális és ezen belül antifungális hatást tulajdonítanak az ecetsavnak (CAPLICE & FITZGERALD 1999, MESSENS & DE VUYST 2002, CORSETTI et al. 2007), amit a LIND és munkatársai (2005) által azonos pH-n mért, élesztőkre és penészekre vizsgált minimális gátló koncentráció is bizonyít. Hatásmechanizmusát tekintve azonos a tejsavnál leírtakhoz.

Ugyanakkor megfigyelték, hogy a tej és ecetsav keveréke nagyobb antimikrobiális hatással bír, mint az egyes savak külön-külön (OUWEHAND 1998). Ezt azzal magyarázzák, hogy a környezet pH-jának emelkedésekor először a tejsav disszociál, ezáltal a pH-t csökkenti, illetve elég savas értéken tartja ahhoz, hogy az ecetsav megőrizze nem-disszociált formáját és így kifejthesse antimikrobiális tulajdonságát.

2.3.3. Szén-dioxid

Szintén a heterofermentatív tejsavbaktériumok által, sztöchiometrikusan 1 mol hexózból 1 mol mennyiségben termelt anyag a szén-dioxid. Pontos antimikrobiális hatásmechanizmusa még nem ismert, mindazonáltal egyrészt összefüggésbe hozható azzal, hogy anaerob környezetet hoz létre, ami akadályozza az obligát aerob mikroorganizmusok növekedését azáltal, hogy gátolja az enzimes dekarboxilációt és a sejtmembránnal kapcsolatba lépve, zavart okoz annak áteresztőképességében, illetve csökkenti a sejten belüli pH-t (OUWEHAND 1998, AMMOR 2006). Emellett a szén-dioxid megnövekedett parciális nyomásának önmagában sajátos antimikrobiális hatása van (ADAMS & NICOLAIDES 1997). Az egyes mikroorganizmusoknak különböző a szén-dioxid érzékenysége: míg a penészek és az oxidatív gram-negatív baktériumok igen érzékenyek rá, addig a lactobacillusok és néhány élesztő nagy toleranciát mutat. Ugyanakkor alacsony koncentrációban stimuláló is lehet néhány baktérium növekedésére (CAPLICE & FITZGERALD 1999). A szén-dioxid mikroorganizmusokra kifejtett gátló hatását használják ki az élelmiszerek módosított és a szabályozott légterű csomagolása esetén is (ADAMS & NICOLAIDES 1997).

2.3.4. Etanol

Az etanolt ugyancsak a heterofermentatív tejsavbaktériumok képezhetik, amely vegyületnek köztudottan antimikrobiális hatása van, mindazonáltal olyan kis koncentrációban termelik, hogy annak mikroba-gátló hatása minimális (ADAMS & NICOLAIDES 1997, CAPLICE & FITZGERALD 1999).

2.3.5. Hidrogén-peroxid

A tejsavbaktériumok, oxigén jelenlétében, a flavoprotein-oxidáz, illetve a nikotinamid-adenin-dinukleotid-peroxidáz aktivitásuk által hidrogén-peroxidot szintetizálnak, és mivel kataláz negatív voltuk miatt nem képesek elbontani, az felhalmozódhat környezetükben és kifejti gátló aktivitását. Antimikrobiális hatását egyrészt az eredményezheti, hogy a szulfhidril-csoportok oxidációjával számos enzimet denaturál, másrészt a membrán lipidek erős oxidációjával, annak átjárhatóságát növelik, a sejtbe jutva pedig a fehérjékre fejt ki oxidációs hatást (OUWEHAND 1998, CAPLICE & FITZGERALD 1999, AMMOR 2006). Ugyanakkor a hidrogén-peroxid prekursor lehet a szuperoxid-, és a hidroxil szabad gyökök

képződéséhez, amelyek képesek a DNS-t roncsolni (AMMOR 2006). Emellett a hidrogén-peroxid aktiválja a friss tej laktoperoxidáz rendszerét, ami hipothiocianát és más antimikrobiális anyagok képzésével jár együtt (CAPLICE & FITZGERALD 1999). A hidrogén-peroxid gátló aktivitása azonban nagyban függ a koncentrációjától, illetve olyan környezeti paraméterektől, mint a pH és a hőmérséklet (BRUL & COOTE 1999). Ugyanakkor mivel a hidrogén-peroxid igen aktív, erős oxidációs tulajdonságú vegyület, a táptalajban, illetve az élelmiszerben található aktív enzimrendszerek és antioxidánsok által gyorsan lebontódik, így egy komplex mátrixban kifejtett antimikrobiális hatása kérdéses (CAPLICE & FITZGERALD 1999). Emellett az egyes mikroorganizmusok is képesek kivédeni az erős oxidációs hatást: míg a baktériumok a kataláz-aktivitásuk által csökkentik a hidrogén-peroxid koncentrációját, addig az élesztők számos módon képesek védeni magukat, többek között a szuperoxid-dizmutáz-, kataláz-, citokróm c peroxidáz-, és glutation reduktáz enzimeikkel (BRUL & COOTE 1999).

2.3.6. Diacetil

A tejsavbaktériumok a citrát metabolizmusa során termelnek diacetilt (OUWEHAND 1998, AMMOR 2006). Alapvetően e vegyületet, mint fontos aromakomponenst határozták meg számos fermentált tejtermékekből. Számos mikroorganizmussal szemben leírták gátló hatását is, de a gram-negatív baktériumok, élesztők és penészek nagyobb érzékenységet mutattak rá, mint a gram-pozitív baktériumok (ADAMS & NICOLAIDES 1997, OUWEHAND 1998, AMMOR 2006). Gátló hatását az arginin-felhasználás zavarásán keresztül éri el oly módon, hogy az arra érzékeny sejt arginin-kötő fehérjéivel kapcsolatba lépve, akadályozza annak normális működését (OUWEHAND 1998, CAPLICE & FITZGERALD 1999). Mindazonáltal a fermentált termékekben ritkán ér el olyan koncentrációt, hogy annak jelentős antimikrobiális hatása legyen, s észlelhető gátlást is csak olyan koncentrációban mutat, ami jóval meghaladja az érzékszervileg elfogadható értéket (ADAMS & NICOLAIDES 1997, CAPLICE & FITZGERALD 1999).

2.3.7. Bakteriocinek

A tejsavbaktériumok által termelt bakteriocinek olyan riboszómálisan szintetizált és extracellulárisan kiválasztott, elsődleges vagy módosított, fehérjejellegű, általában 30-60 aminosavból álló peptidek vagy peptid komplexek, amelyeknek baktericid vagy bakteriosztatikus hatásuk van rokon fajokkal szemben. Aktivitásuk viszonylag szűk

spektrumú, többnyire csak a saját, vagy a közeli rokon fajokra fejtik ki hatásukat (CAPLICE & FITZGERALD 1999, AMMOR 2006). E bioaktív fehérjejellegű anyagok genetikailag kódoltak, mely gének kromoszómán, plazmidon, vagy transzpozonon helyezkedhetnek el, ahol a bakteriocin termeléséért és a termelő sejt immunitásáért felelős gének egy operonban csoportosulnak. Egy ilyen operon általában kódolja a bakteriocin szerkezeti peptidjeit, a bakteriocin membránon keresztüli transzportját-, és a termelő törzs számára immunitást biztosító fehérjét, a szabályozó fehérjét, valamint a módosuló bakteriocinek esetén az aktívvá válás folyamatának enzimeit, illetve segítő fehérjét (CHEN & HOOVER 2003). A bakteriocinek csoportosításában összetételük, molekulatömegük és hőtüro-képességük játszott szerepet, ami alapján 4 fő csoportba lehet besorolni őket, amelyeket a 6. táblázat foglal össze.

6. táblázat: A tejsavbaktériumok által szintetizált bakteriocinek osztályai (OUWEHAND 1998, CLEVELAND et al. 2001, CHEN & HOOVER 2003)

Osztály	Alosztály	Bakteriocin (példa)	Termelő faj	Tulajdonság	
I	A	nizin lactocin S	<i>Lactococcus (Lc.) lactis</i> <i>Lactobacillus sake</i>	Megnyúlt peptidek, pozitív töltéssel, pórusokat képez a membránban	Lantibiotikumok , kicsi (< 5 kDa), lantionint és béta- metil-lantionint tartalmazó
	B	cinnamycin ancovenin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Streptomyces ssp.</i>	Kicsi, gömb alakú peptidek, specifikus enzimeket gátol	peptidek, megnyúlt
II	IIa	pediocin PA-1, AcH sakacin A, P	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Listeria</i> -val szemben aktívak	Kis molekulatömegű (< 10 kDa), lantionint nem tartalmazó, hőstabil peptidek,
	IIb	lactococcin G, M plantaricin A, S, EF, JK	<i>Lc. lactis</i> <i>Lb. plantarum</i>	Két, különböző peptidből álló bakteriocinek	
	IIc	acidocin B	<i>Lb. acidophilus</i>		
III		helveticin J	<i>Lb. helveticus</i>	nagy molekulájú (> 30 kDa) hőérzékeny fehérjék	
IV				Összetett bakteriocinek: fehérjék lipiddel és/vagy szénhidráttal	

A termelő sejtől kijutva, a bakteriocinek elsődleges célpontja a többi baktérium sejtmembránja. Egyes bakteriocineknek ehhez szüksége van speciális receptor-fehérjékre a membránban (II osztályba tartozók), míg más bakteriocineknek (I osztályba tartozók) csak megfelelő membránpotenciál szükséges, hogy kapcsolódni tudjanak a célsejt membránjához. Ott pórusokat képeznek, amely egyrészt csökkenti a membrán potenciált, megzavarja a sejt energia-ellátását, növeli a membrán átjárhatóságát, így a pórusokon keresztül a sejt kisebb molekulái kiáramolnak, míg a nagyobb molekulák erre nem képesek, a víz azonban bejut a sejtbe, növelve az ozmotikus nyomást, amely végül sejt-lízist okoz (OUWEHAND 1998). A transzport folyamatok ilyenén megzavarásával (gátolva a prekursorok bejutását és segítve az esszenciális kis molekulák kiáramlását) közvetve megzavarják az RNS-, DNS-, és fehérjeszintézist.

Aktivitásukat tekintve az I osztályba tartozó bakteriocinek meglehetősen széles körű baktérium-gátló tulajdonsággal rendelkeznek. Az olyan közeli rokon fajokon kívül, amelyek az *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, és *Streptococcus* nemzetségbe tartoznak, gátló hatással bírnak olyan, kevésbé közeli rokonságban lévő gram-pozitív baktériumokkal szemben is, mint például a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* és a *Clostridium botulinum*. A II osztályba tartozó bakteriocinek szűkebb aktivitási spektrummal rendelkeznek, általánosan csak az *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* nemzetség fajait gátolják, illetve a IIa alosztály tagjai a *Listeria* fajokat is, bár némelyikük képes a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., és a *Clostridium* spp. gátlására is (CHEN & HOOVER 2003). Látható, hogy a bakteriocinek számos, élelmiszerekben előforduló patogén gram-pozitív mikroorganizmus szaporodását gátolják, azonban a gram-negatív baktériumokra nem hatnak, illetve csak abban az esetben, ha azok külső membránja is átjárhatóvá válik, pl. hőkezeléssel, fagyasztással, átjárhatóságot biztosító anyagok alkalmazásával (NYKÄNEN et al. 1998, ALAKOMI et al. 2000, CHEN & HOOVER 2003), arra azonban nincs megbízható bizonyíték, hogy a bármiféle hatásuk lenne élesztőkre vagy penészekre (MAGNUSSON 2003).

A termelő sejtek védelmüket saját bakteriocinjeikkel szemben az immunitást biztosító fehérjéken keresztül érik el, amelyek génje, mint korábban említettem, együtt íródik át a bakteriocin-termelés többi génjével. Eme immunitást biztosító fehérjék többnyire a sejtmembránhoz kapcsolódva fejtik ki védő hatásukat, megakadályozva a bakteriocinek pórusképzését a termelő sejtben, illetve a membránba beékelődő bakteriocineket visszajuttatja a sejtbe kívülről (CHEN & HOOVER 2003). Azonban termelő törzsön kívül, számos más mikroorganizmus is rezisztens a bakteriocinekre, amelynek több magyarázata is lehet: egyes baktériumok, sejtösszetételük megváltozásával nyernek rezisztenciát (OUWEHAND 1998,

BRUL & COOTE 1999); a gram-negatív baktériumok esetén, azok sejtfalának külső membránja védi a sejtet a bakteriocinek közvetlen hatásától (ALAKOMI et al. 2000); más mikroorganizmusok (pl. *Bacillus* spp., gombák) az általuk kiválasztott proteolitikus enzimek aktivitása által vannak védve az antimikrobiális peptidektől; míg a *Saccharomyces cerevisiae* esetén pedig azt tapasztalták, hogy sejtfaluk tartalmaz olyan fehérjéket, amelyek meggátolják a nizin póruskialakítását (DIELBANDHOESING et al. 1998).

Itt kell megemlíteni, hogy a bakteriocinek, illetve a bakteriocin termelő tejsavbaktérium törzsek alkalmazását a jövő egyik lehetséges természetes tartósítási módjaként tartják számon. Ugyanis a fogyasztók körében egyre inkább nő az igény a természetes élelmiszerek iránt, amelyek kémiai tartósítószer mentesek és kíméletesen kezeltek, de ugyanakkor mikrobiológiailag is biztonságosak. Ez komoly kihívás elé állítja az élelmiszer-előállítókat, amelynek egyik megoldása a biotartósítás lehet, azon belül is a bakteriocinek tulajdonságainak kiaknázása. E célra, azaz a bakteriocinek élelmiszertartósításban történő alkalmazására, három lehetséges módot fogalmaztak meg (SCHILLINGER et al. 1996):

- Bakteriocin-termelő tejsavbaktériumok starter-, vagy védőkultúráként történő beoltása az élelmiszerbe (bakteriocin *in situ* termelés)
- Tisztított vagy részlegesen tisztított bakteriocinek tartósítószerként történő adagolása az élelmiszerbe
- Bakteriocin-termelő törzzsel előfermentált termék összetevőként történő alkalmazása az élelmiszer előállításában

A bakteriocin termelő törzsek illetve a bakteriocinek hatékonyságát főként hús-, és tejtermékeken, néhány esetben pedig zöldségeken vizsgálták, illetve alkalmazzák is (SCHILLINGER et al. 1996, CHEN & HOOVER 2003). Azonban a bakteriocinek viszonylag szűk antimikrobiális spektruma, illetve annak mérsékelt volta miatt, fő alkalmazhatósági területe minden bizonnyal a kombinált tartósítás (CHEN & HOOVER 2003).

Az egyik legkorábban felfedezett és legjobban vizsgált, tejsavbaktérium által szintetizált bakteriocin a *Lactococcus lactis* által termelt nizin. 1928-ban figyeltek fel jelenlétére, s 1951-ben már élelmiszer-tartósítóként történő alkalmazásának lehetőségét vizsgálták. Azóta a nizin 6 különböző formáját fedezték fel (nizin A, B, C, D, E és Z), leírták aminosav-összetételét, szerkezetét, s kereskedelmi forgalomban is kapható, mint élelmiszer tartósító, NisaplinTM néven. A nizin (amelynek neve egyébként a termelő faj korábbi osztályozása szerinti */Streptococcus* N csoport/ nevéből ered, mint „N gátló anyag” */N inhibitory substance/*) a

bakteriocinek csoportosítása szerint az I osztály A alosztályába tartozik, gátló aktivitását a közeli rokon fajokon kívül a *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* és *Clostridium* fajokkal szemben fejti ki, illetve ez utóbbi kettő spóráinak kinövését is gátolja. Azonban a gram-negatív baktériumokra, élesztőkre és penészekre nincs hatással. Toxikológiai vizsgálatai negatív eredményt adtak, amiből következően ma már mintegy 50 országban engedélyezett, mint élelmiszer adalék (nemzetközileg a FAO/WHO engedélyezte a használatát 1969-ben), Európában E 234-es számú élelmiszer-adalékként tartják számon. Ezidáig ez az egyetlen bakteriocin, amelynek alkalmazását széleskörűen engedélyezik az élelmiszertartósítás terén. Főként tejtermékek és konzerv-ételek tartósításában játszik szerepet. Hatékonyságát és alkalmazhatóságát korlátozza, hogy neutrális illetve ahhoz közeli pH-n elveszíti gátló tulajdonságát (CHEN & HOOVER 2003, DELVES-BROUGHTON 2005).

2.3.8. Antifungális fehérjék

A természetben széleskörűen előfordulnak riboszómálisan szintetizált antifungális peptidek, fehérjék, kezdve a növényektől (növényi defenzinek, lipid transzfer proteinek, zeamatin, PR fehérjék) a rovarokon (drosomycin, holotricin) és kételtűeken át (magainin, dermaseptin) az emlősökig (defenzin, protegrin, lactoferricin). Ez alól természetesen a mikroorganizmusok sem kivételek. Ilyen mikrobiális gombaellenes fehérje például a *Bacillus subtilis* által termelt iturin, a *Pseudomonas syringae* által szintetizált syringomycin, a *Streptomycesek* által kiválasztott nikkomycin és polyoxin, de ide tartoznak a számos élesztő által termelt killer fehérjék, vagy más néven killer toxinok. Az antifungális peptidek hatásmechanizmusa igen változatos: némelyik a gomba sejtfal-polimerjének felbomlását okozza, más a sejtmembránhoz kötődve pórusokat alakít ki abban, de a sejtbe jutva a riboszómákat is roncsolhatja, gátolja a DNS szintézist, illetve vannak olyan peptidek, amelyek a sejtfalszintézist, az azt alkotó glükán és kitin bioszintézisét gátolják (DE LUCCA & WALSH 1999, SELITRENNIKOFF 2001).

Noha a tejsavbaktériumok által riboszómálisan szintetizált antibakteriális fehérjéket, a bakteriocineket már igen behatóan tanulmányozták és sok cikk megjelent róla, mindazonáltal a tejsavbaktériumok által termelt antifungális fehérjékről csak kevés publikáció lelhető fel. Ezek többsége is leginkább csak a penészekre kifejtett gátló aktivitásuk vizsgálatáról szól (SCHNÜRER & MAGNUSSON 2005).

A *Lactobacillusok* által termelt fehérje-jellegű anyagok élesztőkre kifejtett hatásával kapcsolatban OKKERS és munkatársai (1999) mutattak ki egy olyan, *Lactobacillus pentosus* TV35b törzs által szintetizált bakteriocin-szerű peptidet, amely gátló aktivitást mutatott a

Clostridium sporogenes, *Clostridium tyrobutyricum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus sake*, *Listeria innocua*, *Propionibacterium acidipropionici* fajok törzseivel szemben, amely bakteriocin jelleget feltételez, de ugyanakkor két *Candida albicans* törzs szaporodását is gátolta, ami antifungális tulajdonsággal is felruházta ezt a pentocin TV35b-nek nevezett peptidet.

A *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 törzs *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* törzsekre kifejtett gátló hatását MAGNUSSON és SCHNÜRER (2001) egy 3 kDa molekulatömegű fehérjejellegű komponensre vezette vissza.

STRÖM és munkatársai (2002) pedig a *Kluyveromyces marxianus*, *Candida albicans*, *Debaromyces hansenii*, és *Rhodotorula mucilaginosa* élesztők szaporodását gátló *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 törzs felülúszójából mutattak ki ciklikus dipeptideket, amelyeknek az antifungális aktivitást tulajdonítják. E ciklikus dipeptidek szerkezetileg hasonlítanak más mikroorganizmusok által termelt antifungális peptidekre (DE LUCCA & WALSH 1999), s gátló koncentrációjuk is hasonló volt a már mások által vizsgált antifungális fehérjékéhez (STRÖM et al. 2002).

Eme fent említett antifungális fehérjejellegű komponensekre jellemző, hogy kis molekulatömegű, hőtűrő, peptid-jellegű gátló anyagok. Ugyanakkor ATANASSOVA és munkatársai (2003) egy közel 45 kDa molekulatömegű, hőlabilis bakteriocin-szerű anyagról számoltak be egy *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 törzs esetén, amely *Bacillus subtilis* és *Lactobacillus delbrueckii* törzsek mellett negatívan hatott *Candida albicans*, *Candida blankii*, *Candida pseudointermedia* és *Saccharomyces cerevisiae* törzsek szaporodására is.

E kevés számú publikáció is bizonyítja, hogy a *Lactobacillus* fajok termel(het)nek antifungális fehérjejellegű anyagokat, de mindazonáltal azt is látható, hogy ezen anyagok tulajdonságaikban igen különböznek egymástól s gyakran nem lehet kategórikusan elkülöníteni őket a bakteriocinektől. Ugyanakkor eme, tejsavbaktériumok által termelt antifungális komponensek területe még csak kis mértékben vizsgált, noha egy ilyen hatékony, fehérjejellegű gomba-gátló anyag sikeres lehet a természetes tartósítás terén.

2.4. Az élesztőgombákról

Az élesztőgombák a gombákon belül a valódi gombákhoz tartozó, egyszerű eukarióta szervezetek. Feltételezés szerint a különböző rokonságú fonalas gombákból alakultak ki hosszú morfológiai átalakulás, egyszerűsödés eredményeként. Ebből következően az

élesztőgomba név nem jelöl meghatározott rendszertani egységet. Az élesztőgombák fogalma és csoportja történelmileg alakult ki a XIX. század második felében, az alkoholos italok erjesztésével, a kenyér és a tészták kelesztésével kapcsolatban megismert egysejtű, sarjadzással szaporodó, spórákat is képző mikroszkopikus kicsinységű szervezetekre vonatkoztatva. Az élesztőgombák többsége fakultatív anaerob. Mint heterotróf, többségükben szaprofita szervezetek, az élesztőgombák változatos élőhelyeken megtalálhatók a természetben, főként a növényi anyagokon (virágokban, leveleken, gyümölcsökön, fák nedvében), de kisebb-nagyobb számban mindig megtalálhatók a talajban, a vizekben, a levegőben is, valamint az állatok kültakaróján és emésztőcsatornájában és az emberi szervezet normális mikrobiotájában. E széles körű előfordulása, csak úgy, mint a tejsavbaktériumoknál, predesztinálja ez élelmiszerekben való előfordulásukat is. Az élesztőgombák többségére jellemző alkoholos erjedést és a vele járó szén-dioxid-termelést az ember már ősidők óta ismeri és felhasználja (kenyérkelesztés, alkoholos italok készítése). Az élelmiszeriparban azonban az élesztőgombák gyakran a nyersanyagok, a késztermékek káros, romlást okozó mikroorganizmusai is (DEÁK et al. 1980, DEÁK 1998).

2.4.1. Az élesztőgombák alkalmazása az élelmiszeriparban

A tejsavbaktériumokhoz hasonlóan az élesztőgombák is régóta részt vesznek az emberiség táplálékkialakításában. Az alkoholos fermentációt már ismerték és alkalmazták 4000-6000 évvel ezelőtt a sumérok és egyiptomiak bor és sörkészítésre, s utóbbiak a kenyér-kelesztést is felfedezték (ROSS et al. 2002). A mikrobiológia és a fermentációs technikák fejlődésével a 19. század végén, a 20. század elején az élesztőt alkalmazó fermentáció ipari méretűvé nőtte ki magát. Napjainkban az élelmiszeriparban az élesztőket főként a sörgyártásban, a borászatban, a szeszgyártásban, a kenyérgyártásban, a sütő-, és takarmányélesztő előállításban, a tejiparban és a szójaszószkészítésben alkalmazzák (DEÁK 1998). Az élesztőgombák hasznos és nélkülözhetetlen szerepe kétségbevonhatatlan, látva, hogy olyan alapvető élelmiszer előállításában vesznek részt, mint a kenyér, s nekik köszönhetjük a nem kis mennyiségben elfogyasztott alkoholos italokat is. Az élelmiszeripar az élesztőgombák szűk csoportját alkalmazza csak, amelyek közül is kiemelkednek a felhasználás tekintetében a *Saccharomyces* fajok (sör-, bor-, szesz-, kenyérgyártás, sütőélesztő előállítás).

2.4.2. Romlást okozó élesztőgombák

Az élesztőgombák hasznos tevékenysége az élelmiszeriparban jól ismert, azonban sokféle élelmiszer romlását is előidézhetik, ezzel nagy gazdasági veszteséget okozva. Becslések szerint a világ élelmiszertermelésének 5-10%-a az élesztők és penészek okozta romlás miatt vész kárba (SCHNÜRER & MAGNUSSON 2005). Az élesztőgombák főként a nagy erjeszthető cukortartalmú (pl. gyümölcsök, üdítőitalok) illetve az olyan élelmiszerek legfőbb romlásokozói, amelyekben nem kedvezőek a körülmények a baktériumok szaporodásához (pl. kis pH-jú, alkoholos, nagy cukorkoncentrációjú termékek) (DEÁK 1998).

Az élelmiszerekben mintegy 50-100 élesztőfaj fordul elő (zöldségeken 60-80 különböző faj), azonban egy adott termékben csak körülbelül 10-20 különböző élesztőfaj található, azok közül is csak egy, vagy néhány válik a romlás fő okozójává. Az élelmiszerekben leggyakrabban előforduló élesztőgomba a *Saccharomyces cerevisiae*, amelyet erős erjesztőképessége tehet romlásokozóvá, viszont az extrém környezeti körülményeknél előforduló romlással más élesztőket hoznak összefüggésbe, mint például a *Debaryomyces hansenii*-t kis vízaktivitás és nagy sókoncentráció esetén, a *Zygosaccharomyces rouxii*-t magas cukortartalomnál, a *Zygosaccharomyces bailii*-t ecetsav-, és tartósítószer-tűrése miatt (DEÁK 1998, BETTS et al. 2000).

Napjainkban a fogyasztók természetesebb élelmiszerek iránti igényét kielégítve alacsonyabb dózisú tartósítószer-adagolást és kíméletesebb tartósítási eljárásokat alkalmaznak, ugyanakkor az élesztők egyre növekvő számban válnak rezisztenssé az egyes tartósítószer-ek iránt, amely folyamatok hatásaként napjainkban növekszik az élelmiszerek élesztők által okozott romlásának száma (LOUREIRO 2000, SCHNÜRER & MAGNUSSON 2005).

2.4.3. A vizsgált élesztőkről

2.4.3.1. *Candidák*

A *Candida* nemzetség a legnagyobb fajszámú élesztőnemzetség, amelynek mintegy 170 tagja van (DEÁK 1998). Fajai széles körben megtalálhatók az élelmiszerekben, melyek közül sokban a termék kialakításáért, ízanyagaiért felelnek. Többek között megtalálhatók a fermentált szalámikban (GARDINI et al. 2001, SUZZI & GARDINI 2003), sajtok felületén (PEREIRA-DIAS et al. 2000, CORSETTI et al. 2001), és nem utolsósorban a kefir kialakításában is aktívan részt vesznek (RODRIGUES et al. 2005, WITTHUHN et al. 2005). Azonban elszaporodva, romlást is okozhatnak a sajtokon (PEREIRA-DIAS et al. 2000), és

gyümölcslevegekben is (TCHANGO et al. 1997). A *Candidák* között azonban vannak humán kórokozók is, a gombás fertőzések 10 %-át e nemzetség fajainak tulajdonítják, melyek közül kiemelkedik a *Candida albicans* faj (DEÁK 1998, CSANK & HAYNES 2000, DOROCKA-BOBKOWSKA et al. 2003).

A *Candida famata* (teleomorf *Debaryomyces hansenii*) fajt többek között kimutatták sajtokon, olyannyira jellemzően, hogy például VAN DEN TEMPEL és JAKOBSEN (1998) a dán Danablu sajton ezt a fajt találták a dominánsnak, de MINERVINI és munkatársai (2001) is több tejtermékből kimutatták, ugyanakkor BELÁK és munkatársai (2004) nyers sárgarépaléből azonosítottak *Candida famata*-t. E fajt ritka humán patogénként is számon tartják (WAGNER et al. 2005).

A *Candida glabrata* (korábban *Torulopsis glabrata*) a normál humán flóra része, mindazonáltal a 21. század jelentős patogénjének tartják (FIDEL 2001). Ez a leggyakoribb gombafaj, amit vérből izolálnak, s a kandidiázisos esetek 20 %-át e faj számlájára írják (CSANK & HAYNES 2000). Ugyanakkor élelmiszerben is előfordul, HERNÁNDEZ és munkatársai (2007) például spontán fermentált olajbogyó páclevéből izoláltak *Candida glabrata* fajt.

2.4.3.2. *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*

A *Kluyveromyces marxianus* faj (anamorf *Candida kefyr*) zsír- és fehérjebontó képességének köszönhetően általánosan megtalálható a tejtermékekben, azok természetes élőflórájaként, többek között a sajtokon, (VASDINYEI 2005), a kefirben (RODRIGUES et al. 2005, WITTHUHN et al. 2005), ugyanakkor elsődleges szerepet játszik a joghurtok romlásában (VASDINYEI 2005), de kimutatták már almabor mustjából (COTON et al. 2006) és spontán fermentált olajbogyóból is nagy koncentrációban (HERNÁNDEZ et al. 2007). A tejtermékek esetén e faj sok esetben együttműködik, sőt, szoros szimbiózisban él a tejsavbaktériumokkal. A *Kluyveromyces marxianus* fajt, mint inulináz termelőt tartják számon (ROUWENHORST et al. 1988, ROUWENHORST et al. 1990) ugyanakkor ROUWENHORST és munkatársai (1990) a *lactis* variánsoknál csak invertáz enzim szintetizálást figyeltek meg.

2.4.3.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Az élesztőgombák felfedezésének, kimutatásának, megismerésének kezdetén csaknem minden fajt *Saccharomyces*-ként írtak le. 1997-ben e nemzetség 16 fajt tartalmazott, melyek közül négy sensu stricto fajt írtak le, ezek a *bayanus*, *cerevisiae*, *paradoxus* és *pastorianus* (DEÁK et al. 1998). Amint azt a 2.4.1. pontban említettem, a *Saccharomyces* nemzetség fajait széleskörűen alkalmazza az élelmiszeripar a különböző termékek előállítására, ezen fajok közül is kiemelkedik a *Saccharomyces cerevisiae*. Ez a leginkább használt és ismert élesztőgomba az iparban, s a tejsavbaktériumokhoz hasonlóan az általánosan biztonságosnak elismert (GRAS) mikroorganizmusok csoportjába tartozik (DE LLANOS et al. 2006). Azon termékeken kívül, ahol e fajt starterkultúraként használják, előfordulnak a tejtermékekben (sajt, kefir) (VASDINYEI 2005, CHEIRSILP et al. 2003), spontán fermentált termékekben (almabor, olajbogyó) (COTON et al. 2006, HERNÁNDEZ et al. 2007). Erős erjesztőképessége miatt romlásokozóként is számon tartják az élelmiszeriparban, többek között a gyümölcslevekben, üdítőitalokban és az alkoholos italokban (bor, sör) (DEÁK 1998). Mindemellett lehetséges probiotikus tulajdonságot is tulajdonítanak e fajnak (VAN DER AA KÜHLE et al. 2005).

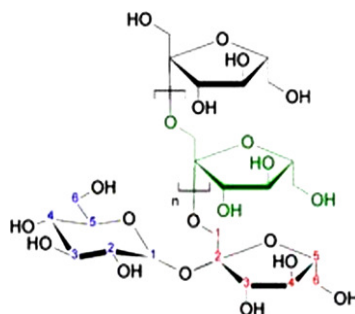
2.5. Pár szóban a csicsókáról

A vizsgálataimban alkalmazott zöldséglé kialakításához használt csicsóka (*Helianthus tuberosus*, népi nevein: csókapityóka, földialma, tótrépa) a fészkes virágúak (pl. napraforgó) családjába tartozó gumós, Észak-Amerikából származó növény. Az indiánok évszázadokon át termesztették, s fogyasztották gumóját, mint alapélelmiszer, egészen a 18. század közepéig, amikor is kiszorította a burgonya. A csicsóka egy évelő növény, mely 1-3 m magasra is megnő, virága 4-8 cm átmérőjű - a napraforgóéhoz hasonló-, az energiát föld alatti gumóban raktározza (1. ábra).



1. ábra: Csicsókagumók

Ezen megvastagodott szárképletek 13-18%-a szénhidrát, amelynek 80 %-a inulin, s ez utóbbi miatt figyelemreméltó e növény. Az inulin egy egymáshoz β -(2,1)-glikozidos kötésekkel kapcsolódó fruktóz molekulákból álló polimer, amelyhez terminális glükóz molekula is kapcsolódik, így e poliszacharid 80-90%-a fruktóz, 10-20 %-a glükóz (2. ábra). Az inulin - amely szénhidrátot először Rose határozta meg 1804-ben *Inula helenium* (Örménygyökér) növényből, amelyből neve is származhat -, nem, vagy csak nehezen emészthető szénhidrát az ember számára, olyannyira, hogy azonos mennyiségű keményítőhöz képest csak körülbelül harmad annyi energiát nyújt. Táplálkozástani jelentősége éppen ebben áll, mivel így egyrészt az energiaszegény étrendbe beilleszthető, másrészt a fruktóz nem emeli nagy mértékben a vércukorszintet, ami a diabéteszes fogyasztók számára előnyös. Ugyanakkor magas a rost és ásványianyag tartalma is (BARTA & PÁTKAI 2007).



2. ábra: Az inulin szerkezete (Forrás: Wikipedia)

Mivel az ember emésztő enzimeit specifikusan az α -glikozidos kötések bontani képesek, az inulin β -2,1-es kötéseire rezisztensek a béltraktusban végbemenő hidrolízissal szemben, így a tápcsatorna felső részén jóformán változatlan formában végighaladva, a vékony- és vastagbélben lévő mikroorganizmusok egy szűk csoportja fermentálja azt, rövid szénláncú zsírsavakat, gázokat (hidrogén gázt, szén-dioxidot, metánt) (CAUSEY et al. 2000) és tejsavat illetve ecetsavat képezve (ROBERFROID 2002). Megfigyelték, hogy a béltraktusban lévő hasznos mikroorganizmusok, a lactobacillusok és a bifidobaktériumok, az általuk szintetizált β -fruktozidáz, illetve β -fruktofuranozidáz enzimek által képesek fermentálni az inulint, illetve annak részlegesen hidrolizált változatait, a fruktooligoszacharidokat (KAPLAN & HUTKINS 2003, MAKRAS et al. 2005, GOH et al. 2006), ezáltal növekszik a számuk és aktivitásuk a béltraktusban (TUOHY et al. 2003), míg más enterikus baktériumok, mint az *Escherichia coli* és a *Salmonella* spp. nem képesek azt felhasználni (KAPLAN et al. 2003). Azokat az anyagokat, amelyek olyan nem emészthető élelmiszer összetevők, melyek jótékonyan hatnak

a fogyasztóra azáltal, hogy szelektíven stimulálja egy vagy bizonyos számú hasznos baktérium növekedését és/vagy aktivitását a vastagbélben, ezáltal javítja a fogyasztó egészségét, összefoglalóan prebiotikumnak nevezzük (TUOHY et al. 2003, MAKRAS et al. 2005). Ezek közé tartozik tehát az inulin és annak származékai is.

Látható, hogy a csicsókából készült zöldséglé szénhidrátjai ideálisak a lactobacillusoknak, mindemellett tartalmaznak olyan mikroelemeket is, többek között magnéziumot és mangánt, amelyek szükségesek szaporodásukhoz (NÉMETH et al. 2006). Ugyanakkor a csicsóka zöldséglé az élesztők számára is ideális környezet a szaporodáshoz, olyannyira, hogy egyes élesztők, pl. a *Kluyveromyces marxianus* faj, képes inulináz (β -fruktofuranozidáz) enzim termelésére (ROUWENHORST et al. 1988, ROUWENHORST et al. 1990, SELVAKUMAR et al. 1999), amely működése által lebontja a csicsóka inulinját, könnyen felhasználhatóvá téve azt, olyannyira, hogy kísérletek folytak eme élesztő fajjal etanol előállítására, csicsókagumó kivonaton (BAJPAI & MARGARITIS 1982). Így a csicsóka zöldséglé ideális modellnek tűnik a tejsavbaktériumok élesztőkre kifejtett hatásának természetes közegen történő vizsgálatához.

Mindemellett, mivel a vizsgált lactobacillusok a probiotikumok csoportjába tartoznak (HOLZAPFEL & SCHILLINGER 2002, ISOLAURI et al. 2004), azaz olyan élő mikroorganizmusok, amelyeket elegendő mennyiségben alkalmazva, a fogyasztó egészségének hasznára vannak (REID 2006), a prebiotikus csicsókalével kombinálva egy lehetséges szinbiotikum kialakulása, azaz a pre-, és probiotikumok kombinációja valósul meg (STANTON et al. 2005).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munkám célkitűzése volt, tíz, korábban már előszelektált (BARÁTH et al. 1999, PLOCKOVÁ et al. 2004) *Lactobacillus* törzs szaporodásának, fermentációs tulajdonságának, antimikrobiális metabolit-termelésének (sav, hidrogén-peroxid) meghatározása szintetikus és természetes tápközegekben.

Az így vizsgált *Lactobacillus* törzsek közül céлом volt a jó antimikrobiális metabolit-termelő törzsek élesztőgátló hatásának vizsgálata.

Az eredményes antifungális aktivitással rendelkező *Lactobacillus*-ok gátló mechanizmusának feltárása, különös tekintettel az esetleges fehérje jellegű gátló metabolitokra, amelyek kimutatása esetén azok tisztítását, lehetséges meghatározását is célul tűztem ki.

Antifungális szempontból hatékony törzsekből vegyes kultúra kialakítását, gátló hatásának vizsgálatát is céljaim közé vettem.

Ezen kívül céлом volt még az egyes *Lactobacillus* törzsek, az azokból kialakított vegyes kultúrák és a meghatározott, tisztított gátló komponens hatásának vizsgálata a teszt-élesztők szaporodásának gátlására zöldséglé-modellen, hogy gyakorlati alkalmazhatósági szempontból is találjak egy megfelelő starter kultúrát, illetve természetes antifungális komponenst.

4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

4.1. A kísérletben alkalmazott mikrobák

4.1.1. A vizsgált tejsavbaktérium törzsek

FAJOK	KOLLEKCIÓ SZÁM	TÖRZSEK JELÖLÉSE	SZÁRMAZÁSI HELY
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	DMF 30120	154	ICT
<i>Lb. casei</i> Shirota		Shirota	AFP
<i>Lb. curvatus</i>		2768, 2775	AFP
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DMF 30134	05	ICT
		2750	AFP
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>casei</i>	DMF 30136	SF1	ICT
<i>Lb. plantarum</i>	DMF 30131	01	ICT
		2142	AFP
<i>Lb. rhamnosus</i>	DMF 30105	VT1	ICT

ICT – Kémiai Technológia Intézet, Tej-, és Zsírtechnológiai Tanszék (DMF), Prága

AFP – Perugia-i Egyetem Mezőgazdasági Tanszék, Tejipari Intézet

4.1.2. Vizsgált élesztőtörzsek

FAJOK	KOLLEKCIÓ SZÁM	SZÁRMAZÁSI HELY
<i>Candida glabrata</i>	CBS 138	BCE-MBT
<i>Candida famata</i>	DMF 1001	ICT
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	DMF 1004	ICT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2880	BCE-MBT

BCE-MBT – Budapesti Corvinus Egyetem, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

ICT – Kémiai Technológia Intézet, Tej-, és Zsírtechnológiai Tanszék (DMF), Prága

4.2. Alkalmazott táptalajok és összetételük

Nutrient agar

(Merck KGaG, Darmstadt, Németország)

Hús-pepton	5 g/l
Hús kivonat	3 g/l
Agar-agar	12 g/l
pH 7,0; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig	

MRS tápleves (de Man, Rogosa, Sharpe)

(Merck KGaG, Darmstadt, Németország)

Kazein pepton	10 g/l
Húskivonat	8 g/l
Élesztő kivonat	4 g/l
D-glükóz	20 g/l
di-kálium-hidrogén-foszfát	2 g/l
'Tween 80'	1 ml/l
Di-ammónium-hidrogén-citrát	2 g/l
Nátrium-acetát	5 g/l
Magnézium-szulfát	0,2 g/l
Mangán-szulfát	0,04 g/l
pH 5,7; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig	

MRS agar

MRS tápleves összetétele +

Agar	15 g/l
pH 6,2; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig	

MRS lágyagar

MRS tápleves összetétele +

Agar 7 g/l

pH 6,2; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig

Tejtáplé tejsavbaktériumok fenntartására

Savanyú tejpor 100 g/l

Pepton 10 g/l

Brómkrezolbíbor 0,04 g/l

Kalcium-karbonát 0,2 g/kémcső

pH 6,8; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig

TGY tápleves

Glükóz 1g/l

Élesztő kivonat 2,5 g/l

Trypton 5g/l

pH 7,0; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig

Trypton - Glükóz - Élesztő-kivonat Agar (TGY agar)

Glükóz 1g/l

Élesztő kivonat 2,5g/l

Trypton 5g/l

Agar 15g/l

pH 7,0; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig

TGY lágyagar

Glükóz	1g/l
Élesztő kivonat	2,5g/l
Trypton	5g/l
Agar	7g/l
pH 7,0; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig	

TGY brómkrezolbíbor indikátorral

TGY agar összetétele +	
Brómkrezolbíbor	0,1 g/l
pH 7,0; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig	

Csicsóka táplé

Csicsóka por (Dr. Fitokup Kft., Budapest)	100 g
Desztillált víz	900 ml

Paradicsomlé táplé (TJ)

(Fluka Chemie GmbH, Buchs, Németország)

Paradicsomlé	20 g/l
Élesztő-kivonat	10 g/l
Dektróz	10 g/l
Di-kálium-foszfát	0,5 g/l
Kálium-foszfát	0,5 g/l
Magnézium-szulfát	0,2 g/l
Nátrium-klorid	0,01 g/l
Vas-szulfát	0,01 g/l
Mangán-szulfát	0,01 g/l
Ph 6,7; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig	

Burgonya-glükóz-agar (PDA)

(Merck KgaG, Darmstadt, Németország)

Burgonya kivonat	4 g/l
D-glükóz	20 g/l
Agar-agar	15g/l
pH 5,6; sterilizálás autoklávban 121 °C-on 15 percig	

4.3. Alkalmazott módszerek

4.3.1. A vizsgált mikroorganizmusok szaporodásának vizsgálata

4.3.1.1. Telepszámlálós módszer

A *Lactobacillus* esetén lemezöntéssel határoztam meg a sejtszámot, úgy, hogy a vizsgált mintából 10-szeres tovaftató hígítással hígítási sort készítettem, amely szükségesnek vélt (általában a 4., 5., 6.) tagjaiból 1 ml-t steril Petri-csészébe pipettáztam, majd hozzávetőlegesen 20 ml, körülbelül 50 °C-os MRS agart öntöttem a csészébe és megfelelő eloszlítás, illetve az agar megszilárdulása után a Petri-csészéket 30 °C-os inkubátorba helyeztem. Minden mintából két párhuzamos lemezt öntöttem. A kiértékelést 3 nap után végeztem, minden esetben azon Petri-csészéket vettem a számolás alapjául, ahol a telepszám 30 és 300 között volt. A megszámlált telepekből a tejsavbaktériumok tényleges számára a Magyar Élelmiszerkönyv „A nyers- és a hőkezelt tej vizsgálati módszerei” (2003) című előírásában leírt, erre vonatkozó számolással következtettem.

Az *élesztők* szaporodását szélesztéses telepszámlálással határoztam meg oly módon, hogy a vizsgált mintából 10-szeres tovaftató hígítással hígítási sort készítettem, amely szükségesnek vélt (általában a 3, 4., 5.) tagjaiból 100 µL-t pipettáztam a korábban Petri-csészébe öntött és megszilárdult burgonya-glükóz agar felületére, amit steril szélesztő-bottal eloszlattam, majd a felület megszáradása után a Petri-csészéket 25 °C-os inkubátorba helyeztem. Minden mintából két párhuzamos lemezre szélesztettem. A kiértékelést 5 nap után végeztem, minden esetben azon Petri-csészéket vettem a számolás alapjául, ahol a telepszám 30 és 300 között volt. A megszámlált telepekből az élesztő tényleges számára a Magyar Élelmiszerkönyv „A nyers- és a hőkezelt tej vizsgálati módszerei” (2003) című előírásában leírt, erre vonatkozó számolással következtettem.

4.3.1.2. Turbiditásmérésen alapuló módszer (MEGHROUS et al. szerint (1999))

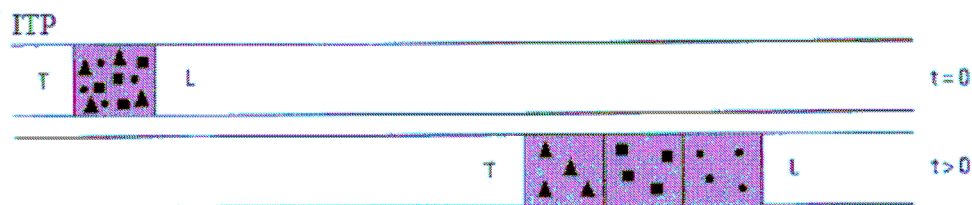
Az élesztők sejtszáma számára kifejtett hatást turbiditás méréssel is meghatároztam mikrotiterlemez módszer segítségével. E módszer a táplében lévő sejtek fényelnyelésén alapul. Egy steril, 96 lyukú mikrotiter lemez első oszlopjának lyukaiba 125 µl TGY táplevest, 125 µl felülúszót és 25 µl vizet pipettáztam (vizsgált felülúszó-tápleves kontroll). A második oszlopba 125 µl TGY táplét, 125 µl vizet és 25 µl élesztő-szuspenziót (élesztő-szaporodás kontroll), a

harmadik oszlopba 125 μ l TGY táplevest és 150 μ l vizet (élesztő tápleves kontroll), a negyedik oszlopba pedig 125 μ l TGY táplevest, 125 μ l felülúszó oldatot és 25 μ l élesztőszuszpenziót pipettáztam (minta élesztő-gátlása). Mindegyikből három párhuzamos sorozatot mértem. A bemérés után a lemezt 25 °C-os inkubátorba helyeztem, majd adott időpontokban, a lyukakban lévő minta steril pipettával történő felkeverése után, mikrotiterlemez-leolvasó segítségével 630 nm-en mértem az abszorbanciát. A sejtszám meghatározásához 2-szeres hígítási sort készítettem az élesztőkből, majd a hígítási tagokból mikrotiterlemezre mértem, illetve TGY agar felületére szélesztettem. A mért abszorbanciából és meghatározott telepszámból készített kalibrációs görbe segítségével határoztam meg az adott abszorbancia értékre vonatkozó sejtszámot.

4.3.2. Sejtek által kiválasztott antimikrobiális anyagok vizsgálata

4.3.2.1. A táplébe kiválasztott szerves savak mérése izotachoforézissel

A tejsavbaktériumok által, az egyes táplevekben termelt szerves savak mennyiségét izotachoforézissel mértem. E kapilláris elektroforetikus módszer elválasztásának alapja a határfelületek mozgása. Lényege, hogy a kis keresztmetszetű csőbe juttatott minta komponensei egyenáramú erőterben, elektroforetikus mobilitáskülönbségük alapján szétválnak, elkülönülő sávokba sorakoznak fel, amelyek azután detektorral mérhetők. A mintát egy vezető és egy záró zóna közé juttatjuk be, amelyek olyan elektrolitok, amelyeknek a mozgékonyasága nagyobb, illetve kisebb, mint a mintakomponenseké. A feszültséggradiens hatására a minta a két elektrolit közé ékelődve halad, miközben komponensei zónasorozatot kialakítva szétválnak (3. ábra)



3. ábra: Az izotachoforézis mechanizmusának illusztrálása

L: vezető (leader) elektrolit, T: befejező (terminate) elektrolit, $\blacktriangle \blacksquare \bullet$: egyes szétválasztandó komponensek, t: idő

Forrás: Dr. Gáspár Attila: Kapilláris elektroforézis (delfin.klte.hu/~agaspar/ce.pdf)

A vizsgálathoz az MRS és csicsóka tápleveket a *Lactobacillus* törzsek egy éjszakás, 1 %-os inokulumával oltottam be, majd 24 órás 30 °C-os inkubáció után, megfelelően hígítva, közvetlenül vittem a rendszerbe.

A kapilláris és az anódtér vezető elektrolittal illetve a katódtér záró elektrolittal való feltöltése után 50 µl mintát juttattam a mintaadagolóba, ahonnan az injektálás pillanatában a minta a kapillárisba jutott és ugyanekkor 3000 V feszültségű áramot kapcsoltam a rendszerre, minek hatására megindult az elválasztás és a minta mozgása a kapillárisban. A konduktometriás detektorhoz érve, a mért jeleket kromatogramként kaptuk meg. A kapott eredményeket a mérni kívánt szerves savak standard oldatainak mérési adataiból készített kalibrációs görbék segítségével értékeltem ki. A vizsgált törzsek savtermelésének meghatározásához, a mintában mért értékekből kivontam a kontroll táptalajban mért szerves savak mennyiségének értékeit, így kaptam meg az egyes törzsek által szintetizált savmenyiséget. E vizsgálatokat a Prágai Kémiai Technológiai Intézet Tej-, és Zsírtechnológiai Osztályán végeztem.

4.3.2.2. Sejtmentes felülúszó előállítása

A *Lactobacillus* törzsek által az egyes táplevekben termelt szerves savak gátló hatásának vizsgálatához sejtmentes felülúszót állítottam elő. A törzsek fenntartására szolgáló, 4 °C-on tartott tej-tápléból 100 µl-t 5 ml MRS tápléba vittem, majd egy napos, 30 °C-os inkubációt követően ebből 50 µl-t újabb 5 ml MRS tápoldatba oltottam, amit ismételt inkubálás követett, majd ezen lépés még egyszeri megismétlése után az így kapott tiszta, életképes sejtszuszpenzióból oltottam be az adott táplét, 1 tf %-nyi inokulummal. A 18-24 órás, 30 °C-os inkubációt követően a tápoldatot steril centrifugacsövekbe öntve, azt 5 °C-on, 4000 fordulat/percen centrifugáltam 20 percig, majd a felülúszót leöntöttem, vízfürdőben 80-85 °C-on 10 percig hőkezeltam az esetlegesen benne maradt sejtek elpusztítása és a tejsavbaktériumok által termelt proteolitikus és gátló hatású enzimek inaktiválása végett és 0,22 µm pórusméretű steril szűrővel szűrtem. Az így előállított felülúszót felhasználásig 4 °C-on hűtőben tároltam.

4.3.2.3. Savval kiegészített táplevek előállítása

A szerves savak közvetlen és kizárólagos hatásának vizsgálatára, a tejsavbaktériumok izotachoforézissel mért szerves savtermelési adatainak felhasználásával, olyan savval kiegészített MRS tápleveket alakítottam ki, amelyekben a vizsgálni kívánt savak (tejsav, ecetsav) az egyes törzsek által termelt koncentrációban voltak jelen. A tej-, és ecetsav hatását

mind külön, mind együtt, keverten vizsgáltam.

A savak hatásának pH-tól való függését a savval kiegészített MRS táplé, 4 mol/l-es nátrium-hidroxid oldattal végzett, 6,5; 5,5 és 4,5-ös pH-ra állításával vizsgáltam, a kiindulási, általában 4-3,8 pH értéken kívül.

4.3.2.4. A savval kiegészített táplevek hatásának vizsgálata agardiffúziós módszerrel (Lyuk-teszt)

A Petri-csészébe öntött nutrient agar megszilárdulása után egy 10 mm átmérőjű steril célszerszámmal lyukakat fúrtam az agarba. A sejtmentes felülúszóból illetve a savval kiegészített táplevekből 3 alkalommal egyenként 150 µl-t juttattam az agarba kialakított lyukakba, ahonnan az bediffundált a táptalajba, aminek elősegítésére a felszívódásig a Petri-csészéket 52 °C-os szárítószekrénybe helyeztem. A vizsgálni kívánt mikroorganizmust, hígítást követően, a szaporodásának megfelelő (tejsavbaktérium esetén MRS-, élesztő vizsgálatánál TGE-) lágyagarba kevertem, hogy végkoncentrációja 10^4 sejt/ml legyen, majd a lyukakat tartalmazó agar felületére öntöttem. Megszilárdulása után 30, illetve 25 °C-os inkubátorba helyeztem a kiértékelésig. A lágyagarban az adott törzs elszaporodott, miközben a lyukak körül a bediffundált felülúszó kifejtette hatását szaporodásukra. A gátlóhatás mértékére a lyukak körül kialakult „feltisztulási zóna” nagyságából következtettem.

4.3.2.5. Hidrogén-peroxid mérése

A tejsavbaktérium törzseket beoltottam az MRS illetve csicsóka táplevekbe, majd 24 órára 30 °C-os inkubátorba helyeztem. Az egyes táplevekből, körülbelül azonos számú sejtet tartalmazó mennyiségeket lecentrifugáltam (4000 fordulat/perc, 5 °C, 20 perc), majd átmostam hideg nátrium-foszfát pufferral és újabb centrifugálás után megismételtem a mosás műveletét. Végül 20 ml hideg nátrium-foszfát puffert raktam a lecentrifugált sejtekre, amiben elszuszpendáltam azokat és 5 °C-os hűtőbe helyeztem 48 órára, majd a továbbiakban a sejteket lecentrifugálva a felülúszót vizsgáltam. 5 ml felülúszóhoz 1 ml 0,01 mg/ml koncentrációjú tormaperoxidáz oldatot és 0,1 ml 1 %-os, metanolban oldott o-dianizidin oldatot adtam, majd 37 °C-on 10 percig inkubáltam. 0,2 ml 4 N HCl oldattal leállítottam a reakciót és 400 nm-en mértem az abszorbanciát. A mért értékekből kalibrációs görbe segítségével következtettem a hidrogén-peroxid koncentrációra, amely görbét ismert koncentrációjú peroxid-oldatokkal vettem fel.

4.3.2.6. Hidrogén-peroxid-tartalmú táplevek előállítása

A hidrogén-peroxid közvetlen és kizárólagos hatásának vizsgálatára, a tejsavbaktériumok fent említett módon mért peroxid adatainak felhasználásával, olyan MRS tápleveket alakítottam ki, amelyekben a hidrogén-peroxid az egyes törzsek által termelt koncentrációban voltak jelen.

A hidrogén-peroxid hatásának pH-tól való függését a hidrogén-peroxid-tartalmú MRS táplé 6,5; 5,5 és 4,5-ös pH-ra állításával vizsgáltam, a kiindulási 3,8 pH értéken kívül.

4.3.2.7. A hidrogén-peroxid-tartalmú táplevek hatásának vizsgálata agardiffúziós módszerrel (Lyuk-teszt)

A sav-vizsgálatnál leírtak szerint végeztem. (3.3.2.4.)

4.3.3. Élesztőgátló hatás vizsgálata

4.3.3.1. Sejtek által termelt anyagok közvetlen hatásának vizsgálata (Telep-teszt)

A vizsgálni kívánt tejsavbaktérium törzs egy éjszakás tenyészetéből 5 µl-t cseppentettem a Petri-csészébe öntött, megszilárdult MRS-agar felületére, majd 30 °C-on egy napig inkubáltam. A teszt-organizmust hígítást követően, a szaporodásának megfelelő (tejsavbaktérium esetén MRS-, élesztő vizsgálatánál TGE-) lágyagarba kevertem, hogy végkoncentrációja 10^4 sejt/ml legyen, majd az MRS-agar felületére öntöttem. Megszilárdulása után 30, ill. 25 °C-os inkubátorba helyeztem a kiértékelésig. A tejsavbaktérium által kiválasztott és az agarba diffundált anyagok a lágyagarban szuszpendált sejtek szaporodására kifejtették hatásukat. A gátló hatás mértékére az MRS-agaron kinőtt telep körül kialakult feltisztulási zóna nagyságából következtettem.

4.3.3.2. Agar puffer-hatásának vizsgálata

A telep-teszt agardiffúziós módszernél brómkrezolbíboros PCA táptalajon vizsgáltam az agaros táptalaj pufferoló hatását a tejsavbaktériumok által termelt savakra. A vizsgálatot a telep-tesztnél leírtak szerint végeztem, kivéve, hogy ekkor nem használtam lágyagaros teszt-organizmust.

4.3.3.3. Sejtmentes, neutrális felülszó előállítása

A sav-vizsgálatoknál leírt módszer szerint készítettem, azzal a különbséggel, hogy a centrifugálás után a felülszó pH-ját 4 mólos NaOH oldattal 6,5 +/- 0,05-ös értékre állítottam be, majd a közel neutrális pH-ra állított felülszót 0,22 µm pórusméretű steril szűrővel szűrtem, végül vízfürdőben 80-85 °C-on 10 percig hőkezelttem az esetlegesen benne maradt sejtek elpusztítása és a tejsavbaktériumok által termelt gátló hatású enzimek inaktiválása végett. Az így előállított felülszót felhasználásig 4 °C-on hűtőben tároltam.

E nyers felülszót töményítve is megvizsgáltam, a kezelt felülszó liofilizálása, majd az eredeti oldathoz képest ötszörös töménységűre történő visszaoldása és pH beállítása (6,5) után.

4.3.3.4. Sejtmentes, neutrális felülszó vizsgálata agardiffúziós módszerrel (Lyuk-teszt)

A sav-vizsgálatnál leírtak szerint végeztem. (3.3.2.4.)

4.3.3.5. Sejtmentes, neutrális felülszó hatásának kimutatása turbiditás méréssel

A turbiditásmérésen alapuló módszer leírása szerint végeztem (3.3.1.2.).

4.3.4. Fehérjejellegű komponens vizsgálata

4.3.4.1. Fehérjejellegű gátló komponens tisztítása

A fehérjejellegű gátló anyag kivonását, tisztítását az MRS tápléből, a bakteriocinekre kidolgozott és már hatékonyan alkalmazott adszorpció/deszorpció módszerrel végeztem, három különböző irodalmi módszer szerint. E módszer lényege az a felfedezés, hogy egy adott bakteriocin a termelő törzs által kialakított pH-értéknél nagyobb pH-n a termelő sejtek falához adszorbeálódik, míg alacsonyabb pH-n deszorbeálódik onnan. Eképpen a termelő sejtet, mint természetes adszorbenst lehet alkalmazni a bakteriocin tápléből történő kivonásához. A három módszert az alábbiakban ismertetem. A kivont komponenst tartalmazó oldat egy részét liofilizáltam, majd a kiindulási térfogathoz képest ötszörös töménységűre visszaoldottam és ezt használtam a fehérjejelleg és a molekulatömeg meghatározására.

4.3.4.2. ELEGADO és munkatársai (1997) szerint

Az egy éjszakás inkubáció után a sejteket tartalmazó MRS táplevet 30 percig 70 °C-on kezeltem, hogy inaktiváljam az enzimeket, majd a pH-t 6,0-ra állítottam. 30 percig kevertettem szobahőmérsékleten, hogy elősegítsem a beállított pH-n a bakteriocinek adszorpcióját a sejthez. Ezután 4000 rpm/perc fordulatszámmal, 4 °C-on centrifugáltam 20 percig, a felülúszót leöntöttem, majd a sejteket 5mM nátrium-foszfát pufferban felfuszpendáltam, hogy a visszamaradt táplé összetevőket kimossam a sejtek közül. Ezt újabb centrifugálás követte (4000 rpm/perc fordulatszámmal, 4 °C-on, 20 perc), miután a felülúszót elöntve, a sejteket 100 mM NaCl oldatban felfuszpendáltam, pH-ját 2-re állítottam, majd 4 °C-on 12 órán át kevertettem. Végül 4000 rpm/perc fordulatszámmal, 4 °C-on centrifugáltam és a felülúszót 0,22 µm-es szűrővel szűrtem. Az így tisztított bakteriocin oldatot felhasználásig hűtőben tároltam.

4.3.4.3. YANG és munkatársai (1992) szerint

Az egy éjszakás inkubáció után a sejteket tartalmazó MRS táplé pH-ját 6,5-re állítottam, majd 70 °C-on 25 percig hőkezelttem. A sejteket lecentrifugáltam (4000 rpm/perc fordulatszámmal, 4 °C-on, 20 perc), majd a felülúszó elöntése után 5mM nátrium-foszfát pufferban felfuszpendáltam, melyet újabb centrifugálás követett, a korábban leírt paraméterek szerint. A sejteket ezután 100 mM NaCl oldatban felfuszpendáltam, pH-ját 2-es értékre állítottam és 4 °C-on 1 órán át kevertettem. Végezetül újra lecentrifugáltam a sejteket, majd a felülúszót 0,22 µm-es szűrővel szűrtem és az így kapott oldatot hűtőben tároltam a vizsgálatig.

4.3.4.4. MEGHROUS és munkatársai (1999) szerint

Az egy éjszakás inkubációt követően a táplé pH-ját 6-os értékre állítottam és egy órán át rázattam. A sejteket lecentrifugáltam (4000 rpm/perc fordulatszámmal, 4 °C-on, 20 perc), majd a felülúszó elöntése után a sejteket steril, 20mM NaCl oldattal mostam, ezt követően újra lecentrifugáltam. E mosási lépést még kétszer elvégeztem, miután a sejteket 2-es pH-jú, 20 mM HCl oldatban felfuszpendáltam és 10 percig forraltam. Jeges vízben történő hűtés után a sejteket lecentrifugáltam a fenti paraméterek mellett, majd a felülúszót 0,22 µm-es szűrővel szűrtem. A mintát felhasználásig hűtőben tároltam.

4.3.4.5. A tisztított komponens fehérjejellegének meghatározása vékonyréteg-kromatográfiával EL-ADAWY szerint (2001)

A tisztított felülúszó-oldatokból 30 µl-t vittem fel vékonyrétegre (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck,

Darmstadt), majd metanol:jégecet:etil-acetát 10:1:1 térfogatarányú futtató oldatban 2 óra alatt megfuttattam a mintákat. A vékonyréteget szárítás után 0,2%-os, acetonban oldott ninhidrin oldattal bepermeteztem, majd 120 °C-os szárítószekrénybe helyeztem a szín megjelenéséig.

4.3.4.6. A mikroba-szaporodásgátló komponens fehérjejellegének meghatározása enzimkezeléssel

A tisztított felülúszó-oldat liofilezett, majd az eredetihez képest ötszörös töménységűre visszaoldott oldatának pH 8-ra (proteináz-K) illetve pH 2,5-re (pepszin) történő állítása után, annak 900 µl-ébe 100 µl proteináz-K (Sigma) illetve pepszin (Sigma) enzim-oldatot adtam, hogy az enzim végkoncentrációja 1 mg/ml legyen. Keverés után a mintákat 2 órára 37 °C-os inkubátorba helyeztem vízfürdőbe. Az enzim 80 °C-on 15 percig történő inaktiválása után a minta gátló-hatását agardiffúziós lyuk-tesztel vizsgáltam. Kontrollként enzim-oldatot nem tartalmazó, azonosan kezelt tisztított felülúszó-oldatot használtam.

4.3.4.7. A mikroba-szaporodásgátló fehérjejellegű komponens molekulatömegének meghatározása gél-elektroforézissel

A tisztított komponens liofilizálása, majd az eredeti oldathoz képest ötszörös töménységűre történő visszaoldása után, annak 50 µl-ét mintaoldó pufferban (15 µl desztillált víz, 25 µl NuPAGE® LDS minta puffer, 10 µl DTT tartalmú NuPAGE® minta-redukáló anyag) oldottam. Ezt 10 percig vízfürdőben forraltam, majd ebből 25 µl-t vittem a gél (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, USA) zsebébe. Molekula-standardként MultiMark® Multi-Colored Standard-et (Invitrogen, Carlsbad, USA) használtam. A futtatást vertikális futtatókádban (X-Cell SureLock™, NOVEX, San Diego, USA) végeztem NuPAGE® MES SDS futtató pufferrel (4:76 v/v, futtatópuffer:desztillált víz). Az elektroforézises elválasztás 119 mA-en, 35 percig tartott. A gél a futtatás után 20%-os triklór-ecetsav oldatba helyeztem 20 percig, amit kétszer 10 perces etilalkoholos (ecetsav:etanol:víz, 10:20:70 v/v) differenciáló oldatos áztatás követett. A gél Coomassie Brilliant Blue R-250 festéssel (0,2g festék 100 ml desztillált víz, 20 ml ecetsav, 100 ml etanol keverékében oldva) 2 órán át rázatva festettem, majd 10%-os ecetsavas differenciálóval rázattam, eltávolítva a felesleges festéket. A tisztított komponens molekulatömegét a molekula-standardhoz viszonyítva határoztam meg.

4.3.5. Hisztamin termelés vizsgálata

A szelektált törzsek biogén-amin termelésének vizsgálatát hisztaminra, RIDASCREEN® Histamin ELISA teszttel (R-Biopharm AG, Darmstadt, Németország) végeztem. E módszer az antigén-antitest reakcióján alapul. A mikrotiter lemez hisztaminnal fedett lyukaiba pipettáztam a standard oldatokat, illetve az előtte tízszeresére hígított mintaoldatokat (50 µl), majd anti-hisztamin antitestet vittem a lyukakba (50 µl) és egy órán át szobahőmérsékleten rázattam. Eközben az antitestek a mintában lévő illetve a lemezhez kötött hisztaminhoz kapcsolódtak. A mikrotiter lemezből kiöntve a mintákat, mosó-pufferral háromszor mostam, majd enzim-konjugátumot (100 µl) tettem a lyukakba és 30 percig szobahőn inkubáltam. A peroxidázzal jelölt másodlagos antitest ekkor a mosás után a lemezen maradt antitest-hisztamin komplexhez kapcsolódott. Újabb háromszori mosás után szubsztrátot /urea peroxid (50 µl)/ és kromogént /tetrametilbenzidin (50 µl)/ tettem a lyukakba és 30 percig szobahőn, sötét helyen inkubáltam. Ekkor a lemezen maradt enzim konjugátum a szintelen kromogént kék végtermékké alakította. Az inkubációt követően stop-oldatot /kénsav (100 µl)/ pipettáztam a lyukakba és 450 nm-en mértem a sárgává változott minta fényelnyelését. A standard oldatok adataiból készített kalibrációs görbe segítségével és a hígítás figyelembevételével meghatároztam az eredeti mintában található hisztamin-tartalmat.

4.3.6. Vizsgálatok vegyes kultúra kialakításához

4.3.6.1. Kereszt-vonal módszer

A egyes *Lactobacillus* törzsek egymásra kifejtett közvetlen hatását kereszt-vonal módszerrel végeztem. A Petricsészébe öntött MRS agar megszilárdulása után a vizsgált törzsek egy éjszakás tenyészetéből 5 µl-t cseppentettem annak felületére, majd azokból steril kacs használatával keresztirányban vonalakat húztam. Az vonalak kereszteződésénél vizsgáltam a törzsek közvetlen hatását egymásra; a gátló hatás mértékére a kereszteződéseknel kialakuló gyengébb telepképzésből következtettem.

4.3.6.2. A sejtmentes felülúszó hatása egymás termelő törzseire

A sejtmentes, közel neutrális pH-ra (6,5) beállított felülúszót (3.3.3.3) a lyuk-teszt korábbi leírásának megfelelően (3.3.2.4) vizsgáltam, ahol az agar felületére öntött lágyagarba, teszt-organizmusként, a vizsgált *Lactobacillus* törzseket szuszpendáltam.

4.3.7. Vegyes kultúra hatásának vizsgálata

A vegyes kultúra kialakítására szelektált törzseket 1:1 arányban ugyanabba a táplébe oltottam, majd 30 °C-os, egy napos inkubációt követően a sejtmentes, neutrális felülúszónak megfelelően (3.3.3.3.) elkészítettem a vizsgálati mintát és lyuk-tesztel (3.3.2.4.) vizsgáltam, illetve a sejtszuspenziót közvetlenül használtam a telep-teszt módszerhez (3.3.3.1.). A kevert tenyészet hatékonyságánál összehasonlítottam azt az esetet, amikor a sejteket külön készítettem el az egyes törzsekből, majd mindkettőből tettem a vizsgálati pontba (a telep-teszt esetén ugyanarra a pontra mindkét sejtszuspenzióból), valamint azt, amikor már az előszaporítás során együtt növekedtek a sejtek és ebből a kevert tenyészetből vizsgáltam egy cseppnyi sejtszuspenziót.

4.3.8. *Lactobacillus* törzsek, felülúszóik és a tisztított fehérjejellegű komponens hatásának vizsgálata élesztők szaporodására zöldséglé-modellel

A zöldséglé-modelleként használt csicsókaleven vizsgáltam a tejsavbaktériumok illetve a szintén csicsókaleven előállított felülúszóik élesztő-szaporodásgátló hatását.

4.3.8.1. *Lactobacillus* törzsek hatásának vizsgálata élesztők szaporodására

A csicsókalé elkészítése után azt 80 °C-on 10 percig hőkezelttem, majd steril körülmények között redős szűrővel szűrtem a nagyobb, darabos alkotórészek eltávolítása végett. A szűrt levet steril kémcsövekbe adagoltam, majd a vizsgált tejsavbaktérium és élesztő törzsszel beoltottam, hogy azok induló sejtszáma 10^6 illetve 10^4 sejt/ml legyen, majd a kémcsöveket 25 °C-os inkubátorba helyeztem. 1 illetve 5 nap után mintákat vettem belőlük, melyet megfelelő hígítás után a tejsavbaktériumok számára vonatkozóan lemezöntéssel (MRS agar), élesztő-száma vonatkozóan szélesztéssel vizsgáltam (PDA) a 3.3.1.1. pont szerint.

4.3.8.2. *Lactobacillus* törzsek felülúszóinak hatás-vizsgálata élesztők szaporodására

A 3.3.2.2. és 3.3.3.3. pontokban leírt módszerrel a vizsgált tejsavbaktérium törzsek sejtmentes, *nem*-pH beállított (savas pH-jú), illetve pH-beállított (pH 6,5) felülúszóit állítottam elő csicsókalén. Az így elkészített felülúszók közül a *nem*-pH beállítottal a törzsek felülúszójában található gátló anyagok összességét, míg a pH-beállított felülúszóval a sav-hatáson kívül fellépő hatást tudtam megvizsgálni. Ebben az esetben is az előbb leírtak szerint

előkészítettem a csicsókalevet (3.3.8.1.), majd ugyanannyi mennyiségű felülszót adtam hozzá és ezt oltottam be élesztővel, hogy az induló sejtszám 10^4 sejt/ml legyen. 25 °C-os inkubátorba helyeztem a tápleveket, majd 1 ill. 5 nap után mintákat vettem belőlük, melyet élesztő-számra vonatkozóan szélesztéssel vizsgáltam (PDA) a 3.3.1.1. pont szerint.

4.3.8.3. Vegyes kultúra és felülszó hatásának vizsgálata

A vegyes kultúra kialakítására szelektált törzseket az előszaporítás után 1:1 arányban oltottam be az előkészített csicsókalébe, hogy az induló összes tejsavbaktérium-szám 10^6 sejt/ml legyen, illetve a kevert kultúrával csicsókalén előállított pH-beállított ill. nem-beállított felülszót 1:1 arányba kevertem a tápléhez. Az így elkészített mintákat a vizsgált élesztővel beoltva (10^4 sejt/ml) 25 °C-os inkubátorba helyeztem, majd 1 és 5 nap után a 3.3.1.1. pontban leírtak szerint meghatároztam a sejtszámot.

4.3.8.4. Tisztított fehérjejellegű komponens vizsgálata

Az előkészített csicsókalé 5 ml-ébe 500 µl, a 3.3.4.4. pontban leírtak szerint elkészített, tisztított fehérjejellegű gátló anyagot tettem, majd keverés után beoltottam a vizsgált élesztővel, hogy a sejtkoncentráció 10^4 sejt/ml legyen. Az így elkészített mintát 25 °C-os inkubátorba, illetve a kombinált kezelés esetén 6 °C-os hűtőszekrénybe helyeztem és 1 ill. 5 nap után a 3.3.1.1. pontban leírtak szerint meghatároztam az élesztő sejtszámot.

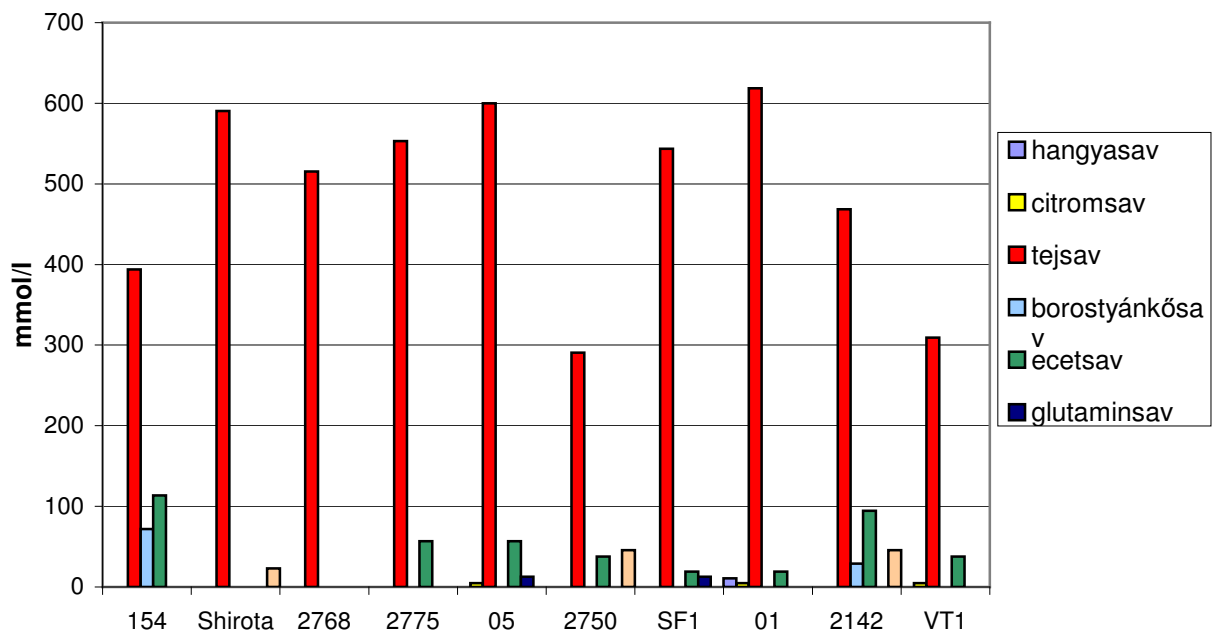
5. EREDMÉNYEK

5.1. Laktobacillusok által termelt antimikrobiális anyagok meghatározása és hatásvizsgálata

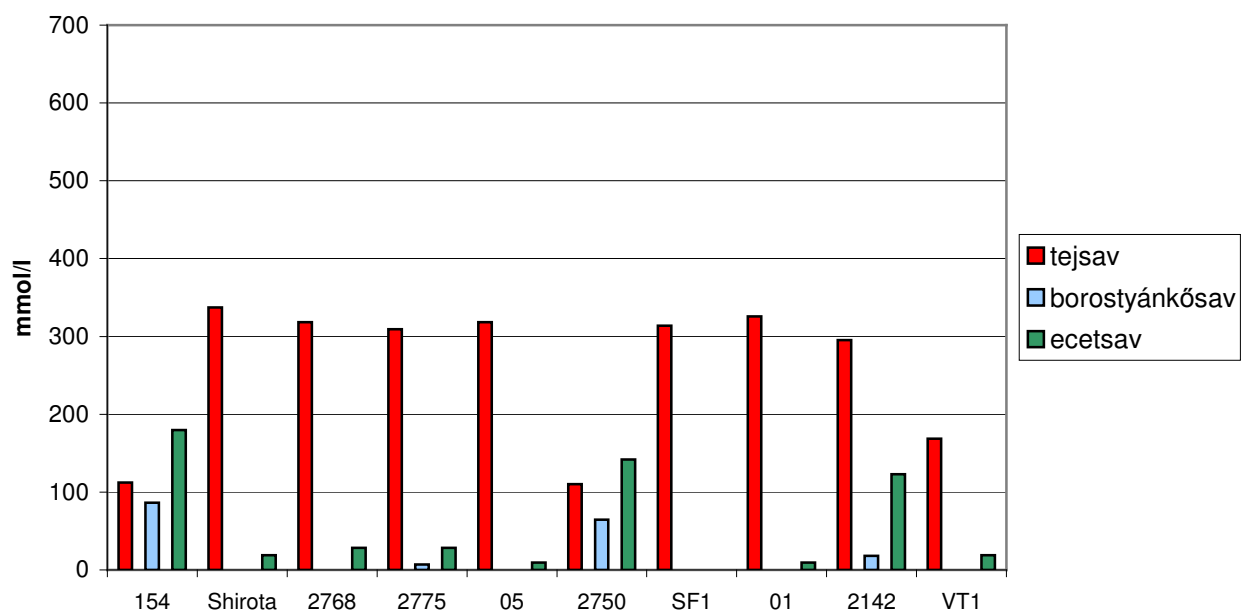
5.1.1. Savtermelés összehasonlítása a különböző tápleveken

A tejsavbaktériumok által termelt, leghatékonyabb antimikrobiális anyagok közé tartozó szerves savak izotachoforetikus módszerrel történő méréséből származó eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált *Lactobacillus* törzsek által kiválasztott savak előfordulása és azok mennyisége a felülúszóban függ a növekedésükre használt táplétól, az abban található tápanyagoktól. Általánosságban elmondható, hogy nevükhöz méltóan, a termelt savak közül legnagyobb arányban tejsavat termeltek. Ez az MRS táplé esetén minden törzsre elmondható (4. ábra), viszont a csicsóka táplén történő szaporításkor a 154 és 2750 jelű törzsek több ecetsavat szintetizáltak, mint tejsavat (5. ábra). E két fő szerves sav mellett MRS táplén egyes törzsek borostyánkőssavat (154, 2142), vajsavat (2142, 2750, Shirota), glutaminsavat (05, SF1), citromsavat (01, 05, VT1) és hangyasavat is (01) termeltek. E sav-profilok csicsóka táplé esetén jelentősen megváltoztak, mivel ebben az esetben a tej-, és ecetsav mellett csak borostyánkőssavat mértem egyes törzseknél (154, 2142, 2750, 2775).

A termelt savak mennyiségét tekintve látható, hogy MRS-ben körülbelül kétszer annyi (290-620 mM/L) tejsav képződött, mint a csicsóka táplén (110-340 mM/L). A csicsóka táplében a fő szénhidrátforrás az inulin, illetve a feldolgozás során az abból keletkezett oligoszacharidok. Ezt elsőként a *Lactobacillusok* által termelt extracelluláris inulináz (β -fruktofuranozidáz) enzim bontja le, majd ennek termékeit, a fruktózt, illetve a kis méretű (2-3 fruktóz egységből álló) oligoszacharidokat veszik fel és ezeket az intracelluláris β -fruktozidáz enzimmel fruktózzá bontják tovább, ez adja az energiatermelő folyamataik alapját (KAPLAN & HUTKINS 2003, GOH et al. 2006). Ugyanakkor az is látható, hogy a 154, 2142 és 2750 jelű törzsek MRS táplében a tejsav mennyiségéhez viszonyítva jelentősebb mennyiségű ecetsavat termeltek, amely tulajdonságuk a csicsóka táplében olyannyira előtérbe került, hogy ott a 154 és 2750 jelű törzsek több ecetsavat termeltek, mint tejsavat, de a 2142-es törzs ecetsavtermelése is megnőtt, főként, ha ezt a lecsökkent tejsavmennyiséghez viszonyítjuk.



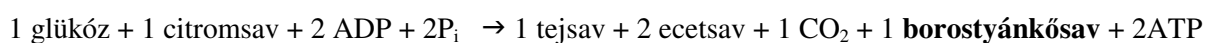
4. ábra: *Lactobacillus* törzsek savtermelése MRS táplevesben (izotachoforetikus mérés)



5. ábra: *Lactobacillus* törzsek savtermelése csicsóka táplevesben (izotachoforetikus mérés)

A megnövekedett ecetsav-termelés egyrészt a felhasználható szénhidrátforrásból adódik, amit alátámaszt, hogy MAKRAS és munkatársai (2005) is azt találták, hogy inulin típusú, különböző polimerizációs fokú oligofruktóz szubsztráton a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 törzs is jelentős mennyiségű (2-2,5-szer több) ecetsavat termelt, a kontroll táptalajhoz képest. Az általam vizsgált többi törzs csak annyiban igazolja ezt, hogy amíg

némelyiknél MRS táplén nem mértem ecetsavtermelést, a csicsókán már kis mértékben találtam (2768, Shirota), míg más esetben többet mértem az MRS-ben megfigyelthez képest (VT1). Másrészt a három, arányaiban jelentős ecetsav-termelést mutató törzs esetén ez az eredmény a többtől eltérő fermentációs tulajdonságukból is adódik. Már régen megfigyelték és megállapították, hogy a tejsavbaktériumok által képzett tejsav:ecetsav arány az egyes törzsek esetén egyrészt függ a tápközegtől, másrészt az egyes törzsek homo-, illetve heterofermentatív jellegétől (CHRISTENSEN et al. 1958). Ebből kiindulva meghatározták a fermentációs tulajdonságokra jellemző sav arányt, amelynél figyelembe vették, hogy heterofermentatív jellemnél is lehetséges kis mértékű ecetsav termelés, így a 8:1 tejsav:ecetsav arányt tekintették a lehetséges határnak, ami alatt heterofermentatív, felette pedig homofermentatív tulajdonsággal bírnak a törzsek (DOELLE 1969). A tejsav:ecetsav arányt fermentációs hányadosnak (FQ) is nevezik, ami fontos tényező a kovászos kenyér íz-, és állagkialakítása során (CORSETTI & SETTANNI 2007). A sav-arány tápközegtől való függése pedig az adott törzs fakultatív heterofermentatív tulajdonságára utalhat, mivel e törzsek a tápközeg szén-forrásától függően homo-, illetve heterofermentatív metabolizmuson át termelik az energiát (AXELSSON 1998). Ebből kiindulva egyrészt maga ez a tény, hogy a 154, 2142 és 2750 jelű törzsek arányaiban - csicsóka táplé esetén mennyiségében is - több ecetsavat termelnek a tejsavhoz képest, feltételezi heterofermentatív jellegüket (7. táblázat), valamint az is, hogy MRS-ben a 154 és 2142 jelű törzsek, míg csicsóka táplén mind a három törzs, nagyobb mennyiségű borostyánkősavat termel. A heterofermentatív *Lactobacillus*ok között általános tulajdonság, hogy glükóz és citromsav (illetve sói) jelenlétében borostyánkősavat is termelnek a tejsavon és ecetsavon kívül, az alábbi egyenlet szerint (AXELSSON 1998):



Laktobacillusok borostyánkősav termelését MRS táplében már mások is kimutatták, összefüggésbe hozva azt a táplevesben található glükóz és di-ammónium-citrát tartalommal (KANEUCHI et al. 1988, AXELSSON 1998). A borostyánkősav metabolikus útvonal egyenletéből látszik, hogy kétszer annyi ecetsav végtermék képződik, mint tejsav, ami szintén magyarázatot adhat az általam mért nagyobb mennyiségű ecetsavra. A fenti adatokból azt a következtetést vontam le, hogy a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 154, *Lb. plantarum* 2142 és a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2750 törzsek heterofermentatív tulajdonsággal bírnak, míg a többi törzs homofermentatív.

7. táblázat: A vizsgált *Lactobacillus* törzsek tejsav és ecetsav termelése, azok aránya és az ebből adódó fermentatív jellegük

a) MRS-ben

Törzsek	Tejsav	Ecetsav	Fermentációs hányados (Tejsav/ecetsav)	Fermentatív jelleg
	mmol/l			
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> 154	394	114	3,5	<i>hetero</i>
<i>Lb. casei</i> Shirota	590	-	-	homo
<i>Lb. curvatus</i> 2768	516	-	-	homo
<i>Lb. curvatus</i> 2775	553	57	9,7	homo
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 05	600	57	10,5	homo
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2750	291	38	7,7	<i>hetero</i>
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>casei</i> SF1	544	19	28,6	homo
<i>Lb. plantarum</i> 01	619	19	32,6	homo
<i>Lb. plantarum</i> 2142	469	95	4,9	<i>hetero</i>
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	309	38	8,1	homo

b) Csicsóka táplében

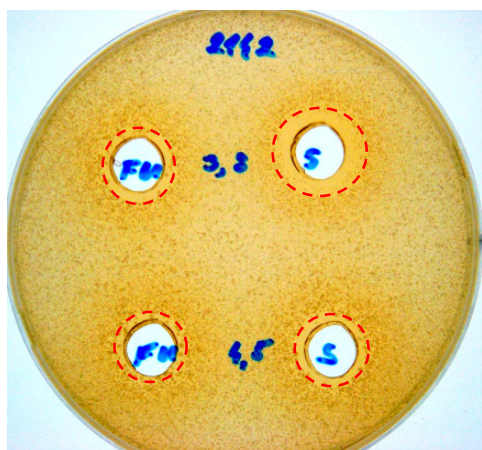
Törzsek	Tejsav	Ecetsav	Fermentációs hányados (Tejsav/ecetsav)	Fermentatív jelleg
	mmol/l			
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> 154	113	180	0,6	<i>hetero</i>
<i>Lb. casei</i> Shirota	337	19	17,8	homo
<i>Lb. curvatus</i> 2768	319	28	11,2	homo
<i>Lb. curvatus</i> 2775	309	28	10,9	homo
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 05	319	9	33,6	homo
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2750	110	142	0,8	<i>hetero</i>
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>casei</i> SF1	314	-	-	homo
<i>Lb. plantarum</i> 01	326	9	34,4	homo
<i>Lb. plantarum</i> 2142	295	123	2,4	<i>hetero</i>
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	169	19	8,9	homo

Ugyanakkor nem találtam lényegesen nagy különbséget a 24. óra után mért sejtszám tekintetében, sem a táplevesek, sem az egyes törzsek között (minden esetben 10^9 telepkepző egység/ml nagyságrendben volt). Ez azzal magyarázható, hogy a homofermentatív jellegű

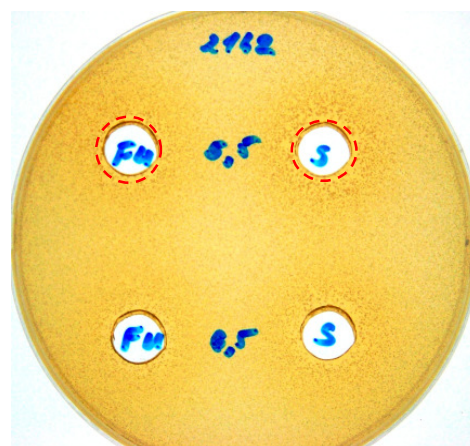
törzsek mind a glükóz (MRS), mind a fruktóz/oligoszacharid esetén (csicsóka) a glikolízisen (Embden-Meyerhof útvonal) keresztül jutnak energiához (1 glükóz/fruktóz → 2 ATP), míg a heterofermentatív törzsek a 6-foszfoglükonsav/foszfoketoláz szénhidrátlebontási útvonalon (1 glükóz/fruktóz → 1 ATP), ami kisebb hatékonyságú, de ez kiegészülve a borostyánkősav metabolikus úttal (1 glükóz → 2 ATP), hasonló mértékű szaporodást biztosít a sejtek számára. Ez utóbbi, heterofermentatív törzsek a csicsóka tápléban az inulin fruktóz-polimer láncáról a hidrolízis során felszabaduló terminális glükóz molekulát használhatják fel a borostyánkősav útvonalhoz.

5.1.2. Savval kiegészített táplevek hatása a *Candida glabrata* szaporodására

Az izotachoforézissel mért értékeknek, így a vizsgált törzsek savtermelésének megfelelően kialakított, ecet-, és tejsavval kiegészített MRS táplevek (S) gátló hatásának vizsgálatakor azt tapasztaltam, hogy a teszt-organizmusként használt *Candida glabrata* szaporodása a 3,8-as és 4,5-ös pH-jú minta esetén jelentős mértékben, míg a nagyobb pH értékeknél kevésbé gátlódott (6. ábra).



a)



b)

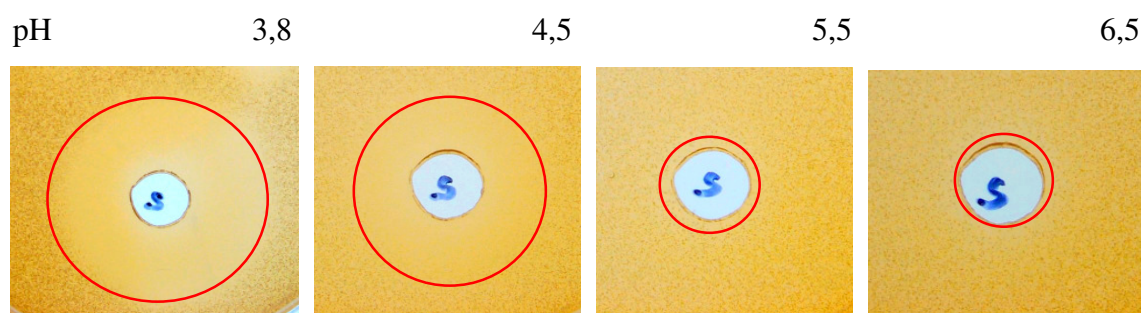
6. ábra: A *Lactobacillus plantarum* 2142-es törzs felülűszójának, és az általa termelt savaknak megfelelően kialakított savval kiegészített táplé hatása a *Candida glabrata* élesztőre a pH függvényében

a) 3,8 és 4,5 pH értéken, b) 5,5 és 6,5 pH értéken

FU: a 2142-es törzs felülűszója, S: sav-tartalmú MRS táplé, 3,8; 4,5; 5,5; 6,5 – a mintaoldatok beállított pH értékei

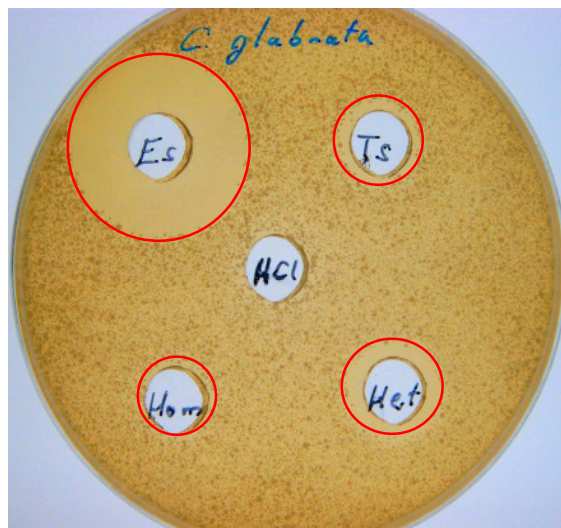
Ez a tendencia az adott *Lactobacillus* törzs (2142) által kialakított felülúszó (FU) esetén is megjelent, bár kisebb mértékben, aminek magyarázata az lehet, hogy a változatlan, tejsavbaktériumok által nem módosított összetételű MRS-ben a tejsav hatása jobban érvényesült.

A savval kiegészített táplevek növekedésgátló hatásának pH-függő tendenciája látható kiemelve a 7. ábrán is. Ezzel is igazolva a már más kutatók (SIMON & BLACKMAN 1949, LIND et al. 2005) által leírt hatást, miszerint a gyenge savak antimikrobiális hatásukat jobban kifejtik alacsony pH-n, mint a neutrálisához közeli értéken, ami a gyenge savak nagyobb pH értéken történő disszociációjára vezethető vissza. Noha egyes kutatók (EKLUND 1983) disszociált savak esetén is megfigyeltek mikroba-növekedést gátló hatást, az általam alkalmazott vizsgálati körülmények között én ezt elhanyagolhatónak véltem.



7. ábra: Sav-tartalmú táplé hatása a *Candida glabrata* élesztőre a pH függvényében

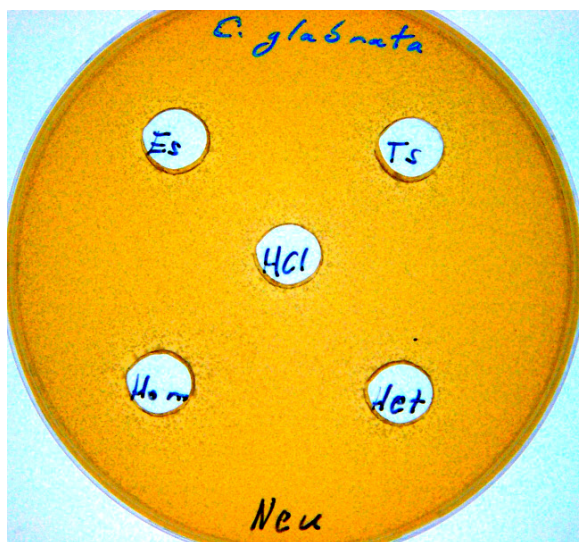
A két legjelentősebb, *Lactobacillus*ok által termelt sav, az ecet-, és tejsav külön-külön, illetve homo-, és heterofermentatív jellegnek megfelelő arányú keverékük vizsgálatánál szintén a már korábban megállapított (VÁZQUEZ et al. 2005, LIND et al. 2005) tények igazolását kaptam, miszerint egy adott pH értéken (jelen esetben 3,8) azonos savegyenértékű (jelen esetben 600 mM) ecetsav mikroba-gátló hatása jobban érvényesül, mint a tejsavé, a disszociációs állandójuknak megfelelően. Ez jól látható a 8. ábrán, ahol megfigyelhető a heterofermentatív jellegnek megfelelő savkeverék gátló hatása is, ami szintén az ecetsav nagyobb aktivitását mutatja, míg az alacsony pH (3,8) önmagában (HCl-dal beállítva) nem váltott ki negatív hatást a teszt-organizmus szaporodására.



8. ábra: Ecet-, és tejsav illetve ezek homo-, és heterofermentatív arányú keverékének hatása a

Candida glabrata szaporodására 3,8-as pH értéken

Es: ecetsav (600 mmol/l), Ts: tejsav (600 mmol/l), HCl: 3,8-as pH értékű sósav oldat, Hom: homofermentatív arányú ecetsav-tejsav keverék (330 mmol tejsav: 10 mmol ecetsav/l), Het: heterofermentatív arányú ecetsav-tejsav keverék (350 mmol tejsav: 100 mmol ecetsav/l)



9. ábra: Ecet-, és tejsav illetve ezek homo-, és heterofermentatív arányú keverékének hatása a

Candida glabrata szaporodására 6,5-ös pH értéken

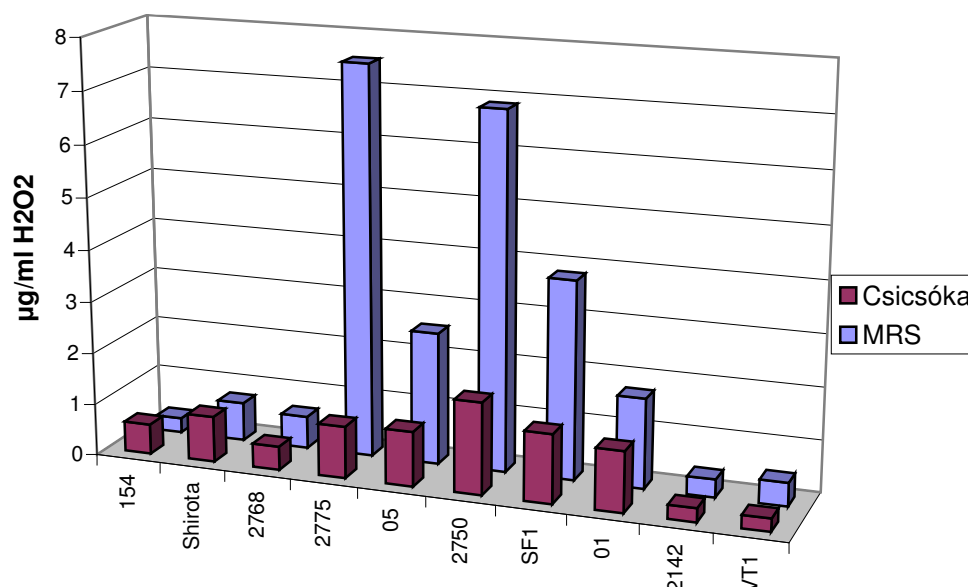
Es: ecetsav (600 mmol/l), Ts: tejsav (600 mmol/l), HCl: 6,5-ös pH értékű sósav oldat, Hom: homofermentatív arányú ecetsav-tejsav keverék (330 mmol tejsav: 10 mmol ecetsav/l), Het: heterofermentatív arányú ecetsav-tejsav keverék (350 mmol tejsav: 100 mmol ecetsav/l)

Ugyanezen keverékek 6,5-ös pH-ra állított mintái a 9. ábrán látható módon elveszítették gátló hatásukat. Ezen eredményekből megállapítottam, hogy alacsony pH értéknél a vizsgált törzsek által termelt szerves savak gátló hatása érvényesül, míg a felülúszó pH-jának közel neutrális értékre történő állításával ez a hatás eltűnik, és az ekkor megfigyelhető esetleges mikroba-gátló hatás más komponensnek tulajdonítható.

5.1.3. Hidrogén-peroxid termelés a különböző tápleveken

A *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid termelésének mérési eredményei azt mutatják, hogy az MRS-ben előszaporított sejtek nagyobb mennyiségben választották ki azt, mint a csicsóka-táplén történő előszaporítás esetén (10. ábra). Ugyanakkor látható, hogy azok a törzsek, amelyek az MRS-ben történő előszaporítás után nagyobb mennyiségű hidrogén-peroxidot termeltek, a csicsóka-táplén történő szaporítás után is több peroxid-termelést mutattak, a többi vizsgált törzshöz képest. A vizsgált *Lactobacillusok* közül a 2750-es (MRS-ben 6,87 µg/ml, csicsókában 1,77 µg/ml) és a 2775-ös (MRS-ben 7,53 µg/ml, csicsókában 1 µg/ml) jelű törzsek esetén mértem a legnagyobb hidrogén-peroxid termelést. A hidrogén-peroxid termelést természetesen befolyásolják a környezeti feltételek, többek között a rendelkezésre álló szénhidrát, annak mennyisége, a táplében lévő ásványi anyagok (BARNARD & STINSON 1999), amivel magyarázhatók a mért H₂O₂ különbségek. Az MRS-ben történő előszaporítás utáni nagyobb hidrogén-peroxid koncentrációban, az ebben a táplében található magnézium és mangán vegyületek is szerepet játszhatnak, mivel ezek jelenlétében nagyobb hidrogén-peroxid termelést detektáltak (MURPHY & CONDON 1984, BARNARD & STINSON 1999). RABE és HILLIER (2003) főként a heterofermentatív törzsek esetén figyelték meg, hogy mangán jelenlétében nőtt a hidrogén-peroxid termelés, míg mások úgy találták, hogy a heterofermentatív törzsek általánosságban több hidrogén-peroxidot képeznek (SAKAMOTO & KOMAGATA 1996).

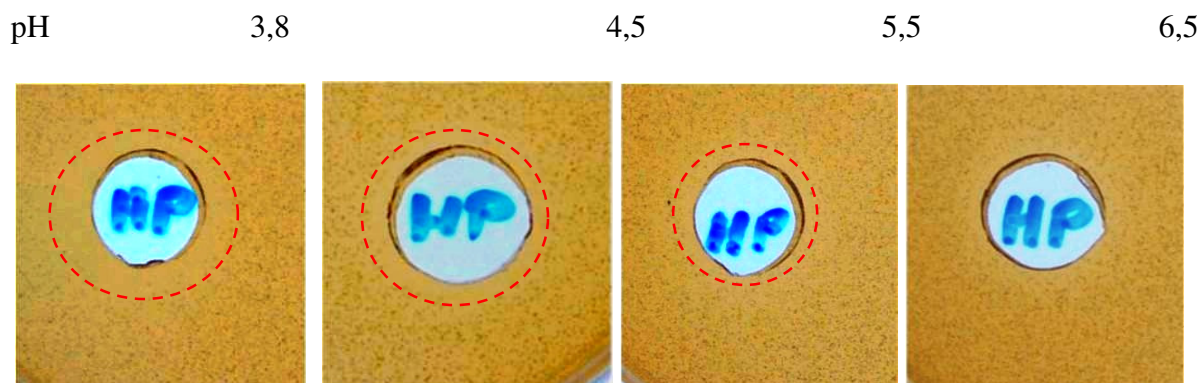
Amint az a 10. ábrából is látható, az általam heterofermentatív tulajdonságúnak meghatározott törzsek, a 154, 2142 és 2750 jelűek ezt nem igazolták általánosan, hiszen csak a 2750-es törzs mutatott nagyobb peroxid termelést. Tehát nem találtam összefüggést a heterofermentatív jelleg és a hidrogén-peroxid termelés között.



10. ábra: *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid termelése csicsóka és MRS táplevesen történő előszaporítás után

5.1.4. Hidrogén-peroxid hatása a *Candida glabrata* élesztő szaporodására

A mért értékeknek megfelelően kialakított, hidrogén-peroxiddal kiegészített MRS táplevek *Candida glabrata* teszt-organizmusra kifejtett szaporodásgátló hatása, gyenge sav tulajdonságának megfelelően, a minta pH-jának növelésével arányosan csökkent (11. ábra). A gátlás mértéke a 3,8-as és a 4,5-ös pH értéken még jól látható, de a magasabb értékeknél hatása már eltűnik, így ebből következően a pH beállított felülúszó esetén sem számolhatunk már a hidrogén-peroxid mikrobagátló hatásával. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy mivel a hidrogén-peroxid egy igen erős oxidációs tulajdonsággal rendelkező anyag, könnyen reakcióba léphet a környezetben, jelen esetben az MRS-ben, található anyagokkal, ami csökkenti az esetleges mikrobagátló aktivitását.



11. ábra: Hidrogén-peroxid-tartalmú táplé hatása a *Candida glabrata* élesztőre a pH függvényében

5.2. Laktobacillusok élesztőgátló hatásának vizsgálata

5.2.1. A *Lactobacillus* törzsek közvetlen hatása élesztőkre

A telep-teszt módszerrel végzett vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a *Lactobacillus* törzsek, egymáshoz mérten különböző mértékben gátolták a teszt-élesztők szaporodását, de az is látható, hogy ez a hatás nagyban függ magától az élesztőtől is (8. táblázat).

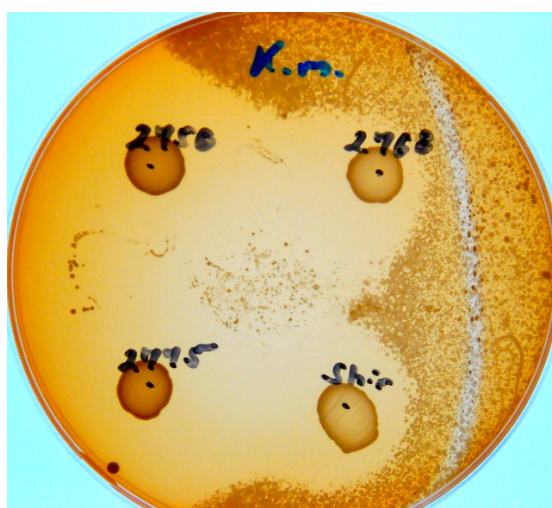
8. táblázat: *Lactobacillus* törzsek közvetlen hatása élesztőkre

Törzsek	<i>Candida famata</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Kluyv. marxianus</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
154	++	+/-	+++++	-
Shirota	++++	++	+++	-
2768	++	++	+++	-
2775	+++	+	+++++	-
05	+/-	-	+++++	-
2750	-	+	++++	-
SF1	-	-	++	-
01	++	+++	+++++	-
2142	+++	+++++	++++	-
VT1	++	-	+++	-

- : nincs gátlás; +/- : gyenge gátlás, 13-14 mm; + : mérsékelt gátlás, a gátlási zóna nem tiszta, 15-17 mm; ++ : jó gátlás, gátlási zóna viszonylag tiszta, 18-20 mm; +++ : nagy gátlás, tiszta gátlási zóna, 21-23; ++++ : erős gátlás, teljesen feltisztult, nagy gátlási zóna, 24-33 mm; +++++ : teljes gátlás, > 33 mm (a mm értékek magukban foglalják a telep átmérőjét is, amely általában 10 mm volt)

Ezt mutatja, hogy míg a *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* törzs növekedését minden egyes *Lactobacillus* gátolta (12. ábra), addig a *Saccharomyces cerevisiae* esetén nem mutattak gátló aktivitást, ami jól látható a 13. ábrán is. A *Candida* törzseknél viszont a *Lactobacillus*-ok

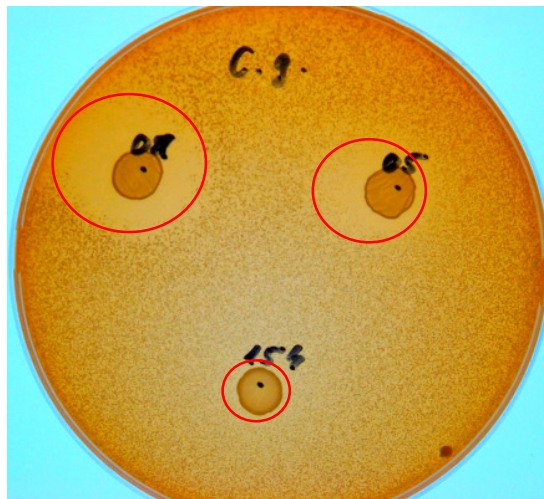
változatos hatást mutattak (14. ábra). Mindazonáltal az eredményekből látható, hogy gátló hatásukban a 01 és 2142 jelű törzs tűnt ki a többi vizsgált törzs közül, megemlítendő, hogy mindketten a *Lactobacillus plantarum* fajhoz tartoznak. Ugyanakkor a heterofermentatív jelleget mutató törzsek (154, 2142, 2750) nem mutattak általánosan jelentősebb gátló aktivitást a tesztélesztőkkel szemben, ami pedig nagyobb ecetsavtermelésük okán elvárható lett volna, közülük csak az említett 2142-es törzs tűnt ki. Az általam kapott eredmények egybeesnek a STRÖM és munkatársai (2002) által megfigyelt gátló tulajdonsággal, mivel ők is azt tapasztalták a *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 törzs gátlóhatásának vizsgálata során, hogy az általuk teszt-organizmusként használt élesztők közül a *Kluyveromyces marxianus* volt a legérzékenyebb, majd egy *Candida* faj, a *Saccharomyces cerevisiae* pedig csak kevésbé gátlódott.



12. ábra: *Lactobacillus* törzsek közvetlen hatása a *Kluyveromyces marxianus* törzsre

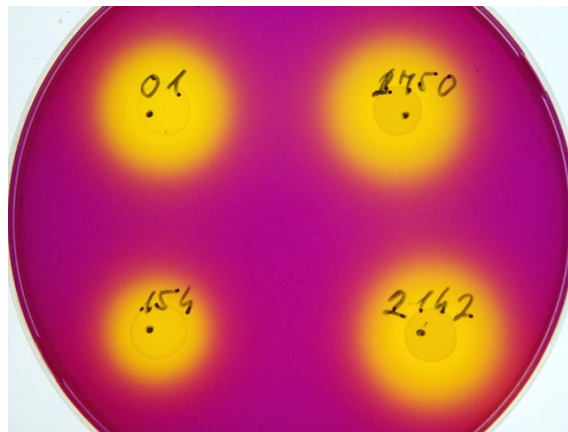


13. ábra: *Lactobacillus* törzsek közvetlen hatása a *Saccharomyces cerevisiae* törzsre



14. ábra: *Lactobacillus* törzsek közvetlen hatása a *Candida glabrata* törzsre

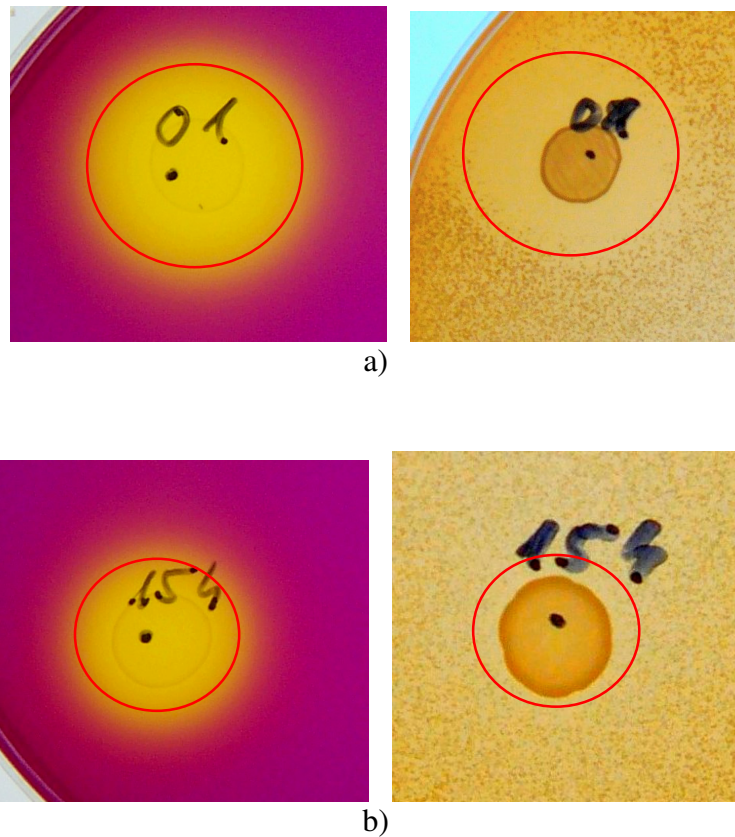
Mivel a tejsavbaktériumok elsődleges gátló hatása az általuk termelt szerves savakból adódik, e hatást, illetve, hogy a savak hatását mennyire befolyásolja az agar esetleges pufferoló kapacitása, a táptalajba kevert brómkrezolbíbor indikátoros vizsgálat 15. ábrán látható eredményei mutatják.



15. ábra: A tejsavbaktérium-telepek pH csökkentő hatása

A telepek körül a pH csökkenés miatt kialakult sárga zóna egyértelműen jelzi a termelt savak hatását, illetve mennyiségét és egyúttal azt, hogy a táptalaj nem befolyásolja ezek pH csökkentő hatását. Ugyanakkor az egyes indikátor zónák mellé rendelt gátlási zónák méreteinek összehasonlításakor egyértelműen látszik (16. ábra), hogy azok mérete többnyire megegyezik, amiből azt a következtetést vontam le, hogy a kinőtt *Lactobacillus* telepek okozta közvetlen gátló hatás és az általuk termelt szerves savak, azok pH csökkentő hatása

között szoros összefüggés van, noha a gátlásban más szintetizált komponensek is részt vesznek/vehetnek.



16. ábra: A 01-es (a) és a 154-es (b) törzs pH csökkentő és szaporodásgátló hatásának összehasonlítása a *Candida glabrata* élesztő estén

5.2.2. Neutrális pH-ra állított felülúszó hatása az élesztőkre

A neutrális pH-ra beállított, hőkezelt felülúszó élesztő-szaporodásgátló hatásának eredményei a 9. táblázatban láthatók. Az eredmények azt mutatják, hogy az élesztők közül a *Saccharomyces cerevisiae* volt a legkevésbé érzékeny a felülúszókra, mivel csak a 2768-as törzs esetén kaptam erős gátlást, míg a *Candida glabrata*-nál és *Kluyveromyces marxianus*-nál több esetben tapasztaltam nagy (++) gátlást.

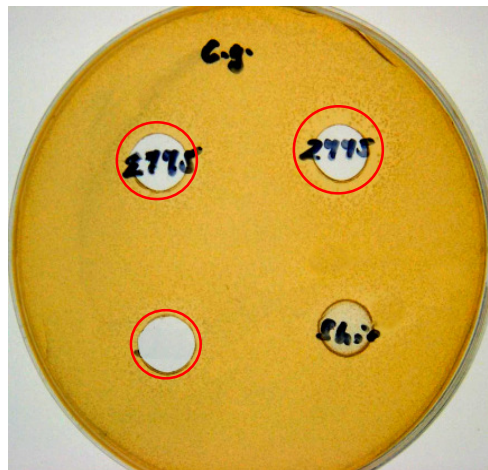
9. táblázat: Laktobacillusok felülúszójának (pH 6,5) hatása élesztőkre

Felülúszók, a törzsek számával jelölve	Gátlási zóna a teszt-élesztőre		
	<i>Candida glabrata</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
154	+++	++	+
Shirota	+/-	+/-	+
2768	+/-	++	+++
2775	++	+	-
05	+	+	+
2750	++	++	+
SF1	-	+	+/-
01	++	++	+/-
2142	++	++	+/-
VT1	++	++	+/-

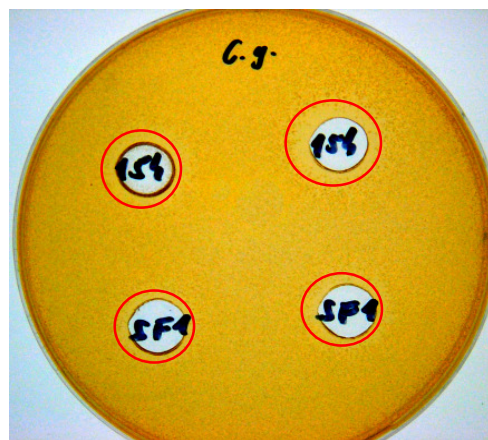
-: nincs gátlás, +/-: gyenge gátlás, +: mérsékelt gátlás, ++: nagy gátlás, +++: erős gátlás

A három teszt-élesztőre kifejtett hatásokat összevetve az látható, hogy öt olyan *Lactobacillus* törzs van (01, 154, VT1, 2142, 2750, 2768), amely legalább két élesztő esetén nagy, és a harmadik esetén legalább gyenge gátlást mutat. E törzsek között a heterofermentatívok mindegyike (154, 2142, 2750) jelen van. Emellett a *Lb. casei* Shirota törzsre kapott eredményeim megegyeznek DE MUYNCK és munkatársai (2004) által végzett vizsgálatokkal, miszerint ennek a törzsnek csak gyenge antifungális aktivitása van.

A 17-18. ábrákon jól látható a felülúszók hatása a *Candida glabrata* (17. ábra) és a *Kluyveromyces marxianus* (18. ábra) élesztők szaporodására.

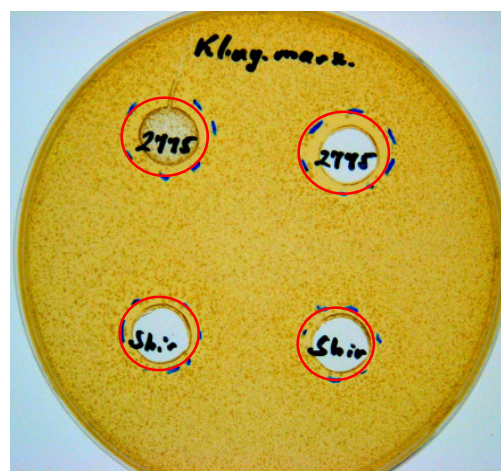


a)



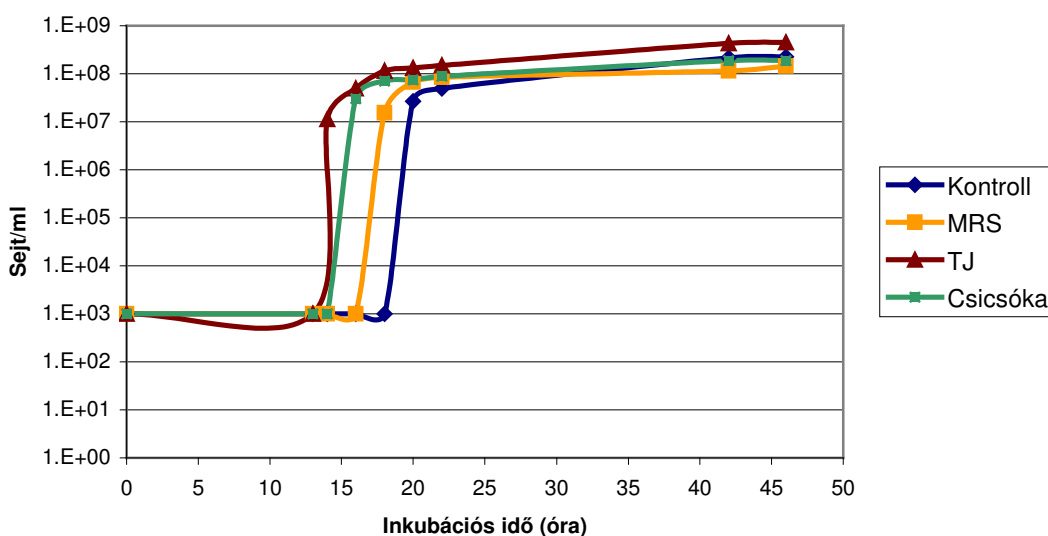
b)

17. ábra a), b): *Lactobacillus*ok pH beállított, hőkezelt felülúszójának hatása a *Candida glabrata* élesztő szaporodására

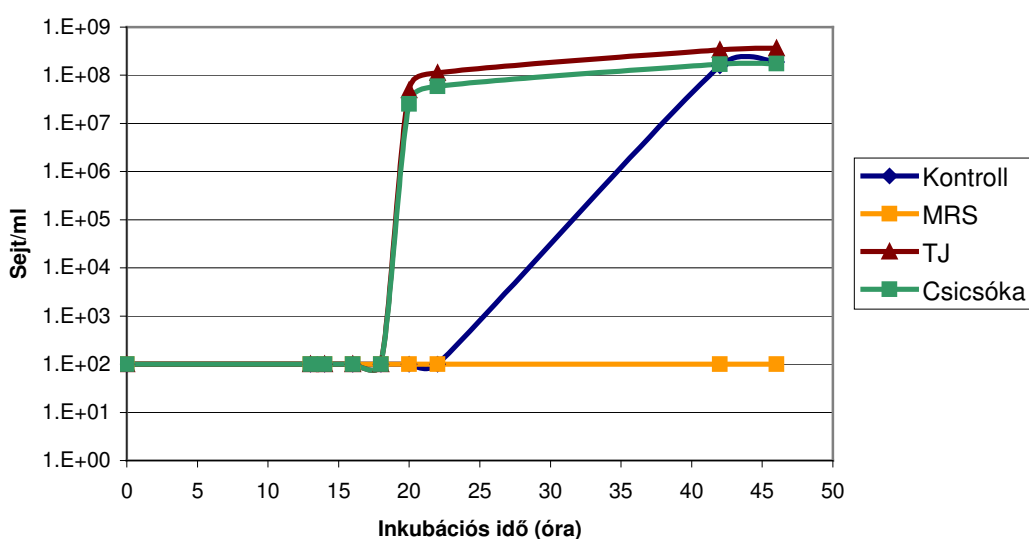


18. ábra: *Lactobacillus*ok pH beállított, hőkezelt felülúszójának hatása a *Kluyveromyces marxianus* élesztő szaporodására

A sejtmentes, pH-beállított felülúszó élesztő-tesztorganizmusra kifejtett szaporodásgátló hatását mikrotiterlemez-es turbiditásméréssel is megvizsgáltam, aminek a *Candida glabrata* teszt-élesztőre kapott eredményei a 19-20. ábrákon láthatók. Amíg a *Candida glabrata* élesztő 10^3 sejt/ml induló koncentrációjú szuszpenziója esetén egyik felülúszó sem gátolta lényegesen a szaporodását (mindegyik esetben 10^8 nagyságrendű sejtszámot mértem 16-32 órán belül), addig a 10^2 sejt/ml induló sejtkoncentráció esetén az élesztő, MRS-felülúszó mellett még 45 óra után sem mutatott a turbiditásméréssel kimutatható szaporodást, azaz nem érte el a 10^7 sejtszám/ml sejtkoncentrációt.



19. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142-es törzs pH beállított, hőkezelt felülúszójának turbiditásméréssel meghatározott hatása a *Candida glabrata*-ra, kezdeti 10^3 élesztősejt/ml esetén



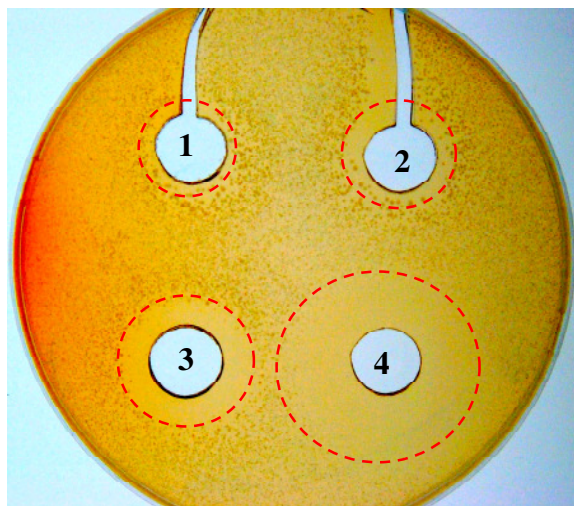
20. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142-es törzs pH beállított, hőkezelt felülúszójának turbiditásméréssel meghatározott hatása a *Candida glabrata*-ra, kezdeti 10^2 élesztősejt/ml esetén

Az eredményekből látható, hogy az élesztőgátló komponens legnagyobb mennyiségben az MRS táplében képződött, a csicsóka illetve a paradicsomos táplevesben vagy nem, vagy csak olyan kis mennyiségben, amely már nem mutatott gátló aktivitást, vagy az ezen tápleveken képződött felülúszóban található, a tesztorganizmus szaporodására kedvező hatású anyagok túlsúlyban voltak a gátló komponenshez képest. Ez utóbbi lehet a magyarázata, hogy jobb szaporodás figyelhető meg a csicsóka és paradicsomos táplevesben, mint a kontrol esetén.

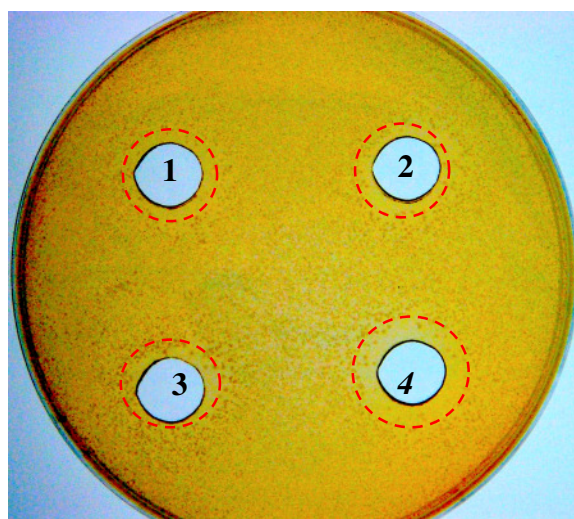
Mivel a korábbiakban leírt kísérletek szerint a neutrális pH értéken a szerves savak és a hidrogén-peroxid mikrobagátló hatása eltűnik, illetve minimálisra csökken, a közel semleges pH értékű felülúszó gátló hatásából a *Lactobacillus*-ok által termelt egyéb komponensre lehet következtetni. Erre utal az is, hogy a gátlás mértéke a gátolandó sejt koncentrációjától függ, azonos felülúszó töménység esetén, így egy olyan anyagra lehet következtetni, amely korlátozott számban fordul elő, s egyszer kifejtve gátló aktivitását, elvész a hatása, pont úgy, mint a bakteriocinek esetén. A továbbiakban ezért ebbe az irányba folytattam kísérleteket. Első lépésben a felülúszó töményítésével próbáltam a komponens gátló hatását kiemelni, fokozni.

5.2.3. Töményített, közel neutális pH-ra állított felülúszó hatása az élesztők szaporodására

A 21. ábrán látható az MRS-en képzett, töményített, neutrális felülúszó (4-es számú minta) gátló hatása a *Candida glabrata* teszt-élesztőre, amely igen jelentősnek mondható. A töményített MRS tápleves önmagában is gátolta a szaporodást, de a felülúszó egyértelműen jóval nagyobb mértékben, ami az abban található, a tejsavbaktériumok által kiválasztott anyagra utal. A paradicsomos táplé esetén szintén megfigyelhető mind a töményített tápleves, mind a felülúszó gátló hatása, de itt is a felülúszó aktivitása egyértelműen nagyobb (22. ábra).



21. ábra: A *Lb. plantarum* 2142-es törzs MRS-en termelt, töményített felülúszójának hatása *Candida glabrata* élesztőre
 1: MRS tápleves; 2: nem töményített felülúszó; 3: töményített MRS tápleves; 4: töményített felülúszó



22. ábra: A *Lb. plantarum* 2142-es törzs paradicsomleves-táplén termelt, töményített felülúszójának hatása *Candida glabrata* élesztőre
 1: TJ tápleves; 2: nem töményített felülúszó; 3: töményített TJ tápleves; 4: töményített felülúszó

A három vizsgált táptalaj közül az MRS táplén képzett felülúszó mutatta a legjobb gátló aktivitást (10. táblázat), a paradicsomos táplé esetén kisebb mértékben, míg a csicsóka táplén képződött, töményített felülúszó csak kis mértékben gátolt, bár ez utóbbi esetén a diffúzió is nehezen, jóval hosszabb idő alatt és nem teljes mértékben ment végbe a vizsgálatok során, ezért ez utóbbi érték nem teljesen összehasonlítható az első kettővel.

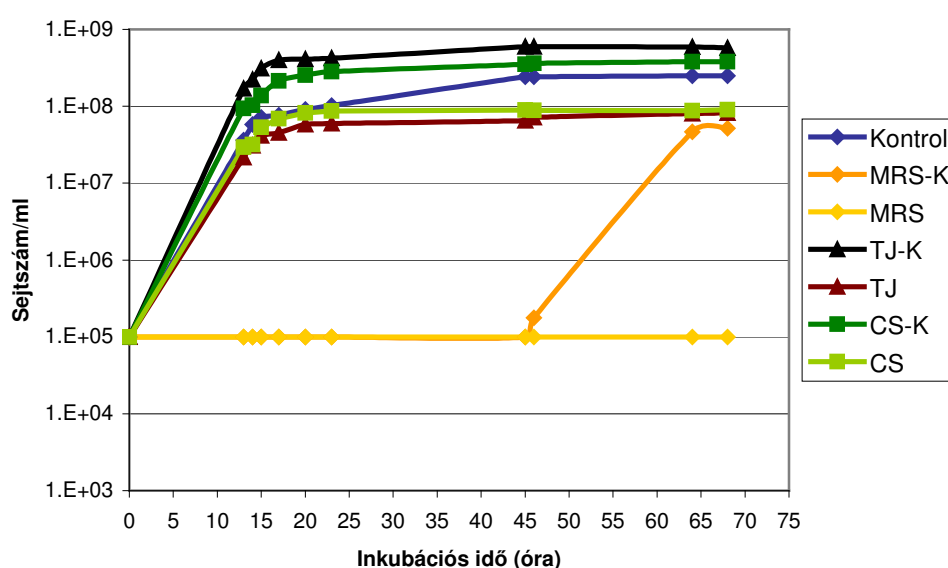
10. táblázat: Töményített, illetve nem töményített táplemek és felülűszók gátló hatása *Candida glabrata* élesztőre

	MRS	MRS-TK	MRS-T	TJ	TJ-TK	TJ-T	CS	CS-TK	CS-T
Gátlás mértéke	++	+++	+++	++	++	+++	+	-	+

MRS: MRS táplén szaporított tejsavbaktérium nem töményített felülűszója; MRS-TK: töményített MRS táplé; MRS-T: MRS táplén szaporított tejsavbaktérium töményített felülűszója; TJ: paradicsomleves táplén szaporított tejsavbaktérium nem töményített felülűszója; TJ-TK: töményített paradicsomleves táplé; TJ-T: TJ táplén szaporított tejsavbaktérium töményített felülűszója; CS: csicsóka táplén szaporított tejsavbaktérium nem töményített felülűszója; CS-TK: töményített csicsóka táplé; CS-T: csicsóka táplén szaporított tejsavbaktérium töményített felülűszója.

-: nincs gátlás, +: mérsékelt gátlás, ++: nagy gátlás, +++: erős gátlás

A turbiditásmérési vizsgálat eredményeiből (23. ábra) viszont az látszik, hogy a töményített táplé önmagában nem gátol sem a csicsóka, sem a paradicsomleves-táplé esetén, ellenben a töményített MRS mellett csak az inkubáció 45. órája után mutatott a teszt-élesztő látható szaporodást. A felülűszók közül a paradicsomleves és a csicsóka táplén képződtek csak kevésbé gátolták az élesztő szaporodását: még ugyanazon nagyságrenden belül mértem a sejtszámot - noha a kontrollhoz képest csak feleannyit. Az MRS-en képződött, töményített felülűszó mellett viszont még 68 óra után sem detektáltam sejtszaporodást, tehát nem érte el a 10^7 sejtszám/ml sejtkoncentrációt.



23. ábra: A 2142-es törzs töményített felülűszójának (MRS, TJ, CS) és a töményített táplemek (MRS-K, TJ-K, CS-K) hatása *Candida glabrata* élesztő szaporodására.

A turbiditásméréssel kapott eredmények, tendenciájukat tekintve megegyeznek az agardiffúzióval mért gátlással, miszerint a töményített táplevek esetén csak az MRS mutatott jeletős gátlást, míg a töményített felülúszók mindegyike gátolta a tesztorganizmus szaporodását, de ezek közül is legjelentősebben az MRS-en képződött felülúszó.

A töményített felülúszó vizsgálatának eredményeiből jól látható, hogy a felülúszó tartalmaz olyan gátló komponens/komponenseket, amelyek a felülúszó pH-jának neutrális értékre állításából következően, nem a gyenge savakra és a hidrogén-peroxidra utalnak. Mivel közismert tény, hogy a *Lactobacillus*-ok termelhetnek bakteriocineket, amely egy fehérjejellegű antibakteriális anyag, illetve egyes kutatók beszámoltak tejsavbaktériumok által termelt, hasonlóan fehérjejellegű antifungális anyagról is (ROY et al. 1996, OKKERS et al. 1999, MAGNUSSON & SCHNÜRER 2001), ezért a következő lépésként fehérjejellegű komponens kimutatását, tisztítását próbáltam véghezvinni.

5.3. Fehérjejellegű komponens vizsgálata

5.3.1. Fehérjejellegű komponens tisztítása

A felülúszóban található, feltehetően fehérjejellegű komponensek tisztítását ammónium-szulfátos kicsapással és szerves oldószeres kivonással is megpróbáltam, de az így kapott minta mennyisége és hatása alulmúlta várakozásomat, így a bakteriocinek tisztítására használt adszorpciós/deszorpciós módszerrel kíséreltem meg a tisztítást, abból a megfontolásból is kiindulva, hogy ez a módszer a legkíméletesebb, ez hat kémiaiilag legkevésbé a tisztítandó fehérjére és „élelmiszer-barát”, amely az esetleges további felhasználás során előnyös. Az irodalmi adatok alapján elvégzett adszorpciós/deszorpciós módszer három, egymástól egyes lépésekben különböző változatának hatékonyságát a tisztított komponens szaporodásgátló hatása alapján hasonlítottam össze. Tesztorganizmusként olyan *Lactobacillus*-okat választottam, amelyek az adott törzs neutrális felülúszója esetén jelentős érzékenységet mutattak, így várható volt, hogy a tisztított komponens esetén is így fognak viselkedni, ezáltal jelezve a tisztítási módszer hatékonyságát. Ugyanakkor feltételeztem, hogy egy esetleges sikeres bakteriocin-tisztítás esetén az adott *Lactobacillus* törzs által termelt egyéb fehérjejellegű (élesztő-)gátló komponens is hasonlóan eredményesen tisztítódik. A három változat közül a MEGHROUS és munkatársai (1999) által leírt módszert találtam a legjobbnak. A másik két módszer végterméke nem, vagy csak igen kis mértékben mutatott gátló aktivitást. Az alkalmazott módszerek végtermékének gátló aktivitását a 11. táblázatban

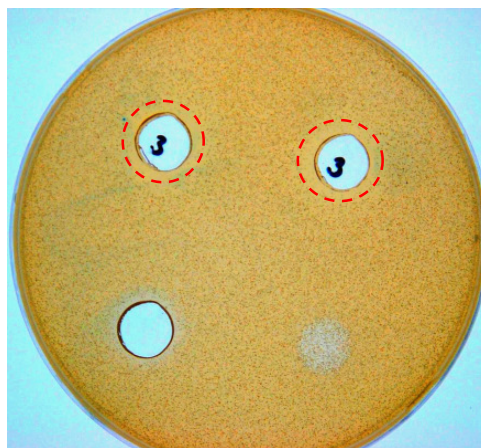
foglaltam össze a 2142-es törzs felülúszójának tisztítása esetén a 01 és 2750-es törzsek szaporodásának gátlására vizsgálva. Ugyanakkor a későbbiekben is a *Lactobacillus plantarum* 2142-es törzs által termelt gátló komponens tisztítása után kapott minta vizsgálatát mutatom be.

11. táblázat: A 2142-es törzs esetén végzett adszorpció/deszorpció tisztítási módszerek végtermékeinek gátló hatása a 01 és 05 jelű törzsekre

Minta	Gátlás mértéke	
	01	05
2142	++	++
1	+	+/-
2	+/-	-
3	+++	++
M1	+/-	+
M2	++	+
M3	-	+/-

1: ELEGADO és munkatársai (1997) szerint végzett tisztítási módszer végterméke, 2: YANG és munkatársai (1992) szerint végzett tisztítás végterméke, 3: MEGHROUS és munkatársai (1999) szerint végzett tisztítás végterméke, M1: az 1-es jelű módszer során kapott mosófolyadék, M2: a 2-es jelű módszer során kapott mosófolyadék, M3: a 3-as jelű módszer során kapott mosófolyadék

A gátlási zóna értékeiből látható, hogy a már említett, MEGHROUS és munkatársai (1999) által leírt (3-as jelű) módszernél kaptam az eredeti, nyers felülúszó hatásával azonos, illetve a 01-es törzsre nézve még nagyobb gátlást. Ugyanakkor a sejtek mosása után a mosófolyadékot (M) szintén megvizsgálva azt tapasztaltam, hogy a fent említett módszer (3) esetén elhanyagolható volt azok gátlása, míg a másik két módszernél (1, 2) a mosófolyadék mutatott gátló aktivitást, ami a gátló komponensek lemosódását jelzi, a mosási lépés(ek) során. A tisztítás után kapott oldat hatását megvizsgáltam teszt-élesztőre is, amely esetben szintén jól látható gátlási zónát kaptam (24. ábra).

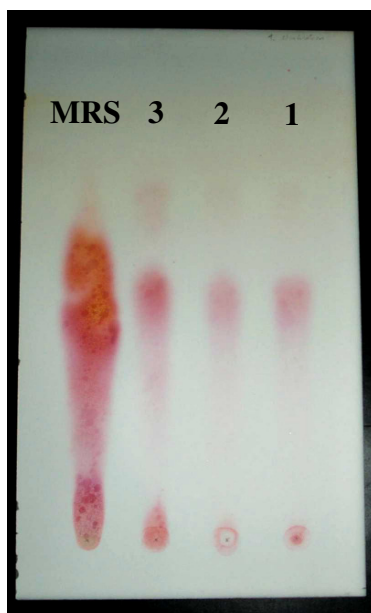


24. ábra: MEGHROUS és munkatársai (1999) szerint végzett tisztítás végtermékének hatása
Candida glabrata élesztőre

3: a 3-as jelű Meghrous és munkatársai (1999) szerint végzett tisztítási módszer végterméke

5.3.2. A tisztított komponens fehérjejellegének igazolása

A kivont gátló anyag, a vékonyrétegkromatográfiás elválasztást és a ninhidrines oldatos permetezést követően színreakciót adott, amiből annak fehérje-jellegére lehet következtetni (25. ábra). A három tisztított kivonat közül az a 3-as jelű minta adta a legerősebb színreakciót, amely a mikroba-gátló aktivitás szerint is a legjobbnak mutatkozott.

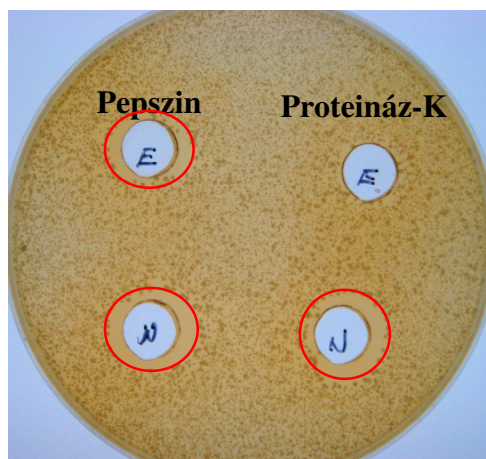


25. ábra: A tisztítási módszerek végtermékeinek vékonyrétegkromatográfiás elválasztást
követő mintázatai

MRS: MRS tápleves, 1: Elegado és munkatársai (1997) szerint végzett tisztítási módszer végterméke, 2: Yang és munkatársai (1992) szerint végzett tisztítás végterméke, 3: Meghrous és munkatársai (1999) szerint végzett tisztítás végterméke

5.3.3. A fehérjejellegű komponens enzimkezelése

A mikrobagátló komponens fehérjejellegének további bizonyítására a tisztított minta proteináz-K és pepszin enzimekkel történő kezelését is elvégeztem, amiből nyilvánvalóvá vált a gátló-anyag fehérje természete, mivel a minta gátló-aktivitása a proteináz-K enzimkezelés után teljesen megszűnt, míg a pepszines kezelés esetén lecsökkent (26. ábra).



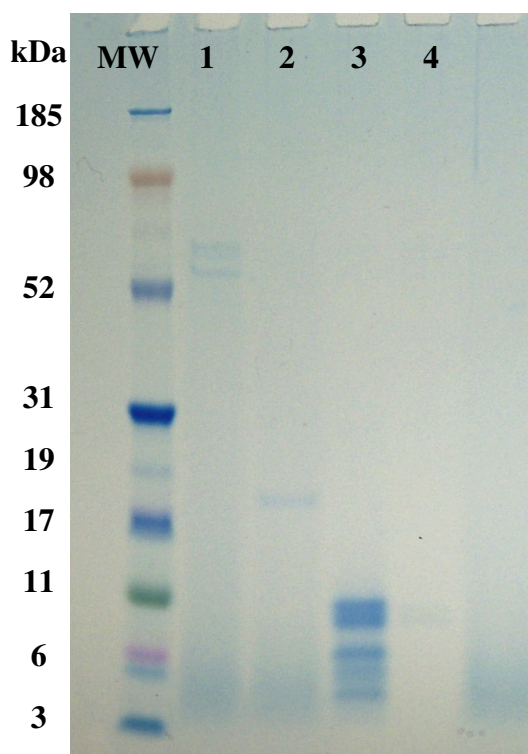
26. ábra: Proteináz-k enzimkezelés hatása a tisztított gátló komponens *Candida glabrata* élesztő elleni aktivitására

E: enzimkezelt minta, N: nem-enzimkezelt minta

5.3.3. A fehérjejellegű komponens molekulatömegének meghatározása

A fehérjejellegű, tisztított komponens molekulatömegét Bis-Tris-SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel próbáltam meghatározni. A 27. ábrán látható, hogy a gél-elektroforézises elválasztás után a 3-as jelű minta, azaz a tisztított fehérjejellegű komponens liofilizálás után ötszörös töménységűre visszaoldott oldatában található fehérjék a 11 kDa alatti tartományban helyezkednek el. Az MRS (1-es minta) és a felülúszó (2-es minta) esetén töményítetlen mintát használtam, de ennek ellenére az MRS tápoldatban láthatók 52 és 98 kDa között fehérjesávok, illetve a felülúszó esetén a 19 kDa értéknél. Azonban a tisztított mintánál ezek egyike sem látható, ami a tisztítás hatékonyságát jelzi. A nem liofilezett, tisztítás utáni mintában (4-es jelű) halványan kaptam egy fehérjesávot 6 és 11 kDa között, amely értéknél a töményített minta (3) esetén igen erős jelet kaptam. Mindazonáltal látható, hogy a tisztított, töményített minta esetén minimum 6, jól elkülönülő fehérjesáv jelent meg. Mivel a tisztításra alkalmazott módszert alapvetően a bakteriocinek kivonására dolgozták ki, így ezen fehérjejellegű komponensek tisztítása is megtörténhetett a kísérlet elvégzése közben, tehát a fehérjesávok

némelyike a vizsgált *Lactobacillus plantarum* 2142-es törzs által termelt bakteriocin lehet.



27. ábra: A 2142-es törzs által termelt, tisztított fehérjejellegű gátló komponens az elektroforetikus elválasztás után

MW: molekulatömeg-standard, 1: MRS táplé, 2: 2142-es törzs MRSen képzett felülszója, 3: tisztított és liofilizálás után visszaoldott fehérjejellegű komponens, 4: tisztított komponens, liofilizálás előtt

A *Lactobacillus plantarum* különböző törzsei által termelt bakteriocinek (*plantaricin*) kimutatásával, vizsgálatával már sokan foglalkoztak, amelyek során e fehérjejellegű gátló anyag molekulatömegére a 3-10 kDa (JIMÉNEZ-DÍAZ et al. 1993, ENAN et al. 1996), illetve a 1-5 kDa (SUMA et al. 1998) közötti tartományt adták meg. Mások közelebbi molekulatömeget is meghatároztak, mint például a *plantaricin S* és *TF711* esetén 2,5 kDa-t (JIMÉNEZ-DÍAZ et al. 1993, HERNÁNDEZ et al. 2005), *plantaricin ST31* vizsgálatánál 2,7 kDa-t, (TODOROV et al. 1999), *plantaricin C* és *423* esetén 3,5 kDa-t (GONZÁLEZ et al. 1996, VAN REENEN et al. 1998), illetve a *plantaricin 35d* vizsgálatánál 4,5 kDa-t (MESSI et al. 2001). Ugyanakkor számos kutató beszámolt arról is, hogy az általuk vizsgált, adott törzs több, különböző *plantaricint* is termelt (JIMÉNEZ-DÍAZ et al. 1993, ANDERSSSEN et al. 1998, REMIGER et al. 1999), illetve azt is megfigyelték, hogy az adott *Lb. plantarum* által termelt tisztított bakteriocin elektroforetikus képén több sáv is jelen van (AYMERICH et al. 2000), és hogy mindemellett egyes *plantaricinek* különböző peptidek összekapcsolódásával

jönnek létre (JIMÉNEZ-DÍAZ et al. 1995, MALDONADO et al. 2003). ANDERSSEN és munkatársai (1998) például a *Lactobacillus plantarum* C11 törzs esetén 5 peptidet is ki tudtak mutatni, amelyek közül egy különállóan, míg kettő-kettő összekapcsolódva fejtette ki gátló aktivitását, így hozva létre aktív bakteriocineket.

Ezen eredményeket figyelembe véve azt feltételezem, hogy az elektroforetikus futtatás után a 3 és 6 kDa közötti fehérjesávok, illetve azok egy része lehet a *Lactobacillus plantarum* 2142 törzs által termelt bakteriocin(ek) peptidje(i).

Ugyanakkor a tejsavbaktériumokkal kapcsolatban, antifungális fehérjékről is, de főként élesztő szaporodását gátló fehérjejellegű agyagról, ezek tisztításáról kevesen számoltak csak be. Csupán néhány irodalom található ezzel kapcsolatban, azok is főként más -nem a *plantarum*- fajok által termelt fehérjékről szólnak. MAGNUSSON és SCHNÜRER (2001) a *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 törzs kapcsán tisztítottak egy körülbelül 3 kDa molekulatömegű antifungális komponenst, míg OKKERS és munkatársai (1999) egy 2,35-3,9 kDa közötti bakteriocin-szerű fungisztatikus peptidet izoláltak, *Lactobacillus pentosus*-ból. Ugyanakkor ATANASSOVA és munkatársai (2003) a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 törzs felülúszójából tisztított élesztőgátló komponens aktív frakcióját 45 kDa-nál kapták. *Lactobacillus plantarum* tejsavbaktériummal kapcsolatban csak STRÖM és munkatársai (2002) mutattak ki fehérjejellegű antifungális komponenst, a MiLAB 393 törzs esetén két, ciklikus dipeptidet.

A kevés számú irodalomból, illetve az azokban vizsgált különböző fajok eltérő eredményeiből nem lehet következtetni, illetve általánosítani, hogy milyen molekulatömegű élesztőgátló fehérjéket termelhetnek a *Lactobacillus*ok, s kifejezetten a *plantarum* faj, ezért az általam tisztított fehérjék elválasztása, további vizsgálata szükséges.

5.4. A *Lactobacillus* törzsek hisztamin termelése

Mivel a legközismertebb, biogén aminosavhoz kapcsolható élelmiszermérgezés a hisztaminnal hozható összefüggésbe (SANTOS 1996), ezért a *Lactobacillus* törzsek hisztamin-termelésének vizsgálatát tartottam a legfontosabbnak.

A vizsgált tejsavbaktérium törzsek közül mindössze négy termelt hisztamint és ezek közül is három csak a szintetikus MRS táplén, míg a 2750-es törzs a csicsóka táplén is mutatta e biogén aminosav termelését (12. táblázat).

12. táblázat: A hisztamin termelő törzsek a vizsgált *Lactobacillus*-ok közül és az általuk képzett biogén amin mennyiség

Törzs	Hisztamin termelés (mg/l)	
	MRS	Csicsóka
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 05	0,5	0
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2750	81	4,3
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>casei</i> SF1	0,5	0
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	0,5	0

A mért eredmények alátámasztják BOVER-CID és munkatársai (1999) feltevését, miszerint a mikroorganizmusok egy szintetikus táptalajon mért biogén amin termelése nem feltétlenül azonos egy komplex élelmiszer-mátrixban tapasztalható amin-termeléssel, ugyanazon mikroorganizmusok esetén. Ugyanakkor már mások is megállapították, hogy a szabad aminosav, a nátrium-klorid és a glükóz koncentráció is befolyásolja a mikroorganizmusok biogén amin termelését, csakúgy, mint a környezet pH-ja (SUZZI & GARDINI 2003, PIRCHER et al. 2006). Ezért a két táptalaj összetevőinek jelentős eltérése okozhatta az általam mért különbségeket a biogén amin koncentrációban. Egyedül talán csak a pH hatása zárható ki, mivel a 24 órás fermentáció után az egyes törzsek esetén a két táplé között a pH értékek maximum 4 tizedes értékben különböztek.

Ugyanakkor látható, hogy az egyes *Lactobacillus*-ok is nagy eltéréseket mutattak a hisztamin-termelésük tekintetében, más kutatók eredményeihez hasonlóan, akik szintén változatos hisztamin-termelést mértek, mind a fajok között, mind egy fajon belül is (BOVER-CID et al. 1999, SUZZI & GARDINI 2003, PIRCHER et al. 2006). PIRCHER és munkatársai (2006) többek között az általam vizsgált fajokba tartozó törzseket is megnézték biogén amin termelésükre vonatkozóan, amely során azt tapasztalták, hogy a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* törzsek között voltak a legnagyobb hisztamin termelők, amely egybevág az általam kapott eredménnyel (a 2750-es jelzésű baktérium egy *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* törzs). Ugyanakkor a 2750-es törzs általam csicsókalén mért, egy literre vonatkoztatott hisztamin-termelési értéke is „csak” a gyenge hisztamin-mérgezést okozó mennyiség (8-40 mg) alsó határán van (PARENTE et al. 2001), azaz egészségügyi szempontból nem nagyon jelentős, viszont élelmiszerbiztonsági szempontból figyelembe kell venni.

BARÁTH és munkatársai (1999) szintén vizsgálták a 2142, 2750, 2768 és 2775 jelű törzseket és méréseikből az derült ki, hogy össz-biogén amin tekintetében is a 2750-es törzs termelt a legtöbbet MRS táplén, ugyanakkor a 2768 és 2775 jelű törzsek is mutattak biogén amin

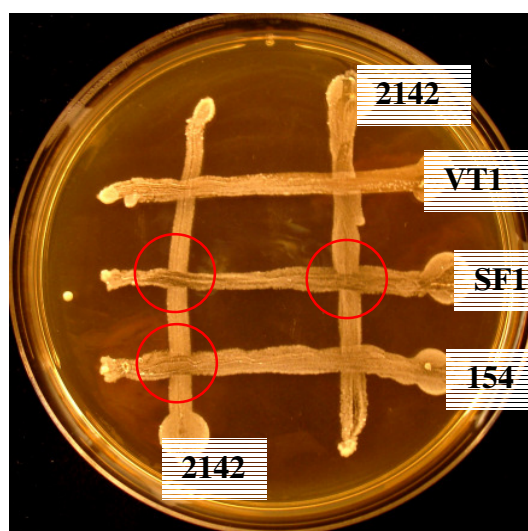
termelést, de annak össz-koncentrációja 10 mg/l környékén volt, aminek 80 %-át a triptamin tette ki.

A mért eredményekből azt állapítottam meg, hogy hisztamin-termelésük szempontjából, csicsóka táplén történő fermentációra a 2750-es törzs kivételével mindegyik vizsgált *Lactobacillus* biztonságosan alkalmazható.

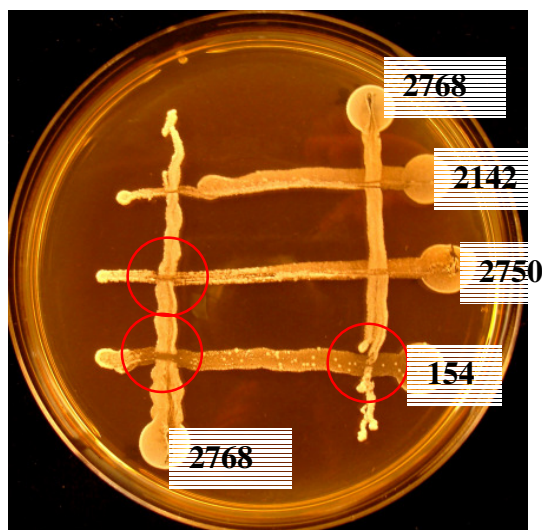
5.5. Vizsgálatok vegyes kultúra kialakításához

5.5.1. Tejsavbaktériumok egymásra kifejtett közvetlen hatása

A vegyes kultúrák kialakítása érdekében végzett, a *Lactobacillus* törzsek egymásra kifejtett közvetlen hatásának vizsgálatánál (28-29. ábra) azt tapasztaltam, hogy a vizsgált törzsek egyidejű növekedésekor azok többnyire nem, vagy csak kis mértékben gátolják egymás szaporodását (13. táblázat). Az eredményekből az is látható, hogy vannak az együttszaporítás szempontjából kevésbé (01, VT1, 2142, Shirota), illetve jobban érzékeny törzsek (2750, 2775, 154) és a vizsgált *Lactobacillus*-ok közül némely nagyobb gátlást mutatott (2142, 2768) a többi törzzsel szemben.



28. ábra: *Lactobacillus* törzsek egymásra kifejtett közvetlen hatása a 2142-es, 154, SF1, és VT1 törzsek esetén, ○ : gátló hatás



29. ábra: *Lactobacillus* törzsek egymásra kifejtett közvetlen hatása a 2768-as, 154, 2750 és 2142-es törzsek esetén, ○ : gátló hatás

13. táblázat: *Lactobacillus* törzsek egymásra kifejtett hatása

Törzsek	Törzsek										Érzékenység
	01	05	154	SF1	VT1	2142	2750	2768	2775	Shirota	
01		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
05	-		-	-	-	-	-	+/-	-	-	1
154	+/-	+/-		-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	5
SF1	-	-	-		-	+/-	-	-	-	-	1
VT1	-	-	-	-		-	-	-	-	-	0
2142	-	-	-	-	-		-	-	-	-	0
2750	-	+/-	+/-	+/-	-	+		+/-	+/-	+	7
2768	-	-	-	-	-	+/-	-		-	-	1
2775	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-		+	6
Shirota	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0
Gátlások száma	1	3	2	1	1	5	0	4	1	3	

-: nincs gátlás, +/-: gyenge gátlás, +: jó gátlás

Ezen eredmények alapján számos vegyes kultúra alakítható ki oly módon, hogy azok nem gátolják egymás növekedését.

5.5.2. Tejsavbaktériumok felülúszóinak hatása egymás termelő törzseire

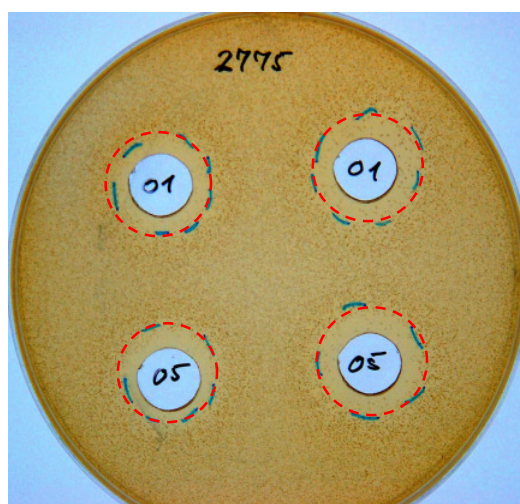
Ugyanakkor megvizsgáltam az egyes tejsavbaktérium törzsek neutrális pH-ra beállított felülúszóinak növekedés-gátló hatását a többi *Lactobacillus* törzsre, amelynek eredményét a 14. táblázat mutatja és a 30. ábra szemlélteti.

14. táblázat: Laktobacillusok neutrális felülúszóinak hatása egymás termelő törzseire

Törzsek	Felülúszó, a törzs számával jelölve										Érzékenység
	01	05	154	SF1	VT1	2142	2750	2768	2775	Shirota	
01		+	+++	++	+	+++	++	++	+	+	9
05	+++		+++	++	++	++	++	+	++	+	9
154	+/-	+/-		+/-	++	++	++	+/-	+	+	8
SF1	+	+	+		+	+	+	-	++	+	8
VT1	+/-	-	+/-	+/-		+	+/-	+	+	+/-	8
2142	+	+	-	+	+		+	+/-	++	+/-	8
2750	+	+/-	+/-	+	++	+/-		+/-	+/-	+/-	9
2768	+/-	+/-	-	+	+	-	+		++	+	7
2775	+	++	+	+/-	++	-	+	+		+	8
Shirota	+	-	+	-	+	+/-	+	+/-	+		7
Gátlások száma	9	7	7	8	9	7	9	8	9	9	

-: nincs gátlás, +/-: gyenge gátlás, +: jó gátlás, ++: jelentős gátlás, +++: erős gátlás

Látható, hogy a vizsgált törzsek kisebb-nagyobb mértékben érzékenyek egymás pH-beállított felülúszóira, ami esetleges bakteriocin jelenlétére utal. Mindazonáltal mivel e gátló-hatás közel neutrális pH értéken mutatkozik, és az együttszaporítás során kialakuló savas közegben hatásuk máshogy, esetleg kevésbé érvényesül, - ahogy azt a közvetlen együttszaporítás során is tapasztaltam (4.5.1.), - így a kevert tenyészetek kialakításakor, a felülúszók egymás törzseire kifejtett hatásának vizsgálata során kapott kisebb gátlási értékeket (+/-; +) nem vettem figyelembe.



30. ábra: A 01-es és 05-ös törzs neutrális felülúszójának hatása a 2775-ös törzsre

5.6. Vegyes kultúrák élesztőgátló hatásának vizsgálata

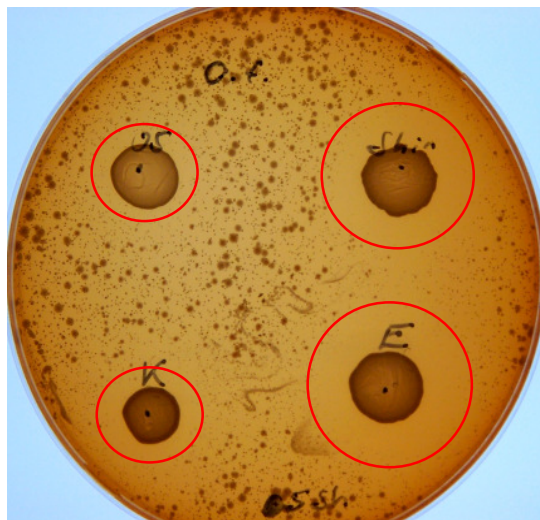
5.6.1. Vegyes kultúrák közvetlen hatása élesztők szaporodására

Az előbbieken bemutatott eredményekből kiindulva, olyan tejsavbaktérium törzsekből kialakított vegyes kultúrákat hoztam létre, amelyekben az egyes törzsek nem gátolják egymás szaporodását és így hatásukat együttesen, közösen fejthetik ki (15. táblázat).

15. táblázat: Vegyes *Lactobacillus* kultúrák kialakítása

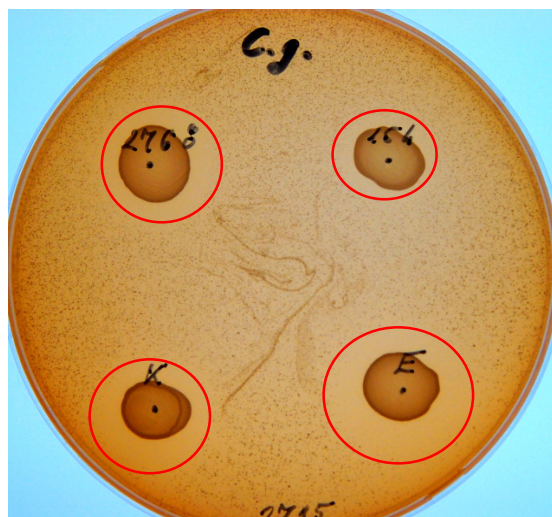
Kevert tenyészethez felhasznált törzsek	Kevert tenyészet jelölése
<i>Lb. curvatus</i> 2768 + <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> 154	2715
<i>Lb. curvatus</i> 2768 + <i>Lb. plantarum</i> 2142	2721
<i>Lb. plantarum</i> 2142 + <i>Lb. casei</i> Shirota	21Sh
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1 + <i>Lb. casei</i> Shirota	VTSh
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 05 + <i>Lb. casei</i> Shirota	05Sh
<i>Lb. curvatus</i> 2768 + <i>Lb. curvatus</i> 2775	2727
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1 + <i>Lb. plantarum</i> 2142	VT21

Az így kialakított vegyes kultúrák élesztőre kifejtett közvetlen hatását a 31-34. ábra szemlélteti.



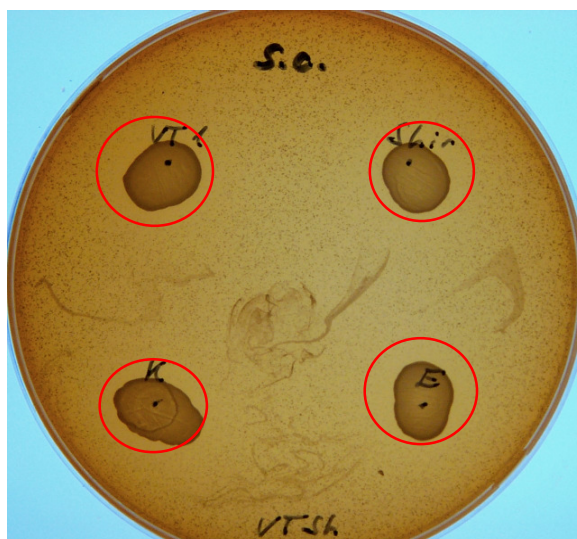
31. ábra: A 05Sh vegyes kultúra hatása a *Candida famata* élesztőre

05: a 05-ös törzs önmagában, Shirota: a Shirota törzs önmagában, K: külön előszaporított törzsek együttes hatása, E: együtt szaporított törzsek, kevert tenyészet



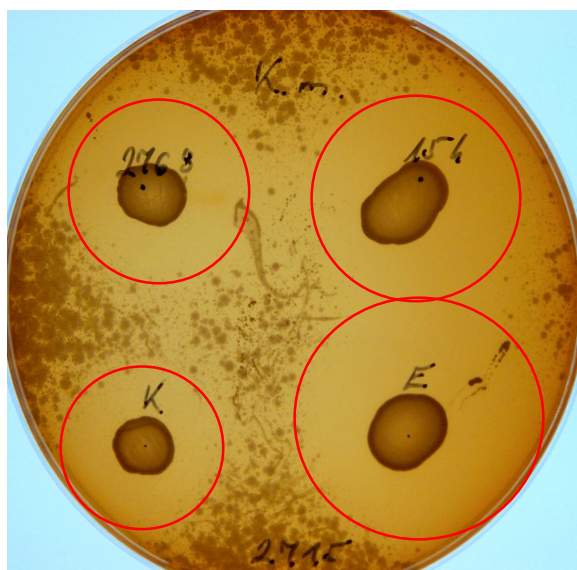
32. ábra: A 2715-ös vegyes kultúra hatása a *Candida glabrata* élesztőre

2768: a 2768-as törzs önmagában, 154: a 154-es törzs önmagában, K: külön előszaporított törzsek együttes hatása, E: együtt szaporított törzsek, kevert tenyészet



33. ábra: A VTSh vegyes kultúra hatása a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőre

VT1: a VT1-es törzs önmagában, Shiota: a Shiota törzs önmagában, K: külön előszaporított törzsek együttes hatása, E: együtt szaporított törzsek, kevert tenyészet



34. ábra: A 2715-ös vegyes kultúra hatása a *Kluyveromyces marxianus* élesztőre

2768: a 2768-as törzs önmagában, 154: a 154-es törzs önmagában, K: külön előszaporított törzsek együttes hatása, E: együtt szaporított törzsek, kevert tenyészet

A 16. táblázatban a kevert tenyészetek négy teszt-élesztőre kifejtett gátló-hatását tüntettem fel. A várákosoknak megfelelően találtam olyan párosításokat, amelyeknél nagyobb gátló aktivitást tapasztaltam, mint ez egyes törzsek egyéni hatása (*C. glabrata* és a *Kl. marxianus* esetén a 2715), de sok esetben éppen annyira gátolt a vegyes kultúra, mint a keverék egyik vagy másik tagja (pl. *C. glabrata* esetén a 05Sh illetve a Shiota, *C. famata* esetén a VTSh),

illetve kisebb mértékben (a 2721-es törzs minden keveréke kevésbé gátolt, mint a törzs önmagában). Ez utóbbi esetben a kisebb aktivitás az egymásra kifejtett negatív hatás eredménye lehet, amely minden bizonnyal a táplében kialakult sajátos környezet, a tápanyagért vívott kompetíció eredménye.

A legjobb tulajdonságokat mutató 2715-ös jelű kevert tenyészet hatékonyságára az adhat magyarázatot, hogy amíg a 2768-as törzs MRS táplében kizárólagosan csak tejsavat termelt, addig a 154-es törzs a legtöbb ecetsav-termelőnek bizonyult ugyanezen táplén, így az általuk együttesen termelt savak olyan keveréket alakíthattak ki, amelyben a két különböző gyenge sav, egymás hatását erősítve fejti ki gátló aktivitását az élesztőre. Emellett még több tejsavat is termelhettek, ahogy azt egyes kutatók tapasztalták, miszerint MRS táplében vizsgálva a kevert tenyészetben jobb volt a tejsavtermelés, mint az egyéni kultúrákban (LEE 2005).

Ugyanakkor az eredményekből az is látható, hogy abban az esetben, amikor a külön-külön előszaporított sejtuszpenzióból vittem ugyanakkora mennyiséget az agar felületére (K), a gátlás a legtöbb esetben kisebb, de legfeljebb ugyanakkora volt, mint az együttlészaporítás után felvitt sejtuszpenzió esetén (E).

16. a), b) táblázat: Vegyes kultúra hatása a teszt-élesztőkre

a)

Tejsavbaktérium törzsek		<i>Candida glabrata</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		<i>minőség</i>	<i>mennyiség</i> (mm)	<i>minőség</i>	<i>mennyiség</i> (mm)
154		+/-	14	-	14
Shirota		+++	18	-	14
2768		+++	18	-	14
2775		++	16	-	14
05		-	10	-	10
2142		+++++	22	-	14
VT1		+/-	13	-	14
VT21	E	++++	20	-	14
	K	+	14	-	14
2727	E	+++	18	-	14
	K	++	14	-	14
2721	E	+++	18	-	14
	K	++	16	-	14
2715	E	+++++	20	-	16
	K	+++	18	-	14
05Sh	E	+++	18	-	14
	K	++	16	-	14
VTSh	E	++	16	-	14
	K	+	14	-	14
21Sh	E	++	15	-	14
	K	++	16	-	14

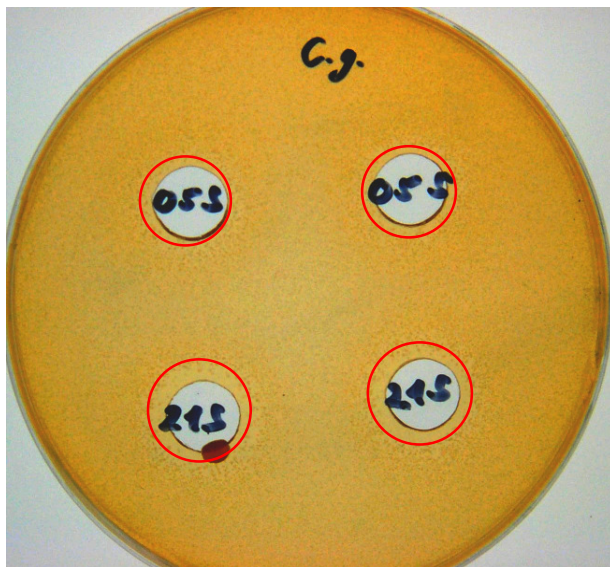
b)

Tejsavbaktérium törzsek		<i>Candida famata</i>		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
		<i>minőség</i>	<i>menyiség</i> (mm)	<i>minőség</i>	<i>menyiség</i> (mm)
154		++	22	+++	28
Shirota		++	20	++++	30
2768		++	24	+++	26
2775		++	24	++++	36
05		+/-	16	++++	30
2142		+++++	36	+++++	38
VT1		++	20	+++	26
VT21	E	+++	26	+++	28
	K	++	20	+	18
2727	E	+++	24	++++	34
	K	++	20	-	10
2721	E	+++	24	+++	28
	K	++	20	++	24
2715	E	++	22	++++	30
	K	++	20	++	22
05Sh	E	++	22	+++	28
	K	+	16	++	22
VTSh	E	++	22	+++	26
	K	++	20	++	22
21Sh	E	+++++	34	+++	28
	K	+++++	30	++	24

- : nincs gátlás; +/- : gyenge gátlás; + : mérsékelt gátlás, a gátlási zóna nem tiszta; ++ : jó gátlás, gátlási zóna viszonylag tiszta; +++ : nagy gátlás, tiszta gátlási zóna; ++++ : erős gátlás, teljesen feltisztult, nagy gátlási zóna; +++++ : teljes gátlás, (a mm értékek magukban foglalják a telep átmérőjét is, amely általában 10 mm volt)

5.6.2. Vegyes kultúrák által termelt, közel neutrális pH-ra állított felülúszók hatása élesztők szaporodására

Az együtt szaporított törzsek 6,5-ös pH értékre beállított felülúszóit megvizsgálva (35-36. ábra) azt tapasztaltam, hogy ezek több esetben jobban gátolták a teszt-élesztőt (VTSh a Kl. marxianus-ra; 05Sh, VTSh a S. cerevisiae-re), mint a külön szaporítás után kialakított felülúszók (17. táblázat). Ugyanakkor éppen azon kevert tenyészetek felülúszói tűntek hatékonyak, amelyek egyik tagja a Shirota törzs volt, amelyről a korábbi kísérleteim során azt tapasztaltam, illetve más kutatók is azt publikálták (DE MUYNCK et al. 2004), hogy csak csekély antifungális aktivitása van.



35. ábra: A 05Sh és a 21Sh vegyes kultúrák felülúszójának hatása a *Candida glabrata* szaporodására



36. ábra: A 2715 és a 2721 vegyes kultúrák felülúszójának hatása a *Kluyveromyces marxianus* szaporodására

17. táblázat: A kevert tenyészetek és az azokat alkotó törzsek egyedi felülűszójának hatása a teszt-élesztőkre

Felülűszók, a törzsek számával jelölve	Gátlási zóna a teszt-élesztőre		
	<i>Candida glabrata</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
154	+++	++	+
Shirota	+/-	+/-	+
2768	+/-	++	+++
05	+	+	+
2142	++	++	+/-
VT1	++	++	+/-
Kevert tenyészet			
2715	++	+	+
2721	+	++	+
05Sh	+/-	++	+++
21Sh	++	++	+
VTSh	++	+++	+++

-: nincs gátlás, +/-: gyenge gátlás, +: mérsékelt gátlás, ++: nagy gátlás, +++: erős gátlás

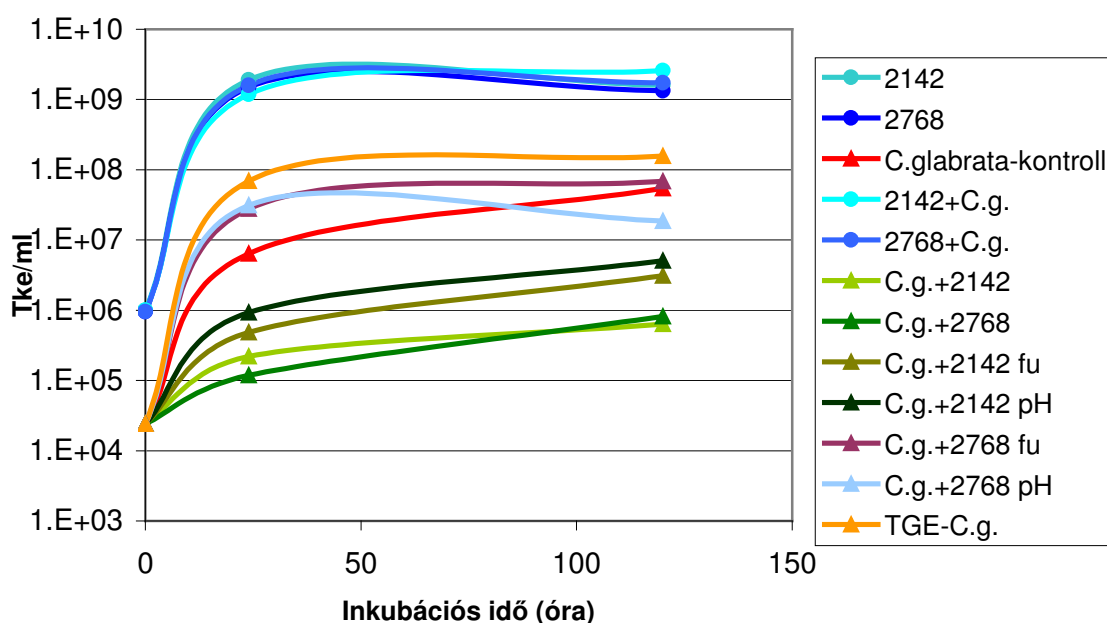
Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy a baktériumok más mikroorganizmus, jelen esetben egy másik *Lactobacillus*, jelenlétében fokozhatják a gátló-anyag termelésüket (SHIMIZU et al. 1999), másrészt a kevert tenyészetek, az együttesen termelt gátló-anyagok, azok kombinációi hatékonyabb gátlást valósítanak meg (HANLIN et al. 1993, SCHWENNINGER et al. 2004, GRATTEPANCHE et al. 2007).

5.7. *Lactobacillus* törzsek és felülűszóik hatása élesztők szaporodására zöldségglé-modellen

5.7.1. *Lactobacillus* törzsek és felülűszóik egyedi hatása élesztők szaporodására zöldségglé-modellen

Természetes alapú táplén, azaz csicsókalén is megvizsgáltam az egyes tejsavbaktérium törzsek, illetve az ezen a táplén képzett sejtmentes felülűszóik hatását a teszt-élesztők szaporodására. Ezen kísérleteimet egy-egy, a csicsóka táplén homo- (2768), illetve heterofermentatív (2142) tulajdonságot mutató törzsek eredményein keresztül mutatom be. A 37. ábrán a *Candida glabrata* élesztő szaporodása látható a 2142 és 2768-as törzsek, illetve ezek felülűszói mellett. Az ábrán látható, hogy a tejsavbaktériumok szaporodása mind külön (2142, 2768), mind ez élesztőkkel együtt (2142 + C.g., 2768 + C.g.)

ugyanolyan mértékű volt, ellenben az élesztő, a kontroll csoportjához (— C.g. kontroll) képest a tejsavbaktériumokkal együtt kevésbé szaporodott (— C.g.+ 2142, — C.g. + 2768). Ebben szerepet játszik természetesen a tejsavbaktériumok által termelt gátló anyagokon kívül a tápanyagért való küzdelem is. Ez azonban már nem mondható el a 2142-es törzs csicsókalén képzett felülúszója illetve neutrális pH-ra állított felülúszója (— fu, — pH) mellett szaporodó élesztők esetén, ahol csak a sejtmentes felülúszó fejtette ki (egy nagyságrendnyi) gátló-hatását az élesztők szaporodására. A 2768-as törzs felülúszói nem (— fu) vagy csak kis mértékben (— pH) gátolták a szaporodást.

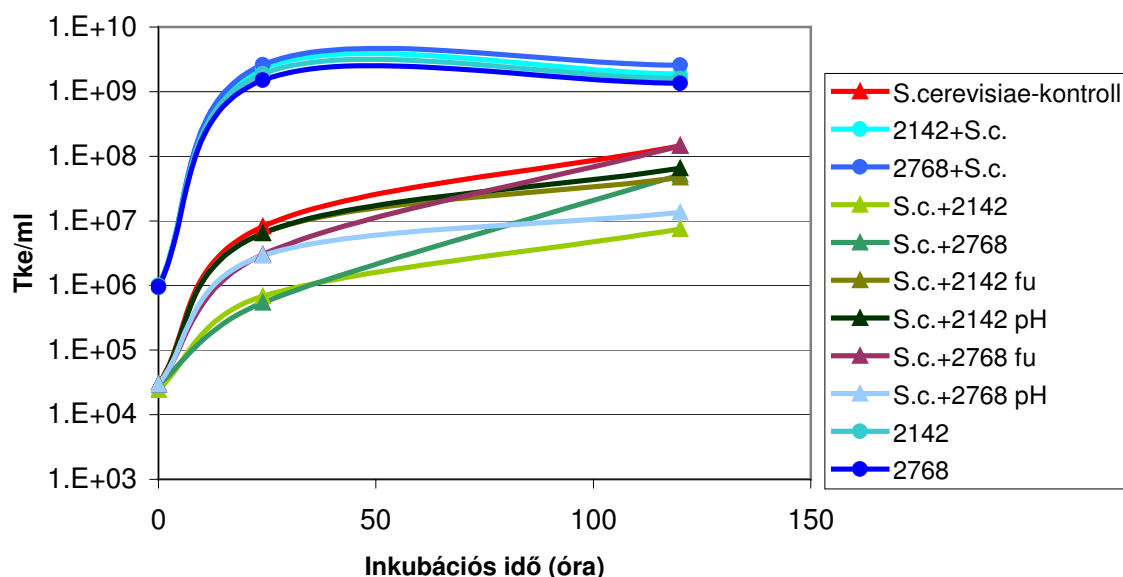


37. ábra: A 2142-es és 2768-as törzs és csicsókalén képzett felülúszóik hatása a *Candida glabrata* élesztőre csicsókalében

2142: a 2142-es törzs szaporodása önmagában, 2768: a 2768-as törzs szaporodása önmagában, C.glabrata-kontroll: *Candida glabrata* szaporodása önmagában, 2142+C.g.: a 2142-es törzs szaporodása a *C. glabrata* mellett, 2768+C.g.: a 2768-as törzs szaporodása a *C. glabrata* mellett, C.g.+2142: *Candida glabrata* szaporodása a 2142-es törzs mellett, C.g.+2768: *Candida glabrata* szaporodása a 2768-as törzs mellett, C.g.+2142 fu: *Candida glabrata* szaporodása a 2142-es törzs felülúszója mellett, C.g.+2142 pH: *Candida glabrata* szaporodása a 2142-es törzs pH-beállított felülúszója mellett, C.g.+2768 fu: *Candida glabrata* szaporodása a 2768-as törzs felülúszója mellett, C.g.+2768 pH: *Candida glabrata* szaporodása a 2768-as törzs pH-beállított felülúszója mellett, TGE-C.g.: *Candida glabrata* szaporodása TGE táplében

Ugyanezen törzsek esetén a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőre kapott szaporodás-adatok azt mutatják (38.ábra), hogy eme élesztő kis mértékben jobban szaporodott a csicsókalén,

ugyanakkor kevésbé gátolta a *Lactobacillus* törzsek ill. azok felülűszóinak jelenléte. Ebben az esetben a 2142-es törzs (—) gátolt a legjobban, de a 2768-as törzs pH beállított felülűszója (—) is egy nagyságrendnyi gátlást mutatott, az élesztő-telepképző egységének számára vonatkozóan, megegyezően az agardiffúziós vizsgálatnál kapott eredménnyel, ahol a felülűszók közül csak a 2768-as törzsnél kaptam ezen élesztőre jó gátlást. A *Saccharomyces cerevisiae* jobb szaporodása csicsóka táplén talán azzal is magyarázható, hogy ezen élesztő képes lehet inulináz enzim szintézisére, amivel a csicsókalében található inulin típusú szénhidrátokat képes bontani (ROUWENHORST et al. 1990), ugyanakkor szaporodását, ahogy azt a *Lactobacillus*-ok közvetlen hatásának vizsgálata is mutatta, a tejsavbaktériumok jelenléte nem zavarta.

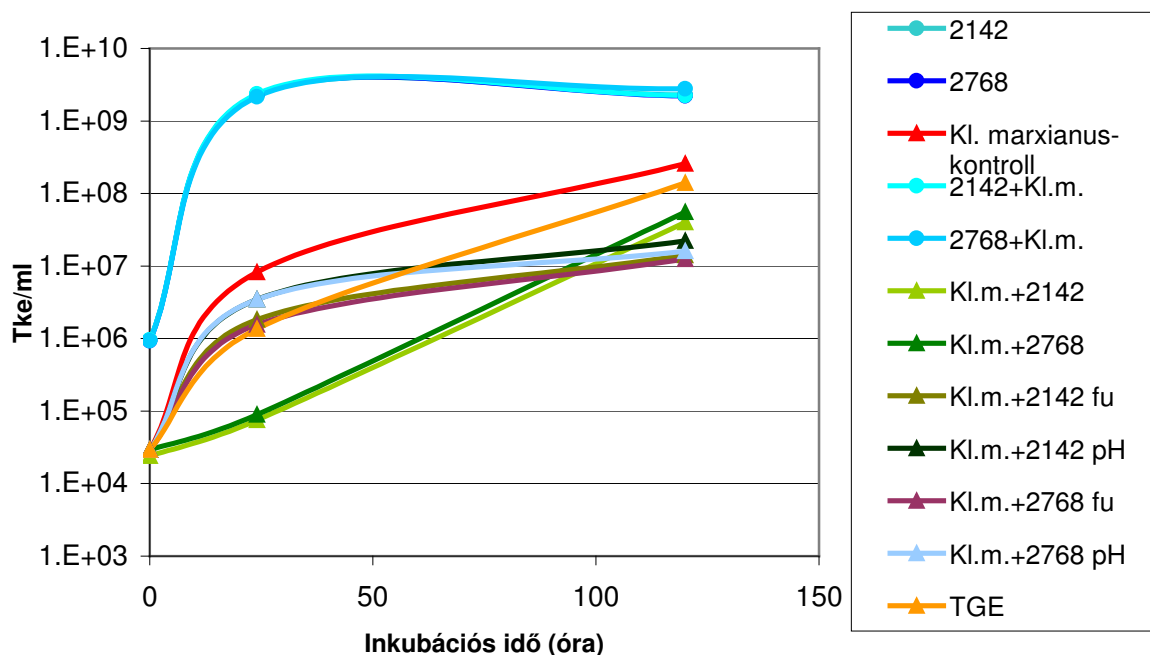


38. ábra: A 2142-es és 2768-as törzs és csicsókalén képzett felülűszóik hatása a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőre csicsókalében

S.cerevisiae-kontroll: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása önmagában, 2142+S.c.: a 2142-es törzs szaporodása a *S. cerevisiae* mellett, 2768+S.c.: a 2768-as törzs szaporodása a *S. cerevisiae* mellett, S.c.+2142: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2142-es törzs mellett, S.c.+2768: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2768-as törzs mellett, S.c.+2142 fu: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2142-es törzs felülűszója mellett, S.c.+2142 pH: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2142-es törzs pH-beállított felülűszója mellett, S.c.+2768 fu: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2768-as törzs felülűszója mellett, S.c.+2768 pH: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2768-as törzs pH-beállított felülűszója mellett, 2142: a 2142-es törzs szaporodása önmagában, 2768: a 2768-as törzs szaporodása önmagában

Az élesztők közül a *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* törzs szaporodott legjobban a csicsóka táplén, jobban, mint a szintetikus táplevesen (39. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy

a *Kluyveromyces marxianus* faj képes az inulináz enzim termelésére, ahogy azt már sokan kimutatták (ROUWENHORST et al. 1988, ROUWENHORST et al. 1990, SELVAKUMAR & PANDEY 1999), ezáltal a csicsókában is található inulin jellegű szénhidrát gyors lebontására, hasznosítására. Az is látható a 39. ábrán, hogy a *Kluyveromyces marxianus* élesztő szaporodása a sejtmentes felülúszók jelenlétében kis mértékben jobban gátlódott, mint az adott *Lactobacillus* törzsek mellett. Mivel eme élesztő nemzetség fajtái gyakran megtalálhatók tejtermékekben (NARVHUS et al. 2003, VASDINYEI 2005, LOPANDIC et al. 2006), minden bizonnyal jól tudnak alkalmazkodni a tejsavbaktériumok jelenlétéhez, ami magyarázatot adhat a tejsavbaktériumok melletti jó szaporodásukra, noha a közvetlen hatás vizsgálatánál e törzs nagymértékben gátlódott a *Lactobacillus*ok által. Ez az eltérés a különböző környezet, szubsztrát, illetve az élesztő és a baktérium egyidejű beoltása okán alakulhatott ki. Ugyanakkor egyik minta esetén sem érte el a sejtszám a kontroll telepkezőegység számát, a legnagyobb mértékű gátlás itt is egy nagyságrendnyi volt.



39. ábra: A 2142-es és 2768-as törzs és csicsókalén képzett felülúszók hatása a *Kluyveromyces marxianus* élesztőre csicsókalében

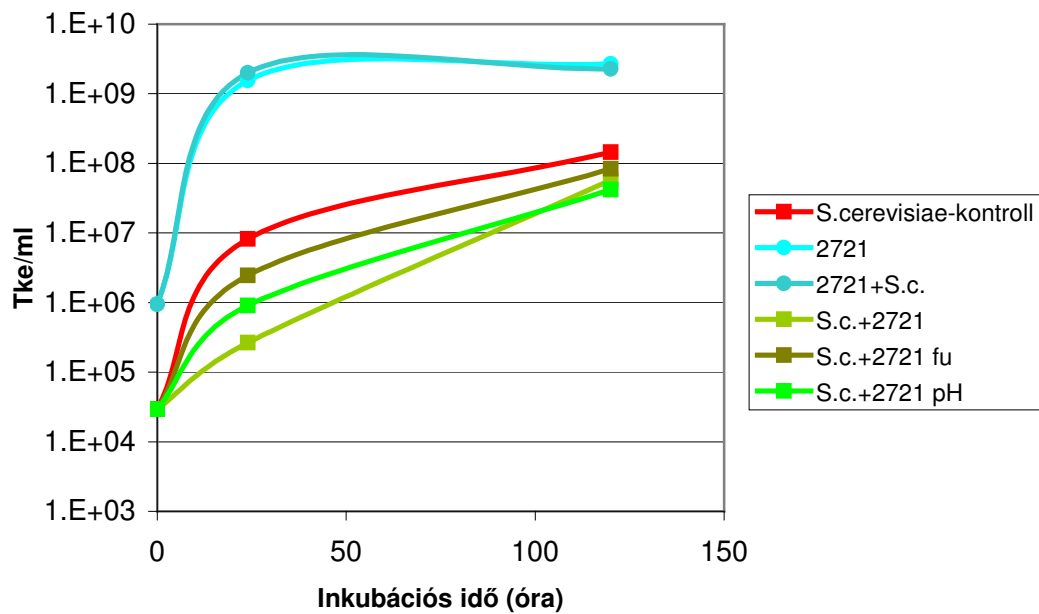
2142: a 2142-es törzs szaporodása önmagában, 2768: a 2768-as törzs szaporodása önmagában, Kl.marxianus-kontroll: *Kluyveromyces marxianus* szaporodása önmagában, 2142+Kl.m.: a 2142-es törzs szaporodása a *Kl. marxianus* mellett, 2768+Kl.m.: a 2768-as törzs szaporodása a *Kl. marxianus* mellett, Kl.m.+2142: *Kluyveromyces marxianus* szaporodása a 2142-es törzs mellett, Kl.m.+2768: *Kluyveromyces marxianus* szaporodása a 2768-as törzs mellett, Kl.m.+2142 fu: *Kluyveromyces marxianus* szaporodása a 2142-es törzs felülúszója mellett, Kl.m.+2142 pH: *Kluyveromyces marxianus* szaporodása a 2142-es törzs pH-beállított felülúszója mellett, Kl.m.+2768 fu: *Kluyveromyces marxianus* szaporodása a 2768-as törzs felülúszója mellett, Kl.m.+2768 pH: *Kluyveromyces marxianus* szaporodása a 2768-as törzs pH-beállított felülúszója mellett

Amint az a *Lactobacillus*ok zöldséglé modellen vizsgált élesztőgátló hatásának eredményekből is látható, egyes esetekben más eredményeket adott, mint a szintetikus tápközegen mért közvetlen gátlóhatás, vagy a felülúszók hatása. Ez azzal magyarázható, hogy más közegben (táplé), más szubsztráton (főként fruktóz, oligofruktóz, inulin) vizsgáltam, és teljesen más, összetettebb környezeti (csicsókalé) hatások voltak jelen a zöldséglé modellen, ami jól mutatja, hogy a környezeti feltételek megváltozásával a mikroorganizmusok egymásra kifejtett hatása, gátló aktivitása is változhat. Ezért igen fontos az adott mikroorganizmusok adott környezetben történő vizsgálata. Ugyanakkor az is látható, hogy az élesztők gátlása tejsavbaktériumokkal nem egyszerű, és hatékony, hisz egyrészt az élesztők is jól tolerálják az alacsony pH-t, sőt a gyenge savakat (tejsav, citromsav, borostyánkősav) képesek hasznosítani, ezáltal növelve a környezet pH-ját (FLEET 1999, LOURENS-HATTINGH & VILJOEN 2002, LOPANDIC et al. 2006), amit én is tapasztaltam a kísérletek során, mivel amíg a tejsavbaktériumok önmagukban 4-es érték alá is lecsökkentették a pH-t, addig az élesztők mellett néha az 5-ös értéket is meghaladta. Ezért fontos kevert tenyészetek, illetve olyan természetes gátlóanyagok kutatása, vizsgálata, amely negatívan képes hatni az élesztők szaporodására.

5.7.2. Kevert tenyészet és azok felülúszóinak hatása élesztők szaporodására zöldséglé-modellen

Az egyedi törzsek vizsgálata után, a kevert tenyészetek kialakításával és zöldséglé-modellen történő alkalmazásával a vegyes kultúra megnövekedett hatékonyságát próbáltam kimutatni, élesztő-gátlás szempontjából. Ezt a kísérletet egy, az egyéni törzsek által kevésbé gátolt (*Saccharomyces cerevisiae*), és egy jól gátolt (*Candida glabrata*) élesztőtörzs eredményein keresztül mutatom be.

Ezen vizsgálatnál azt tapasztaltam, hogy a kevert tenyészet együttes szaporodása mind önmagában, mind a teszt-élesztők mellett azonos volt a külön szaporításnál mért értékkel. A korábbi, egyedi törzsekkel végzett vizsgálatoknak megfelelően a *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása lényegében nem, illetve csak kis mértékben gátlódott a kevert tenyészettől és azok felülúszóitól is (40. ábra).

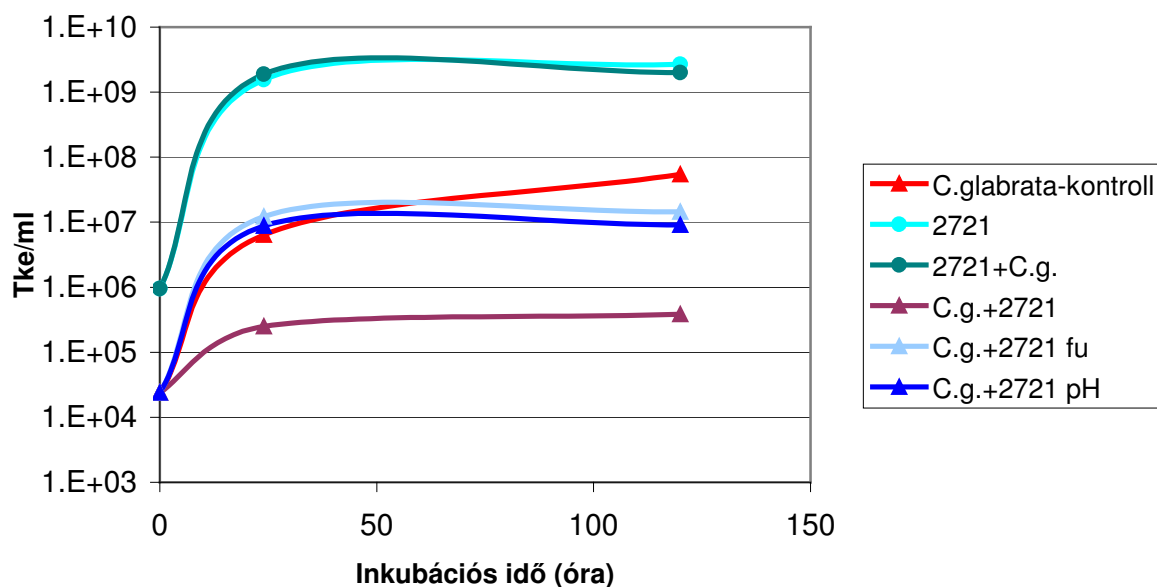


40. ábra: A 2721-es kevert tenyészet és csicsókalén képzett felülűszóinak hatása a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőre csicsókalében

S.cerevisiae-kontroll: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása önmagában, 2721: a 2721-es kevert tenyészet szaporodása önmagában, 2721+S.c.: a 2721-es kevert tenyészet szaporodása a *S. cerevisiae* mellett, S.c.+ 2721:

Saccharomyces cerevisiae szaporodása a 2721-es kevert tenyészet mellett, S.c.+ 2721 fu: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2721-es kevert tenyészet felülűszója mellett, S.c.+ 2721 pH: *Saccharomyces cerevisiae* szaporodása a 2721-es kevert tenyészet pH-beállított felülűszója mellett

A *Candida glabrata* azonban a kevert tenyészet mellett jelentős gátlást mutatott (41. ábra), valamivel nagyobb, mint a kevert tenyészet törzseinek egyéni alkalmazása esetén (37. ábra), és emellett a vegyes kultúra felülűszói is kis mértékben gátolták a szaporodását (*C. glabrata* kontroll: $5,5 \times 10^7$ tke/ml, 2721 fu: $1,4 \times 10^7$ tke/ml, 2721 pH: $9,1 \times 10^6$ tke/ml) bár ennek mértéke az egyéni felülűszók gátlásához képest jóval kisebb volt ($1,8 \times 10^7 - 3,1 \times 10^6$ tke/ml).



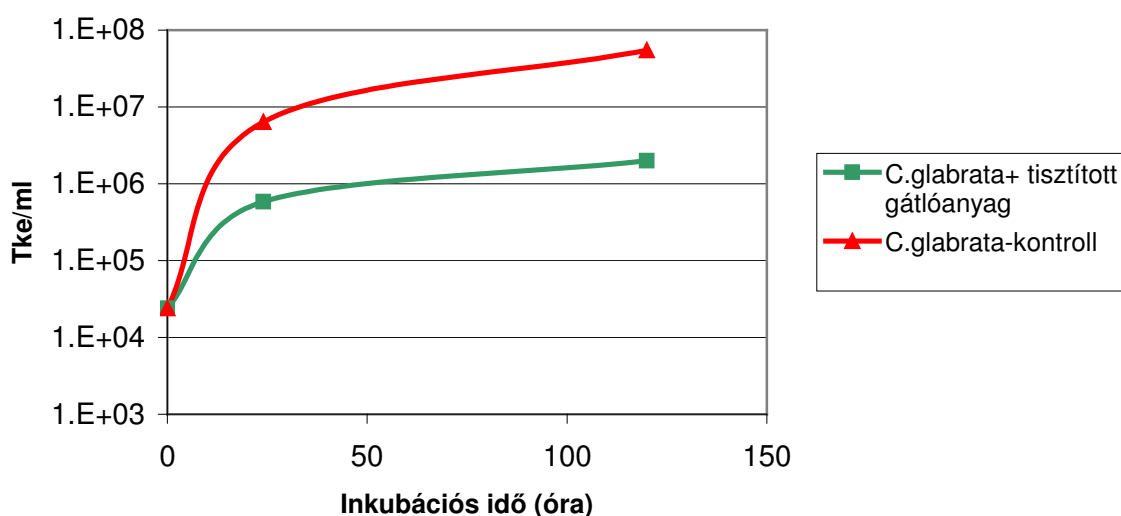
41. ábra: A 2721-es kevert tenyészet és csicsókalén képzett felülúszóinak hatása a *Candida glabrata* élesztőre csicsókalében

C.glabrata-kontroll: *Candida glabrata* szaporodása önmagában, 2721: a 2721-es kevert tenyészet szaporodása önmagában, 2721+C.g.: a 2721-es kevert tenyészet szaporodása a *C. glabrata* mellett, C.g.+2721: *Candida glabrata* szaporodása a 2721-es kevert tenyészet mellett, C.g.+2721 fu: *Candida glabrata* szaporodása a 2721-es kevert tenyészet felülúszója mellett, C.g.+2721 pH: *Candida glabrata* szaporodása a 2721-es kevert tenyészet pH-beállított felülúszója mellett

Ezen eredményekből az látszik, hogy a kevert tenyészet gátló aktivitása csak kis mértékben haladta meg az egyedi kultúrák hatását. Az egyedi és kevert tenyészetek élesztőre kifejtett hatását összevetve megállapítható, hogy maga a gátlás jobban függ az élesztőtől, annak érzékenységétől, mint a tejsavbaktériumoktól.

5.8. Tisztított, fehérjejellegű gátló anyag hatása élesztőre zöldségglé-modellen

A felülúszóból tisztított fehérjejellegű gátló-anyag mellett a *Candida glabrata* szaporodása a kontrollhoz képest ($5,4 \times 10^7$ tke/ml) egy nagyságrenddel kisebb értéket (2×10^6 tke/ml) ért el 120 óra után (42. ábra). Ez azt mutatja, hogy a tisztított komponens a természetes zöldségglé-közegben is kifejti mikrobagátló hatását.



42. ábra: A tisztított fehérjejellegű gátló anyag hatása a *Candida glabrata* élesztő szaporodására csicsókalében

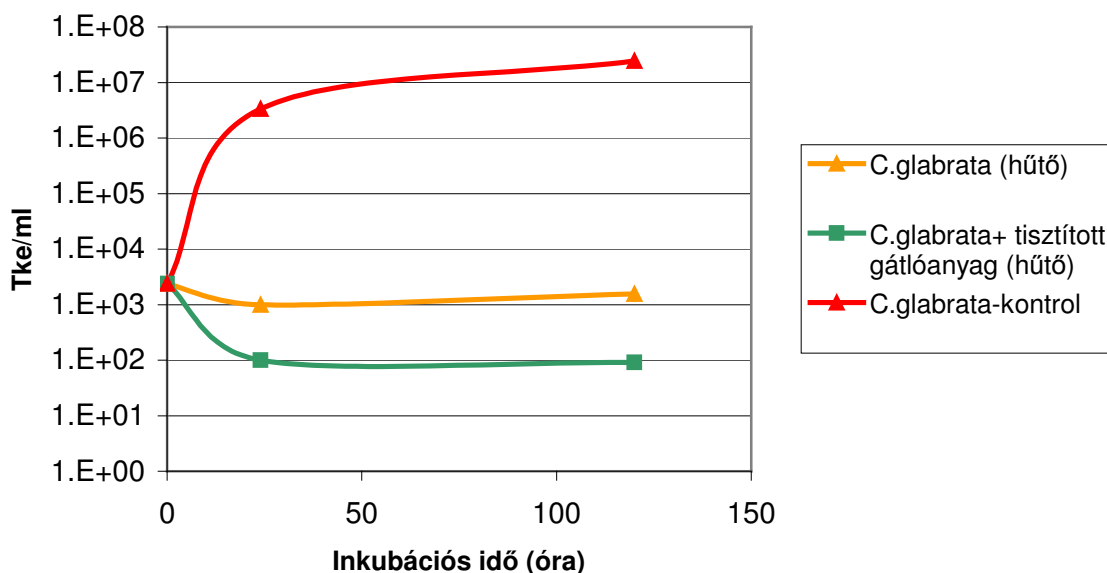
C.glabrata+ tisztított gátlóanyag: *Candida glabrata* szaporodása a fehérjejellegű, tisztított gátló anyag mellett,
C.glabrata-kontroll: *Candida glabrata* szaporodása önmagában

5.9. Tisztított, fehérjejellegű gátló anyag hatása élesztőre, hűtvetárolás mellett, zöldségglé-modellen

A tejsavbaktériumok által termelt bakteriocinek más tartósítási eljárásokkal, illetve adalékanyagokkal történő kombinált alkalmazásának lehetőségéről, illetve ennek konkrét alkalmazásáról és pozitív eredményeiről már többször beszámoltak (CLEVELAND et al. 2001, CHEN & HOOVER 2003, DEEGAN et al. 2006). Ezen belül a bakteriocinek kis hőmérséklettel történő kombinációját is vizsgálták, és hatékonyak találták *Listeria monocytogenes*-szel szemben (RODRÍGUEZ et al. 1997, SZABO & CAHILL 1998). E vizsgálatokra alapozva próbáltam kombinálni az általam tisztított fehérjejellegű gátló

komponens hatását hűtve-tárolással.

E kombinált tartósítás vizsgálatánál, amely esetben a teszt-élesztő szaporodását néztem csicsókalén, a hozzáadott, tisztított fehérjejellegű gátló-anyag mellett, hűtve-tárolás (6 °C) során, azt tapasztaltam, hogy amíg a hűtés önmagában az kiindulási élesztőszámot nem befolyásolta nagy mértékben ($2,4 \times 10^3 \rightarrow 1,5 \times 10^3$ tke/ml), azaz fenntartotta a kiindulási állapotot, addig a gátló komponens mellett közel két nagyságrendnyi ($2,4 \times 10^3 \rightarrow 9,1 \times 10^1$ tke/ml) élősejtszám-csökkenés következett be (43. ábra). Látható, hogy természetesen a hűtve-tárolásnak önmagában is volt hatása, de amíg ez csak fungisztatikus hatással bír, addig a fehérjejellegű gátló komponenssel kiegészülve a hidegstressz által legyengített élesztők élősejtszámában közel két nagyságrendnyi csökkenés állt be.



43. ábra: A tisztított fehérjejellegű gátló anyag hatása a *Candida glabrata* élesztő szaporodására hűtve tárolás során, csicsókalében

C.glabrata (hűtő): *Candida glabrata* sejtszám-változása önmagában, hűtve tárolás során, C.glabrata+ tisztított

gátlóanyag (hűtő): *Candida glabrata* sejtszám-változása a fehérjejellegű, tisztított gátló anyag mellett, hűtve

tárolás során, C.glabrata-kontroll: *Candida glabrata* szaporodása önmagában, 25 °C-on

Az eredmények azt mutatják, hogy a tisztított, élesztőkre negatívan ható komponens, kombinálva más tartósító hatással, még nagyobb gátlást ad, így további vizsgálatok után, biotartósítóként történő alkalmazásának lehetőségét veti fel.

5.10. Új tudományos eredmények

1. Meghatároztam 10 autentikus tejsavbaktérium, a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 154, *Lb. casei* Shirota, *Lb. curvatus* 2768, *Lb. curvatus* 2775, *Lb. paracasei* subsp. *casei* SF1, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 05, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2750, *Lb. plantarum* 01, *Lb. plantarum* 2142, *Lb. rhamnosus* VT1 törzsek szerves sav termelését és a tejsav és ecetsav aránya alapján megállapítottam homo-, illetve heterofermentatív jellegüket, amely szerint a vizsgált törzsek közül 7 (a *Lb. casei* Shirota, *Lb. curvatus* 2768, *Lb. curvatus* 2775, *Lb. paracasei* subsp. *casei* SF1, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 05, *Lb. plantarum* 01, *Lb. rhamnosus* VT1) bizonyult obligát homofermentatívnak, míg 3 (a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 154, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2750, *Lb. plantarum* 2142) heterofermentatívnak. Megállapítottam, hogy a hidrogén-peroxid termelés mennyiségileg nem mutat összefüggést a fermentatív jelleggel.
2. Eredményesen szelektáltam élesztőgátló aktivitású tejsavbaktérium törzseket (*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 154, *Lb. curvatus* 2768, *Lb. plantarum* 01, *Lb. plantarum* 2142) és sikerült ezekből olyan vegyes kultúrákat (*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 154 és *Lactobacillus curvatus* 2768) kialakítani, amelyek szinergens antifungális hatást váltanak ki.
3. A *Lactobacillus plantarum* 2142 törzs esetén igazoltam egy fehérjejellegű, 11 kDa molekulatömeg alatti antifungális anyag termelését, amelyet eddig még nem írtak le.
4. Élelmiszer-mátrixban vizsgálva a *Lactobacillus* törzsek, azok kevert tenyészetének és ugyanezen mátrixban kialakított felülúszóinak hatását teszt-élesztőkre, megállapítottam, hogy a sejtek közvetlen alkalmazása mellett, az előfermentált zöldséglé, azaz a felülúszó is élesztő-szaporodásgátló hatással rendelkezett.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

- Vizsgálataim során 10 *Lactobacillus* törzs sav, hidrogén-peroxid, egyéb gátló komponens és hisztamin termelését tanulmányozva különböző táptalajokon, megállapítottam, hogy ezen metabolitok mennyisége nagymértékben függ mind a termelő törzstől, mind az adott tápközegtől. Ebből adódóan az antifungális komponensek aktivitása is az adott törzs és a környezeti hatások függvénye, így az alkalmazni kívánt *Lactobacillus* törzset azon környezetben szükséges vizsgálni, amelyben a későbbiekben használni kívánjuk tartósítás céljából.
- A *Lactobacillus* törzsek savtermelését vizsgálva különböző táptalajokon, meghatározva azok savprofilját, az egyes savak arányából megállapítottam fermentációs jellegüket. Az egyes törzsek által a különböző táptalajokon termelt tej-, és ecetsav aránya jó mutatója lehet a tejsavbaktérium fermentatív jellegének, azaz homo-, illetve heterofermentációs tulajdonságának.
- Az egyes mikrororganizmusok, így a *Lactobacillus* törzsek is mind gátolhatják, mind segíthetik egymás szaporodását. Mint az az eredményeimből látható, olyan vegyes kultúra kialakításával, amelynek tagjai nem gátolják egymás szaporodását, anyagcserefolyamatait, megnövekedett antifungális hatékonyságú kultúra alakítható ki. Ugyanakkor azonban javasolt az ilyen vegyes kultúrák (további) vizsgálata azon szempontból, hogy mely komponensek termelődése fokozódott s milyen hatásra.
- A *Lb. plantarum* 2142-es törzs esetén sikerült egy olyan fehérjejellegű terméket kimutatnom, tisztítanom és részlegesen meghatároznom, amely önmagában is jelentős gátló hatást mutatott egyes élesztőkkel szemben. Eredményeimből, illetve azon kisszámú irodalomból, amely szintén laktobacillusok által kiválasztott élesztőgátló hatású, fehérjejellegű anyagról számol be, megállapítható, hogy ezen mikroorganizmusok is képesek az általános metabolittermékeiken túlmutató, specifikus, élesztők szaporodását gátló anyag termelésére. Ezen anyagok, további vizsgálatok után, jó alternatívát nyújtanak az élesztőgátlás terén, a biotartósítás

keretein belül. Ezért javasolt az ilyen komponensek közelebbi azonosítása, vizsgálata különböző élelmiszer-mátrixban, a gátló anyag termelésében szerepet játszó gének meghatározása s a termelő törzs termelékenységének fokozása.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A tejsavbaktériumok - és köztük a *Lactobacillus* - széleskörűen, változatos élőhelyeken előforduló mikroorganizmusok, melyek megtalálhatók többek között a talajtól és természetes vizektől kezdve, a növények felszínén át egészen az emberi béltraktusig. Gyakori előfordulása okán az emberiség hamar megismerte hasznos -néha káros- tevékenységét, s évezredek óta alkalmazta tudatlanul élelmiszerei előállítására és nem utolsó sorban tartósítására. Csak az utóbbi 150 évben használjuk a tejsavbaktériumokat tudatosan élelmiszereink megóvására, íz-, és állagkialakítására, s amióta felfedeztük e mikroorganizmusokat, máig vizsgáljuk tulajdonságaikat, viselkedéseiket, működésüket. A kezdetektől használt s kihasznált tartósító tulajdonságaik jelentősége egy időben háttérbe szorult, ám napjainkban a kevesebb tartósítószer alkalmazása, a kíméletesebb tartósító kezelések, összességében természetesebb élelmiszer iránti fogyasztói igény hatására a tejsavbaktériumok és az általuk szintetizált antimikrobiális anyagok ismét előtérbe kerültek a biotartósítás zászlója alatt.

Vizsgálataim során 10 *Lactobacillus* törzs szerves sav-, és hidrogén-peroxid termelését hasonlítottam össze szintetikus laboratóriumi (MRS) és természetes (csicsóka) táplevésben. Megvizsgáltam, hogy az említett antimikrobiális anyagokon kívül szintetizálnak-e egyéb gátló komponenst, különös tekintettel az antifungális fehérjékre. E törzseket szelektáltam mind közvetlen, mind felülúszóik által kifejtett hatásuk alapján, élesztőgombák szaporodásának gátlására, s ugyanezt elvégeztem a hatékony antifungális törzsekből kialakított kevert tenyészetek esetén is. Vizsgáltam a törzsek közvetlen, előfermentált táplevük és egy törzs (*Lb. plantarum* 2142) fehérjejellegű antifungális terméke által élesztőkre kifejtett hatást, élelmiszer-mátrixként alkalmazott csicsókalében.

A kísérletekből megállapítottam a vizsgált *Lactobacillus*ok fermentációs, homo-, ill. heterofermentatív jellegét a termelt savak által, továbbá összehasonlítva a szintetikus-, és természetes táplevelekben képzett antimikrobiális termékeiket, azt találtam, hogy az adott tápközeg azokat nagymértékben befolyásolja. Kialakítottam olyan vegyes kultúrát, melynek együttes élesztő-gátló hatása jobb volt az adott törzsek egyedi hatásánál. Sikerült kimutatnom és részlegesen tisztítanom olyan fehérjejellegű antifungális anyagot, amely a természetes élelmiszer-mátrixban is kifejtette látható gátló hatását. A tejsavbaktériumok és felülúszóik több-kevesebb hatékonysággal gátolták a teszt élesztőket, bár ez nagy mértékben változott és függött az adott élesztőtől.

Eredményeimből arra lehet következtetni, hogy a tejsavbaktériumok antimikrobiális termékei nagymértékben függenek az adott környezettől, illetve hatékonysága a célorganizmustól, így a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező *Lactobacillus* törzset csak az adott környezetben, az adott célorganizmus(ok)ra vizsgálva lehet kiválasztani. Ugyanakkor a lactobacillusok termelhetnek olyan fehérjejellegű antifungális anyagot, amelyek további vizsgálata után felmerülhet azok biotartósítóként való alkalmazása.

8. SUMMARY

The lactic acid bacteria, and specifically them the lactobacilli, occur widely, in diverse habitats, from the soil and natural waters through the surface of plants to the human gastrointestinal tract. Their beneficial activity was recognized early in the history of the mankind as a consequence of the common occurrence of lactobacilli, and we used them for millennia for preparation and preservation of food, unknowingly. Only in the last 150 years are the lactic acid bacteria used intentionally to develop the taste and consistency as well as to ensure the safety of foods. Since their discovery we analyze their characteristics and function continuously. The interest of preservative attributions of lactic acid bacteria got into background for a while, but nowadays the antimicrobial metabolites of lactobacilli come to the front again, because the claim of consumer to lower doses of preservatives and milder preservation processes, on the whole to natural food.

In this study I compared the organic acid and hydrogen-peroxide production of 10 different *Lactobacillus* strains on a synthetic (MRS) and a natural (Jerusalem artichoke) liquid media. I investigated the production of other antimicrobial compounds beside of these, especially the antifungal proteins. I have screened the strains by their inhibitory effect on yeast, in case of the direct effect of colony and the effect of their supernatants only. I have formed mix cultures from these strains, after the inhibitory assay of the strains against each other, and investigated their anti-yeast effect. I investigated also the direct effect of cell inoculum, the supernatant and the antifungal protein against yeast in food-matrices (Jerusalem artichoke juice).

I have determined the homo-, or heterofermentative character of the investigated *Lactobacillus* strains by their acid production. I obtained that the amount of metabolite products are influenced by the given media. I have formed mix cultures, which showed greater antifungal activity than the strains separately. I have found and partially purified a proteinaceous antifungal substance, which showed inhibitory effect against yeast also in the food matrices. The strains and their supernatants too, inhibited the yeast in the Jerusalem artichoke juice, however its degree was depend on the given yeast.

The results may be concluded, that the antimicrobial metabolite production of the *Lactobacillus* strains depends on the media, and their effectiveness on the target microorganism. At the end the lactobacilli can produce antifungal proteinaceous substance, which after further investigation can be use as biopreservative against yeasts.

9. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

ADAMS, M. R., NICOLAIDES, L. (1997): Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food control*, 8 (5) 227-239. p.

ALAKOMI, H.-L., SKYTTÄ, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I. M. (2000): Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5) 2001-2005. p.

AMMOR, M. S., MAYO, M. (2007): Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76 138-146. p.

AMMOR, S., TAUVERON, G., DUFOUR, E., CHEVALLIER, I. (2006): Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17 454-461. p.

ANDERSSSEN, E. L., DIEP, D. B., NES, I.F., EIJSINK, V. G. H., NISSEN-MEYER, J. (1998): Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (6) 2269-2272. p.

ATANASSOVA, M., CHOISET, Y., DALGALARRONDO, M., CHOBERT, J.-M., DOUSSET, X., IVANOVA, I., HAERTLÉ, T. (2003): Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*, 87 63-73. p.

AXELSSON, L. (1998): Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. pp. 1-72. In: Salminen, S. és von Wright, A. (Szerk.): Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker, Inc., 617 p.

- AYMERICH, M. T., GARRIGA, M., MONFORT, J. M., NES, I., HUGAS, M. (2000): Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17 33-45. p.
- BAJPAI, P., MARGARITIS, A. (1982): Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* grown on jerusalem artichoke juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (6) 1325-1329. p.
- BARÁTH, Á., CORSETTI, A., HALÁSZ, A., GELENCSE, É. (1999): New aspects for selection criteria of lactic acid starter cultures. *Proceedings of Euro Food Chem X*, Budapest, Hungary, 22-24 September, 1999, 37-45. 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* 218 184-187. p.
- BARNARD, J. P., STINSON, M. W. (1999): Influence of environmental conditions on hydrogen peroxide formation by *Streptococcus gordonii*. *Infection and Immunity*, 67 (12) 6558–6564. p.
- BARTA, J., PÁTKAI, GY. (2007): Chemical composition and storability of jerusalem artichoke tubers. *Acta Alimentaria* 36 (2) 257-267. p.
- BATTCOCK, M., AZAM-ALI, S. (1998): Fermented fruits and vegetables. A global perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin* No. 134, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e00.HTM>
- BELÁK, Á., KISKÓ, G., MOHÁCSINÉ FARKAS, CS., KUN, SZ., REZESSYNÉ SZABÓ, J., MARÁZ, A. (2004): A kompetitív mikrobiota vizsgálata bifidobaktériummal erjesztett sárgarépalében. Előadás kivonatok, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, 2004. október 7-9., Keszthely, p. 10., 133. p.
- BETTS, G. D., LINTON, P., BETTERIDGE R. J. (2000): Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note. *Food Microbiology*, 17 47-52. p.

BÍRÓ G., INCZE K., FARKAS J. (1979): Baktériumos eredetű zöldülések húskészítményeknél. *Húsipar*, 8 (6) 237-240. p.

BORCH, E., KANT-MUERMANS, M.-L., BLIXT, Y. (1996): Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *International Journal of Food Microbiology*, 33 103-120. p.

BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W. H. (1999): Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53 33-41. p.

BRUL, S., COOTE, P. (1999): Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50 1-17. p.

BUCKENHÜSKES, H. J. (1993): Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 253-272. p.

CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. (1999): Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50 131-149. 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.

CHEIRSILP, B., SHOJI, H., SHIMIZU, H., SHIOYA, S. (2003): Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefiran production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 279-284. p.

CHEN, H., HOOVER, D. G. (2003): Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 82-100. p.

CHRISTENSEN, M. D., ALBURY, M. N., PEDERSON, C. S. (1958): Variation in the acetic acid-lactic acid ratio among the lactic acid bacteria. *Applied Microbiology*, 6 (5) 316-318. p.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS, M. L. (2001): Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71 1-20. p.

CORSETTI, A., ROSSI, J., GOBBETTI, M. (2001): Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 69 1-10. p.

CORSETTI, A., SETTANNI, L. (2007): Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40 539-558. p.

COTON, E., COTON, M., LEVERT, D., CASAREGOLA, S., SOHIER, D. (2006): Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108 130-135. p.

CSANK, CS., HAYNES, K. (2000): *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters*, 189 115-120. p.

DAMIANI, P., GOBBETTI, M., COSSIGNANI, L., CORSETTI, A., SIMONETTI, M. S., ROSSI, J. (1996): The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29 63-70. p.

DE LLANOS, R., QUEROL, A., PEMÁN, J., GOBERNADO, M., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. (2006): Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *International Journal of Food Microbiology*, 110 286-290. p.

DE LUCCA, A. J., WALSH, T. J. (1999): Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (1) 1-11. p.

DE MUYNCK, C., LEROY, A. I. J., DE MAESENEIRE, S., ARNAUT, F., SOETAERT, W., VANDAMME, E. J. (2004): Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, 159 339-346. p.

DEÁK, T. (1979): Tartósítóipari mikrobiológia. Kertészeti Egyetem, Budapest

DEÁK, T., FARKAS, J., INCZE, K. (1980): Konzerv-, hús- és hűtőipari mikrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

DEÁK, T. (1998): Élesztőgombák a természetben és az iparban. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest, 243 p.

DEÁK, T. (2005): A mikrobavilág molekuláris szemlélete. *Élelméleti Ipar*, 59 (4) 105-111. p.

DEEGAN, L. H., COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, P. (2006): Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16 1058-1071. p.

DELVES-BROUGHTON, J. (2005): Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57 (12) 525-527. p.

DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. (2004): New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14 273-285. p.

DIELBANDHOESING, S. K., ZHANG, H., CARO, L. H. P., VAN DER VAART, J. M., KLIS, F. M., VERRIPS, C. T., BRUL, S. (1998): Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10) 4047-4052. p.

DOELLE, H. W. (1969): Bacterial metabolism. Academic Press Inc. New York, 485 p.

DOROCKA-BOBKOWSKA, B., KONOPKA, K., DÜZGÜNEŞ, N. (2003): Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, 48 805-814. p.

EKLUND, T. (1983): The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 54 383-389. p.

EL-ADAWY, T. A. (2001): Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* DI. *Nahrung/Food*, 45 (2) 118-124. p.

- ELEGADO, F. B., KIM, W. J., KWON, D. Y. (1997): Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin ACM, from *Pediococcus acidilactici* M. *International Journal of Food Microbiology*, 37 1-11. p.
- ENAN, G., EL-ESSAWY, A.A., UYTTENDAELE, M., DEBEVEREA, J. (1996): Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UGI isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG 1. *International Journal of Food Microbiology*, 30 189-215. p.
- FIDEL, P. L. (2001): *Candida glabrata*: An important fungal pathogen for the 21st century. *Clinical Microbiology Newsletter*, 23 (22) 171-176. p.
- FLEET, G. H. (1999): Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 50 101-117. p.
- GARDINI, F., SUZZI, G., LOMBARDI, A., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., ANDRIGHETTO, C., SCHIRONE, M., TOFALO, R. (2001): A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Research*, 1 161-167. p.
- GOH, Y. J., ZHANG, C., BENSON, A.K., SCHLEGEL, V. (2006): Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (12) 7518-7530. p.
- GONZÁLEZ, B., GLAASKER, E., KUNJI, E. R. S., DRIESSEN, A. J. M., SUÁREZ, J. M., KONINGS, W. N. (1996): Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (8) 2701-2709. p.
- GOURAMA, H., BULLERMAN, L.B. (1997): Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 34 131-143. p.
- GRATTEPANCHE, F., AUDET, P., LACROIX, C. (2007): Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *International Dairy Journal*, 17 123-132. p.

HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. (1994): Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5 42-49. p.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W. H. (1999a): The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung A*, 208 418-423. p.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., HOLZAPFEL, W. H. (1999b): The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung A*, 208 434-438. p.

HANLIN, M. B., KALCHAYANAND, N., RAY, P., RAY, B. (1993): Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *Journal of Food Protection*, 56 (3) 252-255. p.

HERNÁNDEZ, D., CARDELL, E., ZÁRATE V. (2005): Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99 77-84. p.

HERNÁNDEZ, A., MARTÍN, A., ARANDA, E., PÉREZ-NEVADO, F., CÓRDOBA M. G. (2007): Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24 346-351. p.

HOLYOAK, C. D., STRATFORD, M., MCMULLIN, Z., COLE, M. B., CRIMMINS, K., BROWN, A. J. P., COOTE, P. J. (1996): Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9) 3158-3164. p.

HOLZAPFEL, W. H., SCHILLINGER, U. (2002): Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35 109-116. p.

HUGO, W. B. (1995): A brief history of heat, chemical and radiation preservation and disinfection. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36 (3) 197-217. p.

HULSE, J. H. (2004): Biotechnologies: past history, present state and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 15 3-18. p.

ISOLAURI, E., SALMINEN S., OUWEHAND, A. C. (2004): Probiotics. *Best Practice & Research Clinic Gastroenterology*, 18 (2) 299-313. p.

JESPERSEN, L., JAKOBSEN, M. (1996): Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33 139-155. p.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R., RIOS-SÁNCHEZ, R. M., DESMAZEAUD, M., RUIZ-BARBA, J. L., PIARD, J. -C. (1993): Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (5) 1416-1424. p.

JIMÉNEZ-DÍAZ, 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.

KALANTZOPOULOS, G. (1997): Fermented products with probiotic qualities. *Anaerobe*, 3 185-190. p.

KANEUCHI, C., SEKI, M., KOMAGATA K. (1988): Production of succinic acid from citric acid and related acids by *Lactobacillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (12) 3053-3056. p.

KAPLAN, H., HUTKINS R.W. (2003): Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4) 2217-2222. p.

KAROVIČOVÁ J., DRDÁK, M., GREIF, G., HYBENOVÁ, E. (1999): The choice of strains of *Lactobacillus* species for the lactic acid fermentation of vegetable juices. *European Food Research and Technology*, 210 53-56. p.

KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. (2005): Lactic acid fermentation of various vegetable juices. *Acta Alimentaria*, 34 (3) 237-246. p.

KASIMOĞLU, A., M. GÖNCÜOĞLU, AKGÜN, S. (2004): Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14 1067-1073. p.

KATIKOU, P., AMBROSIADIS, I., GEORGANTELIS, D., KOIDIS, P., GEORGAKIS, S. A. (2005): Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (6) 1303-1313. p.

LAITILA, A., ALAKOMI, H-L., RAASKA, L., MATTILA-SANDHOLM, T., HAIKARA, A. (2002): Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds *in vitro* and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, 93 566-576. p.

LAMBERT, R. J., STRATFORD, M. (1999): Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86 154-164. p.

LANDETE, J.M., FERRER, S., PARDO, I. (2005): Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology*, 99 580-586. p.

LEAL-SÁNCHEZ, M. V., RUIZ-BARBA, J. L., SÁNCHEZ, A. H., REJANO, L., JIMÉNEZ-DÍAZ, R., GARRIDO, A. (2003): Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*, 20 421-430. p.

LEE, K. (2005): Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. *Process Biochemistry*, 40 1559-1564. p.

- LEHANE, L., OLLEY, J. (2000): Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58 1-37. p.
- LEROY, F, DE VUYST, L. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15 67-78. p.
- LIND, H., JONSSON, H., SCHNÜRER, J. (2005): Antifungal effect of dairy propionibacteria-contribution of organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 98 157-65. p.
- LOPANDIC, K., ZELGER, S., BÁNSZKY, L. K., ELISKASES-LECHNER, F., PRILLINGER, H. (2006): Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23 341-350. p.
- LOUREIRO, V. (2000): Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, 33 247-256. p.
- LOURENS-HATTINGH, A., VILJOEN, B. C. (2002): Survival of dairy-associated yeasts in yoghurt and yoghurt-related products. *Food Microbiology*, 19 597-604. p.
- LYHS, U., BJÖRKROTH, J., KORKEALA, H. (1999): Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 52 77-84. p.
- LYHS, U., KORKEALA, H., VANDAMME, P., BJÖRKROTH, J. (2001): *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring. *International Journal of Food Microbiology*, 64 355–360. p.
- MAGNUSSON, J., SCHNÜRER, J. (2001): *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1) 1-5. p.
- MAGNUSSON, J. (2003): Antifungal activity of lactic acid bacteria. Doktori disszertáció. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Agraria*, 397, 38 p. <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000247/>

MAGYAR ÉLELMISZERKÖNYV, Hivatalos Élelmiszervizsgálati Módszergyűjtemény (Codex Alimentarius Hungaricus) 3-1-91/180 számú előírás (2003): A nyers- és a hőkezelt tej vizsgálati módszerei. 53 p.

MAIFRENI, M., MARINO, M., CONTE, L. (2004): Lactic acid fermentation of Brassica rapa: chemical and microbial evaluation of a typical Italian product (brovada). *European Food Research and Technology*, 218 469-473. p.

MAKRAS, L., VAN ACKER, G., DE VUYST, L. (2005): *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11) 6531-6537. p.

MALDONADO, A., RUIZ-BARBA, J. L., JIMEÉNEZ-DÍAZ, R. (2003): Purification and Genetic Characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1) 383-389. p.

MEGHROUS, J., LACROIX, C., SIMARD, R. E. (1999): The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 16 105-114. p.

MESSENS, W., DE VUYST, L. (2002): Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 72 31-43. p.

MESSI, P., BONDI, M., SABIA, C., BATTINI, R., MANICARDI, G. (2001): Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 64 193-198. p.

MINERVINI, F., MONTAGNA, M. T., SPILOTROS, G., MONACI, L., SANTACROCE, M. P., VISCONTI, A. (2001): Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 69 141-146. p.

MONTAÑO, A., SÁNCHEZ, A. H., REJANO, L., DE CASTRO, A. (1997): Processing and storage of lye-treated carrots fermented by a mixed starter culture. *International Journal of Food Microbiology*, 35 83-90. p.

- MORENO-ARRIBAS, M. V., POLO, M. C., JORGANES, F., MUÑOZ, R. (2003): Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 84 117-123. p.
- MURPHY, M. G. ÉS CONDON S. (1984): Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures. *Archives of Microbiology*, 138 44-48. p.
- NARVHUS, J. A., GADAGA, T. H. (2003): The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 86 51- 60. p.
- NÉMETH, G., IZSÁKI, Z. (2006): Macro- and micro-element content and uptake of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Cereal Research Communications*, 34 (1) 597-600. p.
- NIKU-PAAVOLA, M.-L., LAITILA, A., MATTILA-SANDHOLM, T., HAIKARA, A. (1999): New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86 29-35. p.
- NOUT, M. J. R., SARKAR, P. K. (1999): Lactic acid food fermentation in tropical climates. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, pp. 395-401.
- NYKÄNEN, A., VESANEN, S., KALLIO, H. (1998): Synergistic antimicrobial effect of nisin whey permeate and lactic acid on microbes isolated from fish. *Letters in Applied Microbiology*, 27 345-348. p.
- OKKERS, D.J., DICKS, L.M.T., SILVESTER, M. JOUBERT, J.J., ODENDAAL, H.J. (1999): Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, 87 726-734. p.

OUWEHAND, A. C. (1998): Antimicrobial components from lactic acid bacteria. 139-159. p.
In: SALMINEN, S. és VON WRIGHT, A. (Szerk.): *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc., 617 p.

PARENTE, E., MARTUSCELLI, M., GARDINI, F., GRIECO, S., CRUDELE, M.A., SUZZI, G. (2001): Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90 882-891. p.

PARVEZ, S., MALIK, K. A., AH KANG, S., KIM, H.-Y. (2006): Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100 1171-1185. p.

PEREIRA-DIAS, S., POTES, M. E., MARINHO, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. (2000): Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 60 55-63. p.

PIRCHER, A., BAUER, F., PAULSEN, P. (2006): Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology* In Press. Online: <http://springer.om.hu/> , <http://www.eisz.hu/egyeb/wmain20.php>

PLOCKOVÁ, M., CHUMCHALOVÁ, J., GIESOVÁ, M., BOUŠKOVÁ, O. (2004): Antifungal effectiveness of *Lactobacillus rhamnosus* VT1 at different temperatures. *Advances in Food Sciences* 26 (2) 64-68. p.

RABE L. K., HILLIER, S. L. (2003): Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41 (7) 3260-3264. p.

RANDAZZO, C. L., RESTUCCIA, C., ROMANO, A. D., CAGGIA, C. (2004): *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90 9-14. p.

REID, G. (2006): Safe and efficacious probiotics: what are they? *TRENDS in Microbiology* 14 (8) 348-352. p.

REMIGER, A., EIJSINK, V. G. H., EHRMANN, M. A., SLETTEN, K., NES. I. F., VOGEL, R. F. (1999): Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25 α and 1.25 β , two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Journal of Applied Microbiology*, 86 1053-1058. p.

ROBERFROID, M. (2002): Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34 105-110. p.

RODRIGUES, K. L., CAPUTO, L. R. G., CARVALHO, J. C. T., EVANGELISTA, J., SCHNEEDORF, J. M. (2005): Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25 404-408. p.

RODRÍGUEZ, E., TOMILLO., J., NUNEZ, M., MEDINA, M. (1997): Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. *Journal of Applied Microbiology*, 83 389-395. p.

ROIG-SAGUÉS, A. X., MOLINA, A. P., HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. (2002): Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215 96-100. p.

ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. (2002): Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79 3-16. p.

ROUWENHORST, R. J., VISSER, L. E., VAN DER BAAN, A. A., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P. (1988): Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (5) 1131-1137. p.

ROUWENHORST, R. J., RITMEESTER, W. S., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P. (1990): Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (11) 3329-3336. p.

ROY, U., BATISH, V. K., GROVER, S., NEELAKANTAN S. (1996): Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology*, 32 27-34. p.

SAKAMOTO, M., KOMAGATA, K. (1996): Aerobic growth of and activities of NADH oxidases and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (3) 210-216. p.

SALMINEN, S., DEIGHTON, M. A., BENNO, Y., GORBACH, S. L. (1998): Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. 211-253. p. In: SALMINEN, S. és VON WRIGHT, A. (Szerk.): *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc., 617 p.

SANTOS, S. M. H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29 213-231. p.

SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W. H. (1996): Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 71 58-64. p.

SCHILLINGER, U., GUIGAS, C., HOLZAPFEL, W. H. (2005): In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 15 1289-1297. p.

SCHNÜRER, J., MAGNUSSON, J. (2005): Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16 70-78. p.

SCHWARTZ, M. (2001): The life and works of Louis Pasteur. *Journal of Applied Microbiology*, 91 597-601. p.

SCHWENNINGER, S. M., MEILE, L. (2004): A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 229-237. p.

SELITRENNIKOFF, C. P. (2001): Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7) 2883-2894. p.

SELVAKUMAR, P., PANDEY, A. (1999): Comparative studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture. *Bioresource Technology*, 69 123-127. p.

SHIMIZU, H., MIZUGUCHI, T., TANAKA, E., SHIOYA, S. (1999): Nisin production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7) 3134-3141. p.

SIMON, E. W. ÉS BLACKMAN, G. E. (1949): The significance of hydrogen-ion concentration in the study of toxicity. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 3 253-265. p.

ŠPIČKA J., KALAČ, P., BOVER-CID, S., KŘÍŽEK, M. (2002): Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *European Food Research and Technology*, 215 509-514. p.

STANTON, C., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., VAN SINDEREN, D. (2005): Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 198-203. p.

STEINKRAUS, K. H. (1997): Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8 (5/6) 311-317. p.

STEINKRAUS, K. H. (2002): Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1 23-32. p.

STILES, M. E. (1996): Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70 331-345. p.

STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36 1-29. p.

STRÖM, K., SJÖGREN, J., BROBERG, A., SCHNÜRER, J. (2002): *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe–L-Pro) and cyclo(L-Phe–*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9) 4322-4327. p.

SUMA, K., MISRA, M.C., VARADARAJ, M.C. (1998): Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International Journal of Food Microbiology*, 40 17-25. p.

SUZZI, G., GARDINI, F. (2003): Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88 41-54. p.

SZABO, E. A., CAHILL, M. E. (1998): The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin TM and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 43 21-31. p.

SZAKÁLY, S. (2004): A probiotikumokkal kapcsolatos alapismeretek. 4-16. p. In: SZAKÁLY, S. (Szerk.): *Probiotikumok és humánegészség*. Budapest: G-Print Nyomda, 52 p.

TCHANGO, J. T., TAILLIEZ, R., EB, P., NJINE, T., HORNEZ, J. P. (1997): Heat resistance of the spoilage yeasts *Candida pelliculosa* and *Kloeckera apis* and pasteurization values for some tropical fruit juices and nectars. *Food Microbiology*, 14 93-99. p.

TODOROV, S., ONNOB, B., SOROKINE, O., CHOBERT, J.M., IVANOVA, I., DOUSSET, X. (1999): Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48 167-177. p.

TOLONEN, M., RAJANIEMI, S., PIHLAVA, J.-M., JOHANSSON, T., SARIS, P. E. J., RYHÄNEN, E.-L. (2004): Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. *Food Microbiology*, 21 167-179. p.

TUOHY, K. M., PROBERT, H. M., SMEJKAL, C. W., GIBSON, G. R. (2003): Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8 (15) 692-700. p.

VAN DER AA KÜHLE, A., SKOVGAARD, K., JESPERSEN, L. (2005): In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101 29-39. p.

VAN DEN TEMPEL, T., JAKOBSEN, M. (1998): Yeasts associated with Danablu. *International Dairy Journal*, 8 25-31. p.

VAN REENEN, C. A., DICKS, L. M. T., CHIKINDAS, M. L. (1998): Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84 1131-1137. p.

VASDINYEI, R. (2005): A hazai tejtermékekből származó élesztőgombák jellemzése hagyományos és molekuláris módszerekkel. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest, 118 p.

VÁZQUEZ, J.A., GONZÁLEZ, M.P., MURADO, M.A. (2005): Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245 149– 161. p.

WAGNER, D., SANDER, A., BERTZ, H., FINKE, J., KERN, W. V. (2005): Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin b and caspofungin for suspected aspergillosis. *Infection*, 33 (5) 397-400. p.

WIKIPEDIA, <http://en.wikipedia.org/wiki/Histamine>

WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T., BRITZ, T. J. (2005): Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15 383-389. p.

YANG, R., JOHNSON, M. C., RAY, B. (1992): Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (10) 3355-3359. p.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Halász Annának* az iránymutatásait, tanácsait s az általa nyújtott elméleti háttérrel, amelyek nagymértékben hozzájárultak doktori dolgozatom elkészüléséhez.

Köszönöm *Dr. Bánáti Diánának*, a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Főigazgatójának a lehetőséget, hogy ezen Intézményben készíthettem el a doktori munkámat.

Köszönöm *Dr. Gelencsér Évának* a Biológiai Osztály vezetőjének, hogy osztályán végezhettem el a kísérleteket, s köszönöm az *osztály dolgozóinak* is a segítségüket, tanácsaikat, amelyekkel segítették ezen értekezés elkészülését. Külön köszönettel tartozom *Dr. Baráth Ágnesnek* és *Dr. Németh Edinának*, akik gyakorlati tanácsaikkal s tanításuk által segítették a kísérletek sikeres elvégzését.

Köszönöm a Prágai Kémiai Technológiai Intézetből *Dr. Jana Chumchalovának* és *Jaroslav Hudáčeknek*, hogy számos eredményes kísérletet náluk és segítségükkel végezhettem el.

Köszönöm barátnőmnek a sok türelmet és segítséget, s köszönöm szüleimnek, testvéremnek és barátaimnak a támogatást.