

**BUDAPESTI KÖZGAZDASÁGTUDOMÁNYI ÉS
ÁLLAMIGAZGATÁSI EGYETEM**

**Bifidobaktériumok izolálása, azonosítása, fiziológiai, biokémiai és
funkcionális jellemzésük**

Doktori értekezés

MAYER ÁGNES

**BUDAPEST
2004**

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS.....	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1	A vastagbél mikrobiotája.....	5
2.2	Funkcionális élelmiszerek.....	9
2.2.1	<i>A probiotikum.....</i>	9
2.2.1.1	<i>Napjainkban alkalmazott probiotikumok.....</i>	10
2.2.1.2	<i>Probiotikus baktériumok szelekciós kritériumai.....</i>	11
2.2.1.3	<i>Probiotikus termékek.....</i>	14
2.2.2	<i>Prebiotikumok.....</i>	15
2.2.2.1	<i>A bifidogén hatású oligoszacharidok.....</i>	17
2.2.2.1.1	<i>Galakto-oligoszacharidok (TOS).....</i>	17
2.2.2.1.2	<i>Laktulóz.....</i>	18
2.2.2.1.3	<i>Laktoszukróz.....</i>	18
2.2.2.1.4	<i>Frukto-oligoszacharidok (FOS).....</i>	19
2.2.2.1.5	<i>Palatinóz (izomaltulóz).....</i>	20
2.2.2.1.6	<i>Izomalto-oligoszacharidok.....</i>	21
2.2.2.1.7	<i>Gentio-oligoszacharid.....</i>	21
2.2.2.1.8	<i>Szójaoligoszacharidok (SZO).....</i>	21
2.2.2.1.9	<i>Xilo-oligoszacharidok (XO).....</i>	22
2.2.2.2	<i>Rezisztens keményítő (RS).....</i>	22
2.2.3	<i>Szinbiotikumok.....</i>	23
2.3	Bifidobaktériumok.....	24
2.3.1	<i>Taxonómia.....</i>	24
2.3.2	<i>Előfordulás.....</i>	25
2.3.3	<i>Azonosítás.....</i>	26
2.3.3.1	<i>Nemzetség szinten.....</i>	26
2.3.3.2	<i>Faji szinten.....</i>	27
2.3.4	<i>Morfológia.....</i>	29
2.3.5	<i>Sejtfálszerkezet.....</i>	30
2.3.6	<i>Fiziológiai tulajdonságok.....</i>	30
2.3.6.1	<i>Atmoszférikus igények.....</i>	30
2.3.6.2	<i>Hőmérséklet és pH igények.....</i>	31
2.3.6.3	<i>Tápanyagszükséglet.....</i>	31
2.3.6.4	<i>Bifidofaktorok.....</i>	32
2.3.6.5	<i>Szénhidrátmetabolizmus.....</i>	33
2.3.6.6	<i>Proteolitikus anyagcsere.....</i>	34
2.3.7	<i>Biokémiai jellemzők.....</i>	34
2.3.8	<i>Antibiotikum rezisztencia.....</i>	34
2.3.9	<i>Antagonista hatás.....</i>	35
2.3.10	<i>Adherencia.....</i>	35
2.4	Bifidobaktériumok élettani hatásai.....	37
2.4.1	<i>Hatásuk a bélmikrobiota egyensúlyára, bélbetegségekre.....</i>	38
2.4.2	<i>Koleszterinszint-csökkentés.....</i>	38
2.4.3	<i>Vitamintermelés.....</i>	39
2.4.4	<i>Antikarcinogén aktivitás.....</i>	39
2.4.5	<i>Immunrendszer erősítése.....</i>	40
2.4.6	<i>További hatások.....</i>	41
2.5	Bifidobaktériumot tartalmazó termékek.....	42
2.5.1	<i>Bifidobaktériumok túlélése a tejtermékekben.....</i>	44
2.5.1.1	<i>Savérzékenység.....</i>	44
2.5.1.2	<i>Oxigénérzékenység.....</i>	45
2.5.2	<i>Termékfejlesztés.....</i>	45
2.5.2.1	<i>Starterkultúrák készítésének optimalizálása, koncentrált starter kultúrák.....</i>	46
2.5.2.2	<i>Immobilizálás, mikrokapszulázás.....</i>	47
2.5.2.3	<i>Bifidobaktériumok genetikai fejlesztése.....</i>	47
3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	48
3.1	Felhasznált mikroorganizmusok.....	48
3.2	Felhasznált tápközegek.....	49
3.3	Anaerob tenyésztés módszerei, körülményei.....	55

3.4	Módszerek.....	55
3.4.1	Bifidobaktériumok izolálása.....	55
3.4.2	Azonosítás.....	55
3.4.2.1	Nemzetség szintű besorolás fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz tesztel.....	55
3.4.2.2	Azonosítás faji szinten.....	56
3.4.2.2.1	16S rDNS analízis.....	56
3.4.2.2.2	Erjesztési vizsgálatok.....	57
3.4.2.2.3	Fourier Traszfórmációs Infravörös Spektroszkópia.....	58
3.4.3	Prebiotikus oligoszacharidok hasznosításának vizsgálata.....	59
3.4.4	Bifidobaktérium és enteropatogén törzsek kölcsönhatása.....	59
3.4.5	Tapadás humán szövettenyészetekhez.....	59
3.4.6	Állatetelési kísérletek.....	60
3.4.7	Életképesség és biológiai hatás vizsgálata az emésztőtraktust szimuláló kísérletekben.....	61
3.4.7.1	Túlélés a gyomor-vékonybél (TIM1) modellben.....	61
3.4.7.2	Vastagbél-szimulációs kísérlet a TIM2 laboratóriumi modellben.....	64
4	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSÜK.....	68
4.1	Módszertani kutatások eredményei.....	68
4.1.1	Faji azonosítás erjesztési vizsgálatok alapján.....	68
4.1.2	Faji azonosítás Fourier transzfórmációs infravörös spektroszkópiával.....	68
4.1.2.1	Típustörzsek szaporodása különböző táptalajokon.....	70
4.1.2.2	Referenciakönyvtár létrehozása.....	71
4.1.3	A környezeti stressz hatások modellezése kémcső kísérletekkel.....	72
4.1.3.1	Gyomor szimuláció.....	73
4.1.3.2	A szájüregben, a gyomorban és a vékonybélben lejátszódó folyamatok szimulálása.....	73
4.2	Bifidobaktériumok izolálásának eredményei.....	75
4.2.1	Azonosítás nemzetség szinten.....	75
4.2.2	Azonosítás faji szinten.....	75
4.2.2.1	Erjesztési próba.....	76
4.2.2.2	16S rDNS analízissel.....	76
4.2.2.3	Fourier transzfórmációs infravörös spektroszkópiával.....	78
4.3	Prebiotikus oligoszacharidok hasznosítási vizsgálatának eredményei.....	85
4.3.1	Bifidobaktériumokkal.....	85
4.3.2	Enteropatogénekkel.....	86
4.4	Bifidobaktériumok és az enteropatogén törzsek kölcsönhatása.....	88
4.5	Bifidobaktérium törzsek tapadása humán szövettenyészetekhez.....	89
4.6	Bifidobaktériumok élettani hatása.....	95
4.6.1	In vivo állatetelési kísérletek eredményei.....	95
4.6.1.1	Egészséges egerek mikrobiotájának változása.....	95
4.6.1.2	Antibiotikummal kezelt egerek mikrobiotájának változása.....	96
4.6.2	In vitro modell kísérletek eredményei.....	96
4.6.2.1	Gyomor szimuláció.....	97
4.6.2.2	A szájüregben, a gyomorban és a vékonybélben lejátszódó folyamatok szimulálása.....	98
4.6.3	Funkcionális ételkészítők alkotók tesztelésének eredményei bélcsatorna szimulációs rendszerekben.....	100
4.6.3.1	TIM 1 modellben végzett vizsgálatok eredményei.....	100
4.6.3.2	Vastagbél-szimulációs (TIM2) kísérletek eredményei.....	101
4.6.3.2.1	A bélmikrobiota összetétele.....	101
4.6.3.2.2	Rövid-szénláncú zsírsavak szintézise.....	106
4.6.3.2.3	L ill. D laktát termelés.....	109
4.6.3.2.4	Az ammónia koncentrációjának alakulása.....	110
5	ÖSSZEFOGLALÁS.....	113
6	SUMMARY.....	116
7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	119
8	FELHASZNÁLT IRODALOM.....	121
9	MELLÉKLETEK.....	132
9.1	Probiotikus táplálékkiegészítőkből izolált törzsek.....	132
9.2	Probiotikus tejtermékekből izolált törzsek.....	133
9.3	Probiotikus és szinbiotikus termékek.....	134
9.4	Az oligoszacharidok 12 csoportja.....	135
9.5	Bifidobaktériumok fénymikroszkópos morfológiája.....	136
9.6	Bifidobaktériumok elektronmikroszkópos morfológiája.....	137

1 BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben különösen fokozódó érdeklődés mutatkozik az egészséges táplálkozás iránt. Bizonyított ugyanis, hogy a helytelen táplálkozás betegségek kialakulásához vezethet, és ennek ellentéte is igaz: az egészséges táplálkozással hosszabb és egészségesebb életre adhatunk esélyt magunknak. Az egészséges táplálkozás alapja, hogy az egyes tápanyagokból megfelelő mennyiséget juttassunk a szervezetünkbe. Kiderült az is, hogy nemcsak az energia- és tápanyagbevitelnek van betegségmegelőző szerepe, hanem a táplálék más alkotórészeinek is. Azokat az élelmiszereket, melyek ilyen jótékony alkotórészeket tartalmaznak, funkcionális élelmiszernek nevezték el. A funkcionális élelmiszerek piaca rohamosan nő, mára világszerte meghaladja a 33 milliárd USA Dollárt, ebből Európa 2 milliárdot képvisel. A 2 milliárdból 1,35 milliárdot a funkcionális tejipari termékek tesznek ki.

Azt a megfigyelést, hogy a fermentált tejtermékek fogyasztása kedvező hatással van a szervezetre, először 1908-ban a Nobel díjas Elie Metchnikoff írta le. Ezeknek a termékeknek a mikrobiológiai összetétele azonban igen változatos, ezért hosszú időbe telt feltárni jótékony hatásaik elméleti alapját. Ma már tudományos eredmények támasztják alá, hogy ezen élő mikroorganizmusok az emésztőrendszerben zajló erjesztések aktív részeseivé válva gátat szabnak a nem kívánatos folyamatok kialakulásának.

Az emberi vastagbél mikrobiotája rendkívül összetett. A szervezetünkben lévő mikroorganizmusok közül a legtöbb itt található, 10^{14} baktérium jut a béltartalom minden grammjára. Ez több mint testi sejteink tízszerese. Kb. 50 baktérium nemzetség több mint 500 faja él a vastagbélben. A bélbaktériumok fermentációs tevékenységük következtében különböző, a szervezetre kedvező és káros hatású végtermékeket képezhetnek. Vannak például olyan bélbaktériumok, melyek a szénhidrát és fehérje anyagcseréjük során különböző rövid láncú zsírsavat termelnek, ezáltal csökkentik a vastagbél pH-ját, kiszorítva a káros N-nitrozó vegyületeket és toxinokat termelő baktériumokat. Ezért igen figyelemreméltó az, hogy hogyan lehet befolyásolni a bélflóra összetételét az étrend megváltoztatásával. A cél az, hogy a bélben lévő bifidobaktériumok és laktobacilluszok számát és aktivitását növeljük.

Manapság igen sok fermentált tejtermék található a piacon. Ezek közül azokat melyek humán eredetű, bizonyítottan jótékony hatásokkal rendelkező laktobacilluszokat és bifidobaktériumokat tartalmaznak, probiotikus termékeknek nevezik. A probiotikus baktériumok szaporodását szelektíven támogató nememeszthető élelmiszer-összetevők a

prebiotikumok. Ezek túlnyomó részben oligoszacharidok. Számos kutató foglalkozik újabb és újabb probiotikus törzsek izolálásával és vizsgálatával, valamint azok szaporodását szelektíven támogató prebiotikumok előállításával. A probiotikus mikroorganizmusokkal szemben támasztott legfontosabb követelmények, hogy humán eredetűek legyenek, túléljék a felső béltraktuson való áthaladást, rövidszénláncú zsírsavakat termeljenek, így a pH-t csökkentve gátolják a patogének elszaporodását, valamint tapadjanak a humán bélhámsejtekhez. Ez mutatja, hogy egy probiotikus törzs ipari alkalmazásba vételét rendkívül sok kutatási munka előzi meg.

Jelenleg a tejiparban leggyakrabban alkalmazott *Bifidobacterium* faj a *B. lactis*. Rendszerint azért esik a gyártók választása erre a törzsre, mert jó sav és oxigéntűrő képességekkel rendelkezik. E törzs humán eredetét azonban számos kutató cáfolja. Munkám során olyan humán forrásból történő bifidobaktériumok izolálásával és vizsgálatával kívántam foglalkozni, melyek megfelelnek a probiotikumok kritériumainak és ugyanakkor kiváló technofunkcionális tulajdonságot mutatnak.

Célkitűzések

- Eljárás kidolgozása humán forrásból és élelmiszerekből bifidobaktériumok izolálására
- Az izolátumok faji besorolása molekuláris genetikai módszerrel
- Alternatív módszerek kidolgozása a bifidobaktériumok faji besorolására
- Prebiotikus oligoszacharidok hasznosításának vizsgálata bifidobaktériumokkal és enteropatogénekkel
- Bifidobaktériumok fiziológiai tulajdonságainak jellemzése
 - Antagonista hatás enteropatogénekre
 - Tapadás humán szövettenyészetéhez
- Bifidobaktériumok élettani hatásának vizsgálata állatetetés kísérletekben
- Túlélési képesség vizsgálata az emésztőtraktust szimuláló kísérletekben
- Vastagbélben kifejtett hatások vizsgálata in vitro modell kísérletekben

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A vastagbél mikrobiotája

A vastagbél biológiai funkciói a víz és bizonyos elektrolitok felszívódásában és kiválasztásában, ezenkívül a salakanyag raktározási és ürítési folyamataiban vannak. Az utóbbi évtizedekben azonban egyre nagyobb figyelmet fordítanak a vastagbél emésztési funkciói mellett az egészségre kifejtett hatására. Ebből a szempontból kiemelkedő fontosságú a bél mikrobiotájának összetétele. Az emberi szervezetben lévő mikroorganizmusok közül a legtöbb a vastagbélben található, 10^{14} baktérium jut a béltartalom minden grammjára. Ez több, mint testi sejtjeink tízszerese [HOLZAPFEL *et al.*, 1998]. A bélbaktériumok fermentációs tevékenységük következtében különböző, a szervezetre kedvező és káros hatású végtermékeket képezhetnek. Vannak például olyan bélbaktériumok, melyek a szénhidrát és fehérje anyagcseréjük során különböző rövid láncú zsírsavakat (SCFA= short chain fatty acid) termelnek, ezáltal csökkentik a vastagbél pH-ját, kiszorítva a káros N-nitrozó vegyületeket és toxinokat termelő baktériumokat. Ezért igen figyelemreméltó a bélflóra összetételének befolyásolása az étrend segítségével. A cél az, hogy a bélben lévő bifidobaktériumok és laktobacillusok számát és aktivitását növeljük.

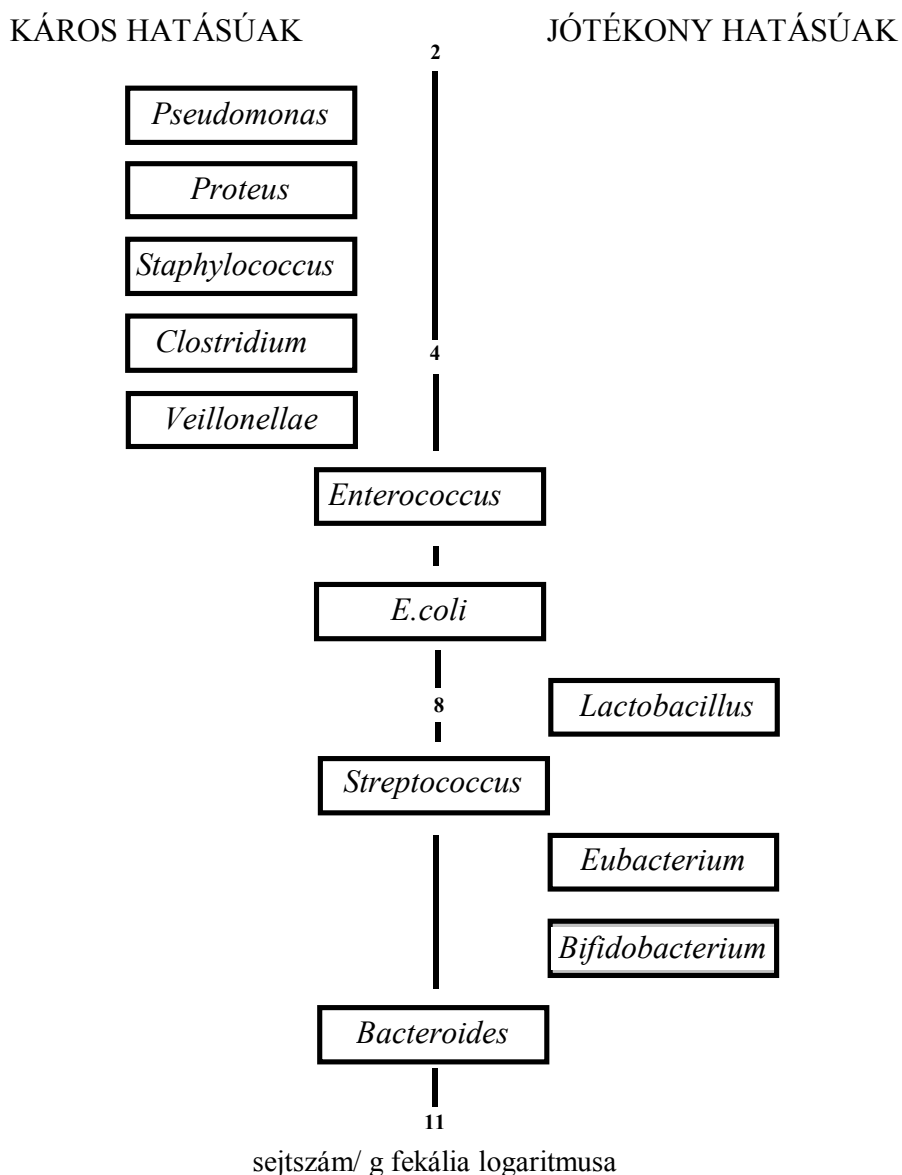
Az emberi bélmikrobiota igen összetett [SIMON *et al.*, 1984], kb. 50 baktérium nemzetség több mint 500 faja él a vastagbélben. Ezek élettevékenységeit a vastagbél felépítése és fiziológiája befolyásolja. Aktivitásuk a rendelkezésre álló szubsztrátumoktól, redoxpotenciáltól, O_2 eloszlásától, pH-tól függően ingadozhat. A vastagbél jobb oldali részén élő mikrobáknak bőséges tápanyagkészlet áll rendelkezésére, ezért intenzíven szaporodnak és az SCFA termelés következtében jelentősen csökkentik a pH-t. A vastagbél bal oldali részén azonban kevés a hozzáférhető szubsztrátum, ezért a baktériumok sokkal lassabban szaporodnak és a pH ezáltal gyakran megközelíti a semleges értéket. Ennek következtében a vastagbél élőközössége tehát igen heterogén.

Az újszülöttek emésztőtraktusának mikroflórája születéskor az anya vaginális és fekáliás mikrobiotájából oltódik be. Eleinte a fakultatív anaerob szervezetek, mint pl. az *Escherichia coli* és az *Enterococcus*-ok vannak túlsúlyban. Ezek hozzák létre azt a környezetet, mely a szigorúan anaerobok növekedését teszi lehetővé. A különböző módon táplált csecsemők vastagbél mikrobiotájának összetételében eltérés tapasztalható. Az anyatejjel táplált csecsemők fekáliájában *Bifidobacterium* populáció volt az

uralkodó, *Enterococcus* mindössze 1%-ban volt jelen. A tápszerezrel táplált csecsemőknek ezzel ellentétben összetettebb a bélflórája: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus* mind megtalálhatóak benne [GIBSON és ROBERFROID,1995]. Ez arra vezethető vissza, hogy az anyatejben lévő bifidofaktorok a tápszerekből hiányoznak [HURRELL, 1990]. Az elválasztás (2 éves kor) után a gyermek mikrobiotája egyre jobban hasonlóná válik a felnőttekéhez. Míg a csecsemők bélflórájának 85-99 %-át bifidobaktériumok alkotják, a kor előrehaladtával számuk lecsökken és a harmadik legnagyobb mikroba populációként szerepelnek [MODLER, 1994].

Az ember vastagbelében élő legtöbb mikroorganizmus szigorú anaerob anyagcserét folytat, a fakultatív anaerobok száma több nagyságrenddel alacsonyabb, mint az obligát anaeroboké. A bél mikroflóra összetételének meghatározására a legegyszerűbb, bár nem a legjobb módszer a széklet vizsgálata. Egy kísérletben 141 véletlenszerűen kiválasztott személynél az egyes baktériumfajok előfordulását vizsgálták. Túlnyomó többségben a *Bacteroides* nemzetség Gram-negatív pálcái voltak jelen. Ezek a teljes mikrobiota 30%-át tették ki. Az egyéb uralkodó csoportok a bifidobaktériumok, eubakterek, klosztridiumok, laktobacillusok (Gram-pozitív pálcák) és Gram-pozitív coccusok voltak. A széklet vizsgálatánál nem tudunk a mintavételhez anaerob körülményt biztosítani, ezért az obligát anaerobok számát nem lehet pontosan meghatározni. Az egyéb kisebb számban fellelhető mikroorganizmusok: coliformok, metanogén és különböző szulfátredukáló baktériumok lehetnek.

Figyelembe véve a vastagbélben előforduló baktérium fajok széles választékát és a különböző növekedési szubsztrátumokat, nem meglepő, hogy a bél mikrobiota élőközössége sokféle lebontásra képes. A különböző anyagcsere utak a baktériumok előfordulási helyeitől és rokonsági fokaitól függően eltérőek lehetnek. A lebontási mechanizmus szerint különböző típusú baktériumokat ismerünk: szacharolitikusokat, nitrogénhasznosítókat és olyanokat, melyek gázokat (pl. hidrogént) fejlesztenek. A baktérium fajokat aszerint is megkülönböztethetjük, hogy károsak vagy hasznosak az emberi szervezetre (**1. ábra**). Az ismert **patogén hatások** amit kifejthetnek: bélfertőzés, májkárosodás, bélrothadás és rákos folyamatok előidézése. A **jótékony hatások**: gátolják a kártékony baktériumok szaporodását, erősítik az immunrendszert,



1. ábra Az emberi vastagbél mikrobiotájának összetétele
[GIBSON és ROBERFROID, 1995]

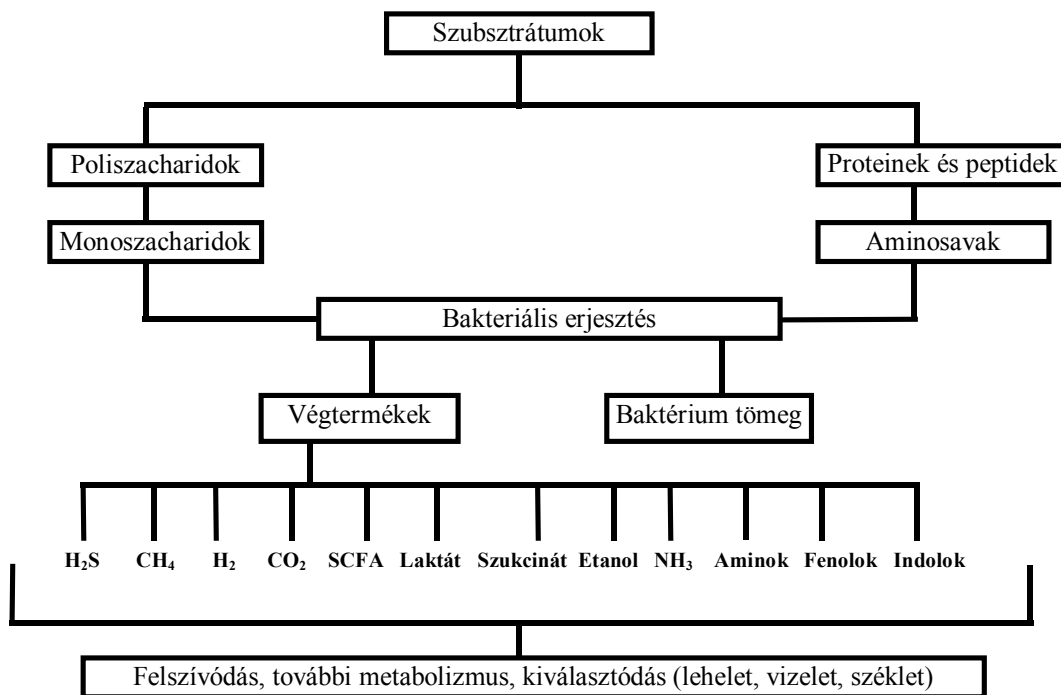
csökkenti a bélgáz képződést, serkenti az emésztési folyamatokat és az esszenciális tápanyagok felszívódását, valamint vitaminokat szintetizálnak.

A vastagbélben lejátszódó erjedési folyamatok fontos tényezője a rendelkezésre álló szubsztrátum. A bélbaktériumok szaporodásához olyan, elsősorban szénhidrát vegyületek szükségesek, melyek emésztetlenül haladnak át az emésztőcsatorna felső szakaszán. Ilyenek az egyes poliszacharidok, oligoszacharidok, nemfelszívódó cukrok. A megemésztett és lebontott egyszerű cukrok és oligoszacharidok nagy része felszívódik a vékonybélben, azonban néhány, mint pl. a laktóz, a raffinóz, a sztachióz és a különféle oligoszacharidok képesek emésztetlenül elérni a vastagbelet. Ezeken kívül sok

élelmiszeradalék, cukoralkohol (pl. szorbit és xilit) sem szívódik fel a vékonybélben. Sőt bizonyos tápanyagokból a szervezet önmaga is képes még tovább bontható szénhidrátokat előállítani. Ilyenek a glikoproteinek és a különböző poliszacharidok. *In vitro* körülmények között végzett kísérletek azt mutatták, hogy a bélflóra igen gyorsan képes bontani az endogén úton termelt szubsztrátumokat. Ebből a szempontból fontos nemzetségek: *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* és *Bacteroides*.

A vastagbélben élő baktérium fajok mindegyikének speciális ökológiai útja van. Mivel a mikroflóra metabolikus képességeiben heterogén, ezért a bélben zajló erjedés meglehetősen összetett folyamat. Sok esetben az egyes törzsek által kiválasztott végtermékek mások számára szubsztrátumként szolgálhatnak. A bélbaktériumok közül a *Bakteroida* nemzetség fajai a legintenzívebb poliszacharid hasznosítók. Egyéb, szénhidráton szaporodni képes baktériumok a *Bifidobacterium*, a *Ruminococcus*, az *Eubacterium*, a *Lactobacillus* és a *Clostridium* nemzetségekhez tartoznak. Számos baktérium faj azonban nem bontja a poliszacharidokat. Ezek a fajok az elsődleges poliszacharidbontásból származó vegyületeken szaporodnak (cross feeding). A szacharolitikus baktériumok alkalmazkodnak az összetett szénhidrátokon való szaporodáshoz, ezt bizonyítja az, hogy különböző polihidrolázokat és glikozidázokat képesek termelni. Habár néhány bélbaktérium szintetizálni képes számos különböző típusú szacharolitikus enzimet, a szénhidrát anyagcsere valószínűleg a sokféle enzim együttes működésétől és a különböző baktérium fajok részvételétől függ. Egy tipikus erjesztés általánosított sémáját a **2. ábra** szemlélteti:

A folyamat legfontosabb végtermékei a rövid szénláncú zsírsavak. Gázok is keletkezhetnek ezekben a folyamatokban, ilyen a hidrogén, a szén-dioxid és a metán. A hidrogén eltávozik, mivel egyes baktériumok hasznosítani képesek, vagy kiválasztódhatnak lehelet vagy flatulálás által. A gázokon kívül egyéb köztes termékek (etanol, tejsav, borostyánkősav és piruvát) is keletkezhetnek, amelyekből végül SCFA képződhet. Ezekből a folyamatokból a szervezet energiát nyerhet. A proteolitikus fajok olyan végtermékek felhalmozódását okozhatják, mint az ammónia, a fenolos vegyületek és az aminosavak. Az aminosav anyagcsere termékei az elágazó szénláncú zsírsavak, pl. izobutirát, izovalerát. E termékekből a baktériumok szintén nyerhetnek energiát, a szaporodásukhoz és a sejtfunkcióik ellátásához.



2. ábra Bélben élő baktériumok fermentációjának vázlata
[GIBSON és ROBERFROID, 1995]

Az ember bélflórájának összetételét többnyire állandónak tekinthetjük, azonban számos fizikokémiai tényező befolyásolhatja az eltérő szubsztrátumok hasznosítását. Ezek a következők lehetnek: tápanyagért való versengés, a vastagbélben uralkodó viszonyok, a szervezet egészségi állapota, a baktériumok anyagcseréje közötti kölcsönhatás és az étrend. Bizonyosnak tűnik, hogy a különböző összetételű diéták befolyásolni képesek a bélflóra összetételét és aktivitását. Jellemző példa erre, hogy a rostbevitel jótékony hatása közvetlen kapcsolatban áll a baktériumok anyagcseréjével, és az, hogy a magas szulfáttartalmú élelmiszerek fogyasztása befolyásolni képes a hidrogén felhasználását.

2.2 Funkcionális élelmiszerek

2.2.1 A probiotikum

A probiotikum kifejezést először LILLY és STILLWELL használta 1965-ben, de ekkor a maitól még kissé eltérő értelemben, olyan mikroorganizmus által kiválasztott anyagot értettek rajta, ami egy másik növekedését stimulálja. Ez tulajdonképpen az antibiotikum fogalmának ellentettje. Ettől kezdve a probiotikum szót egyre több értelemben használták és egy általánosabb jelentést nyert. 1971-ben SPERTI a szót olyan szöveti kivonatra alkalmazta, amely mikrobiális növekedést stimulál. PARKER

[1974] volt az első, aki szerint a probiotikum olyan organizmus vagy anyag, amely befolyásolja a béltraktus mikrobiológiai egyensúlyát. 1989-ben FULLER a következő definíciót fogalmazta meg: A probiotikum olyan élő mikrobiológiai élelmiszer-összetevő, amely jótékonyan hat az állati szervezetre azáltal, hogy a bélflóra egyensúlyát befolyásolja. 1992-ben HAVENAAR és munkatársai kiszélesítették a definíciót a következőképpen: Mikroorganizmusok élő egysejt- vagy kevertkultúrája, amelyet állatoknál vagy embereknél alkalmaznak, amely jótékonyan befolyásolja a szervezet működését azáltal, hogy a belső mikroflóra tulajdonságait javítja. SALMINEN [1996] és SCHAAFSMA [1996] tovább bővítették a definíciót. SALMINEN [1996] szerint: a probiotikum élő mikrobakultúra vagy fermentált tejtermék, amely jótékony hatással van az egészségre és a szervezet emésztésére. SCHAAFSMA [1996] szerint a probiotikum élő mikroorganizmus, melyet ha elegendő számban juttatunk a szervezetbe, az emésztésre gyakorolt hatásokon kívül más, az egészségre gyakorolt hatása is van. A mai álláspontok szerint a probiotikum szó jelentéséhez legközelebb eső definíciót HAVENAAR és HUIS IN'T VELD [1992] írja le: Egy készítmény vagy termék, amely élő jól definiált mikroorganizmusokat megfelelő mennyiségben tartalmaz, és amelyek megváltoztatják a mikroflórát (implantációval vagy kolonizációval) a szervezet egy részében és ezáltal jótékony egészségügyi hatást fejtenek ki a gazda szervezetre.

A probiotikumok fogalmának kritériumai

1. Az emberi béltraktus honos organizmusa legyen.
2. Túlélje a bél felső szakaszát (az emésztőenzimekre, epesavakra rezisztens legyen).
3. A bél hámsejtjeihez tapadjon és képes legyen ott szaporodni
4. A szervezetre előnyös hatást gyakoroljon.
5. Ipari szempontból nagy mennyiségben és olcsón előállítható legyen.
6. A felhasználás és tárolás alatt életképes és genetikailag stabil maradjon [CHARTERIS, 1998a]

2.2.1.1 Napjainkban alkalmazott probiotikumok

Minden probiotikus baktérium, amit élelmiszerekben vagy táplálék-kiegészítőkben használnak a *Lactobacillus*, *Enterococcus* vagy *Bifidobacterium* nemzetségbe sorolható. A bifidobaktériumoknak bár sok közös fenotípusos tulajdonságuk van a tejsavbaktériumokkal - és sokan ezért közéjük sorolják őket -, de filogenetikailag távol állnak tőlük [HOLZAPFEL *et al.*, 2001].

Manapság a laktobacilluszokat (*Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*) bifidobaktériumokat (*B. lactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*) sztreptokokkuszokat (*Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*) szintenyészetként vagy kevert kultúráként használják probiotikumként (1. táblázat).

1. táblázat Probiotikus termékekben alkalmazott mikroorganizmusok

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Más tejsavbaktériumok	Nem tejsavbaktériumok
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	<i>Bacillus cereus</i> var <i>toyoi</i> ^{1,2}
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ³	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{1,2}
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ²
<i>subsp. bulgaricus</i> ³		<i>Pediococcus acidilactici</i> ³	
<i>L. gallinarum</i> ¹	<i>B. lactis</i> ⁴	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ¹	<i>Saccharomyces boulardii</i> ²
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Sterptococcus thermophilus</i> ³	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

¹főleg állatoknál alkalmazzák ²főleg gyógyszerkészítményben alkalmazzák ³probiotikus hatása kevésbé bizonyított ⁴valószínűleg a *B. animalis* szinonímája [HOLZAPFEL *et al.*, 1998]

Az emésztőtraktusban a bejuttatott probiotikum -vagyis élő mikroorganizmus- számos akadállyal találkozhat (pl. emésztő- és epesavak maró hatása). Bizonyított azonban, hogy a bifidobaktériumok képesek ellenállni ezeknek az akadályoknak, és így „sértetlenül” elérhetik a vastagbelet. Fennáll ennél egy sokkal fontosabb probléma; a bejuttatott mikroorganizmusokat meg kell 'honosítani' a bélben. Ehhez az szükséges, hogy hozzátapadjanak a bél hámssejtjeihez, mely igen nehezen valósulhat meg, mivel az ott honos bélbaktériumok akadályozhatják ebben. Ha legyőzték ezt az akadályt és megtapadtak, nemcsak a helyért, hanem a tápanyagokért is versenyezniük kell a körülöttük élő több száz fajta mikrobával.

Ezért ha a probiotikumot tartalmazó élelmiszert nem fogyasztják rendszeresen, a meghonosítani kívánt baktérium kimosódik, eltűnik a szervezetből. Ezt a folyamatot legyőzhetjük a probiotikumok rendszeres fogyasztásával [GIBSON és ROBERFROID, 1995; LEE és SALMINEN, 1995; SIMMERING és BLAUT, 2001].

2.2.1.2 Probiotikus baktériumok szelekciós kritériumai

A jelenleg piacon lévő probiotikus termékekben lévő baktériumok alkalmazásánál sokszor hiányoznak a tudományos alapok [O'SULLIVAN, 2001]. A probiotikumként alkalmazandó baktérium kultúrák kiválasztásánál többféle szempontot

kell figyelembevenni. Elsődleges feladat a fiziológiai és táplálkozás-élettani hatások és kölcsönhatások felmérése. Fontos, hogy az alkalmazott probiotikum túlélje a felső béltraktust és képes legyen aktívan „működni” a vastagbélben. BEZKOROVAINY [2001] vizsgálata szerint a probiotikumok túlélési aránya 20-40% volt a felső béltraktusban. GOLDIN és GORBACH [1992] probiotikus törzsek túlélésén és tapadásán kívül az antimikrobás anyagok termeléséről adnak számot.

A táplálkozásélettani szempontok közül a leggyakrabban a bélrendszeri betegségekre gyakorolt hatást vizsgálják. MARTEAU és munkatársai [2001] összefoglalják és kritikusan elemzik a probiotikumok számos bélbetegséget, mint pl. antibiotikummal összefüggő hasmenést, gyomor- és bélhurutot, bélfertőzést és patogénkolonizációt, utazók hasmenését, irritábilis vastagbél szindrómát, gyulladásos vastagbél betegséget, vastagbélrákot megelőző hatásait. Bizonyított, hogy a probiotikus fermentált készítmények javítják a laktózbontást és megszüntetik a laktózintolerancia kórjeleit [DE VRESE *et al.*, 2001]. A probiotikumok terápiás előnyeiről: antikarcinogenitás, bélfertőzés, laktózintolerancia kezelése GOLDIN és GORBACH számolnak be [1992], ezeken kívül immunmoduláló hatását és az élelmiszerallergia tüneteinek csökkentésében játszott szerepét KAUR és munkatársai [2002] valamint MATTILA-SANDHOLM [1999] foglalják össze

A technológiai kritériumok is döntő szerepet játszanak az élelmiszerek tervezésénél, így az alkalmazott baktériumkultúra technofunkcionális hatásait szintén figyelembe kell venni (**2. táblázat**).

2. táblázat Probiotikus baktériumok szelekciós kritériumai CHARTERIS nyomán [1998a]

	Kritérium
Technológiai	Olcsó tenyésztési körülmények Nagy sejtsűrűség Fagyasztva száríthatóság Nagy gyártási kihozatal Stabil termék
Orvostudományi In vitro vizsgálható	Tolerálja a gyomron való áthaladást Tolerálja a vékonybélben keresztüli áthaladást Epesó tűrés Növekedés a bél lumenében Hámszöveti adhézió Növekedés a bél hámszövetén Ko-aggregációs képesség Antimikrobiális anyagok termelése Antibiotikum rezisztencia
In vivo vizsgálható	Az immunrendszer erősítése Patogén mikroorganizmusok kolonizációjának gátlása Vastagbélrák kialakulásának csökkentése Szív- és érrendszeri betegségek kialakulási kockázatának csökkentése Laktózbontás elősegítése

TANNOCK [1998] leírja, hogy a probiotikumok kifejlesztéséhez elsősorban a bélmikrobiota tanulmányozására van szükség. DUNNE és munkatársai [2001] is tárgyalják a szelekciós kritériumokat. Konklúziójuk szerint valószínűtlennek tűnik, hogy egyetlen egy törzs képes legyen befolyásolni a szervezet mikrobiális rendszerét. Sokkal valószínűbb az, hogy ezek a hatások több törzs együttműködéseként jelentkeznek. TUOMOLA és munkatársai [2001] fontosnak tartják, hogy a probiotikus élelmiszerek minőségbiztosítási követelményei között ne csak az adott törzs tárolás alatti élősejtszámának ellenőrzése, hanem sav, epesav tűrése, valamint a vastagbélben való megtapadása is szerepeljen. Nem elhanyagolható a probiotikus törzsek biztonságosságának vizsgálata [ISHIBASHI és YAMAZAKI, 2001; O'BRIEN *et al.*, 1999] és a törvényi szabályozás [PRZYREMBEL, 2001] sem.

MATTILA-SANDHOLM [1999] beszámol egy a probiotikus élelmiszerek táplálkozásban betöltött szerepével foglalkozó PROBDEMO európai együttműködésről. A projekt demonstrálta, hogy a tudományos eredmények alkalmazása a probiotikumok kiválasztásának folyamatában olyan biztonságos, és hatékony probiotikus termékek előállításához vezet, melyek a vásárlók egészségmegőrzését szolgálják [BLUM *et al.*, 1999; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 1999; SAXELIN *et al.*, 1999; VAUGHAN *et al.*, 1999]. MATTILA-SANDHOLM és munkatársai [2002] összegzik a probiotikus

élelmiszerek előállításával kapcsolatos technológiai kihívásokat. Megemlítik, hogy 2001-ben alakult egy a pro- és prebiotikumokkal foglalkozó EU csoport, mely „Élelmiszer, Gasztrointesztinális-traktus működése és az emberi egészség” (Food, GI-tract functionality and human health) problémakörrel foglalkozik és 12 ország 42 laboratóriuma vesz részt a programban.

2.2.1.3 *Probiotikus termékek*

Egyre több és több probiotikus termék jelenik meg a tejiparban, ezek közül a legismertebb az édes acidofilus tej és AB tej, a joghurt típusú termékek, a kefir, a sajt (túró, juhsajt, gomolya, kemény sajt), az író, a vaj, és a fagylalt. A következők szerint csoportosíthatjuk a probiotikus termékeket:

- **Nem fermentált készítmény:** édes acidofilus tej (*L. acidophilus*) és édes AB tej (*L. acidophilus* és bifidobaktériumok)
- **Joghurttípusú termékek:** a joghurt, az egyik legértékesebb tejtermékünk eredete egészen az antik korig nyúlik vissza, a „joghurt” név az „élet” szinonímája volt több kelet-európai nyelvben is. A joghurtfogyasztás az 50-es, 60-as évek alatt vált igazán népszerűvé és elterjedtté, melyre a gyártók egyre újabb fajta joghurtok megjelenésével reagáltak. Az emberek több mint 30 %-a rendszeres joghurtfogyasztó. Minden joghurt kitűnő fehérje-, kalcium- és B₂-vitamin forrás. Összehasonlítva a tejjel, a joghurt gyakran még több proteint és kalciumot is tartalmaz. Ezenkívül vitaminokban és többfajta ásványi sóban is gazdag, ugyanakkor kisebb kalóriatartalmú termék. Ezen a csoporton belül pohárban erjesztett, habart és ivó joghurtot különböztethetünk meg. A klasszikus joghurt *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* és *S. thermophilus* az ún. joghurt mild *S. thermophilus* és valamilyen *Lactobacillus* faj többnyire *L. acidophilus* felhasználásával készül. A habart joghurtok és ivójoghurtok megfelelőbbek olyankor, amikor a probiotikus törzsszel nem akarunk fermentálni, hanem azt a csomagolás előtt keverjük bele a termékbe.
- A **kefir**, habár ideális probiotikus termék lehetne, sokan nem kedvelik, mert a csomagolása a termelő CO₂ hatására felpuffad és ezért a vásárlók romlottnak hiszik [HELLER, 2001].
- **Ömlesztett sajtok.** Két mód van a probiotikumok hozzáadására. 1; a starterrel együtt, 2; az ömlesztésnél. Ha a starterrel együtt adjuk, elveszhet a törzsünk a

koagulátummal amikor a savót elvezetjük, vagy a felmelegítésnél elpusztulhatnak, ezért a legjobb a tejszínnel együtt adagolni.

- **Érlelt sajtok.** Sózott sajtoknál (pl. Cheddar) lehetőség van a probiotikum hozzáadására sózáskor. Másik probléma a hosszú tárolási idő, kérdéses hogy ezalatt hogyan marad életben a törzs és hogyan változnak funkcionális tulajdonságai. A sajtmátrix jó pufferkapacitása, a magas zsírtartalom azonban megvédheti a probiotikus sejteket az érlelési idő alatt, sőt az emésztőtraktusban való áthaladás alatt is [STANTON *et al.*, 1998].
- A **fagylaltban** levő közeg kedvező hatásúnak bizonyult a bifidobaktériumok számára. Egyrészt a tejalapú közeg miatt, másrészt, ha alacsony hőmérsékleten tartjuk a baktériumokat, lelassítjuk metabolizmusukat, csökkentjük savtermelésüket, megakadályozhatjuk önpusztító tulajdonságukat. Sikeres kísérleteket hajtottak végre kutatók *Lactobacillus acidophilus* és *Bifidobacterium bifidum* törzsekkel fagylaltban való több hetes fagyasztva tárolás során, de készítettek fagylaltot *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* és *Bifidobacterium infantis* törzsek, valamint fruktooligoszacharidok hozzáadásával is. Eredményeik alapján megállapítható, hogy a fagylalt megfelelő élelmiszer mátrix, hogy a jótékony mikroorganizmusokat eljuttassuk a fogyasztókhoz.

A probiotikumok tejipari termékeken kívül való alkalmazása nagy kihívást jelent az élelmiszer mérnökök számára. A termék pH-ja, tárolási hőmérséklete, oxigéntartalma, a jelenlévő gátló mikroorganizmusok és vegyületek mind befolyásolják a probiotikum túlélését a termékben. Mikrokapszulázással és fagyasztva szárítással megvédhetőek a sejtek, így ezen technológiák fejlődésével biztosítható lesz, hogy sikeresen alkalmazzák a probiotikumokat nemcsak tejtermékekben, hanem gabonaipari termékekben, italokban, édességekben stb. [MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002]. MOLIN [2001] a probiotikus *L. plantarum*-ot növényi eredetű élelmiszerekhez, zabkásához adta.

2.2.2 Prebiotikumok

A prebiotikumokat GIBSON és ROBERFROID [1995] a következőképpen definiálták: nememészthető élelmiszer-összetevők, melyek azáltal hatnak előnyösen a szervezetre, hogy emésztetlenül jutnak el a vastagbélig, és így növekedési szubsztrátumaikká válhatnak az ott rezidens hasznos bélbaktériumoknak, elősegítve ezzel azok szaporodását.

Prebiotikum alatt általában a különböző nememészthető szénhidrátokat értjük, bár néhány fehérje, peptid és lipid is lehet prebiotikus hatású. Sok, a természetben előforduló szénhidrát (poli- és oligoszacharid) teljesíti a prebiotikumok követelményeit. A prebiotikumok közé sorolják - a különböző oligoszacharidokon kívül - a rezisztens keményítőt is [BROWN *et al.*, 1998; CRITTENDEN *et al.*, 2001; CUMMINGS *et al.* 1996; FERGUSON *et al.*, 2000]. Az utóbbi években számos új típusú oligoszacharidot is kifejlesztettek, melyeket enzimatis úton állítanak elő, illetve egyszerű cukrokból, szacharózból vagy laktózból kiindulva szintetizálnak vagy poliszacharidok, pl. keményítő, inulin, xilán lebontásával nyernek [NAKAKUKI, 1993].

A nememészthető szénhidrátoknak számos funkcionális hatása lehet a szervezetre: késleltetik a gyomorürülést, megváltoztatják az áthaladási időt, növelik a glükóztoleranciát, csökkentik a zsír- és koleszterinfelszívódást azáltal, hogy az epesavakat megkötik, megnövelik a bél térfogatát és vízszállítási kapacitását, megváltoztatják a mikrobiális fermentációt [GIBSON és WANG, 1994b; LOO *et al.*, 1999]. Ezek a szénhidrátok szubsztrátumot biztosítanak a bélbaktériumoknak. A bifidobaktériumok növekedését és szaporodását segítik, ezért általában „bifidogén hatásról” beszélhetünk [MODLER, 1994]. Már az ötvenes években kimutatták, hogy az anyatej és a kolosztrum elősegíti a bifidobaktériumok növekedését és megtelepedését a csecsemők emésztőtraktusában [PETSCHOW és TALBOTT, 1990]. Az oligoszacharidok, a laktóz és a lipidek után, a harmadik legfontosabb komponensek az anyatejben. Az anyatej oligoszacharidtartalma a szoptatási periódus folyamán változik: az előtej szénhidrátjainak még 24 %-át teszi ki, az első hónapban 19 %-ra a második hónapban 15%-ra csökken. A bifidogén hatáson kívül az oligoszacharidoknak nagyon fontos hatása van az élet első heteiben az agy fejlődésére. Hidrolízisük során monoszacharidok és szíálsav képződik. A szíálsav az agy gangliomasejtjeinek és glikoproteinjeinek fontos alkotórésze. Az anyatej oligoszacharidoknak anti-infektív hatásuk is van, mivel gátolják egyes baktériumok tapadását a bélnyálkahártya sejtjeihez. A mechanizmus a baktériumok megtelepedésén alapul. Ebben az esetben az oligoszacharidok a bélsejtek receptor analógjaként és homológjaként működnek, mivel az enteropatogének és toxinjaik az oligoszacharidok glikoprotein részét használják kötőhelyként. A fertőző ágensek az oligoszacharidokhoz kapcsolódnak, így nem kötődnek a bélfalhoz, hanem a béllumenben maradnak, majd kiürülnek [URGELL és ORLEANS, 2001].

A prebiotikumokra irányuló kutatások mindenekelőtt a bifidogén hatású oligoszacharidokra koncentráltak. Általában a prebiotikumként forgalmazott oligoszacharidok nem tiszta termékek, tartalmazzák az adott vegyületcsoport di-, a különböző polimerizációs fokú oligo-, ill. poliszacharidjait és a monomerjeit is.

Az oligoszacharidok tulajdonságai:

1. Vízoldhatóak, nem kötik meg az ásványi anyagokat, így nem okozzák azok kiürülését.
2. Enyhén édesek, így ízük kedvező az élelmiszerekben.
3. Fizikailag stabilak, így kedvező állományt biztosítanak a terméknek
4. Nem okoznak olyan mértékű bélgázképződést, mint a rostok vagy a hüvelyesek szénhidrátjai [TOMOMATSU, 1994].

Japánban igen sokféle ilyen vegyületet fejlesztettek ki. Ezek a szénhidrátok kémiai szerkezetük alapján csoportosíthatók. A Nemzetközi Tejtudományi Szövetség (IDF) által 1996-ban publikált tanulmány a funkcionális tulajdonságú szénhidrátokat 12 csoportba sorolja:

1. Galakto-oligoszacharidok
2. Laktulóz
3. Laktoszukróz
4. Frukto-oligoszacharidok
5. Palatinóz (izomaltulóz) oligoszacharidok
6. Glükózil-szacharóz (páros cukor)
7. Malto-oligoszacharidok
8. Izomalto-oligoszacharidok
9. Ciklodextrinek
10. Gentio-oligoszacharidok
11. Szójaoligoszacharidok
12. Xilo-oligoszacharidok

E vegyületek mind rendelkeznek funkcionális tulajdonságokkal, de közülük nem mindegyik (pl.: glüko-oligoszacharidok, ciklodextrinek) bifidogén hatású [ZIEMER és GIBSON, 1998].

A bifidogén hatású prebiotikumok főbb jellemzőit foglaltam össze a következő fejezetekben.

2.2.2.1 A bifidogén hatású oligoszacharidok

2.2.2.1.1 Galakto-oligoszacharidok (TOS)

A galaktooligoszacharidok olyan di-, tri-, tetra-, penta- és hexaszacharidok, amelyek főleg galaktózból állnak és a laktóz bioszintézise során keletkeznek a

β -galaktozidáz enzim transzgalaktoziláló hatására. Az *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* és *Bacillus circulans* β -galaktozidáz enzimének erős transzgalaktozidáz hatása van. Az *Aspergillus oryzae* β -galaktozidáz enzime által katalizált reakcióban a transzgalakto-oligoszacharidok nagy része 6'-galaktozillaktóz, amely az anyatejben is megtalálható. A *Streptococcus thermophilus* β -galaktozidáz enzime főleg diszacharidokat termel (Gal β (1-6)Glc, Gal β (1-3)Glc, Gal β (1-2)Glc és Gal β (1-6)Gal), amelyeket transzgalaktozilált diszacharidoknak (TD) neveznek, és a joghurt természetes összetevőiként szerepelnek.

A galakto-oligoszacharidok emészthetetlenek, nem rákkeltők. A forgalomban lévő termékek általában víztiszta, színtelen folyadékok, melyek viszkozitása kicsit nagyobb, mint az izocukoré. Édesítőerejük a szacharózénak 40%-a. Vízaktivitásuk a szacharózéval egyező. Gátolják a keményítő retrogradációját, az élelmiszerek kiszáradását. Bifidós joghurtban, gyermektápszerben, cukorkában, tésztákban, kenyérben, lekvárokbán, jégkémekben és bifidobaktérium kimutatására szolgáló szelektív táptalajokban is használják [MATSUMOTO *et al.*, 1993].

BOUHNİK és munkatársai [1997] klinikai vizsgálatokban bizonyították, hogy a transzgalakto-oligoszacharidok 10g/nap/fő 21 napig tartó fogyasztásával a bélsárban a bifidobaktériumok száma nőtt, a kilélegzett hidrogén mennyisége csökkent.

2.2.2.1.2 Laktulóz

A laktulózt laktózból alkalikus izomerizációval állítják elő, mely során a laktóz glükóz része fruktózzá konvertálódik. Az eredmény a laktulóz diszacharid, melynek a szacharózhoz viszonyított édesítő ereje 60-70%. Nem emészthető, támogatja a bifidobaktériumok szaporodását, hashajtóként is használják.

2.2.2.1.3 Laktoszukróz

A laktoszukróz egy triszacharid, amelyben a laktóz glükóz molekulájához β (2 $\rightarrow$ 1) glükozidos kötéssel egy fruktóz kapcsolódik. A laktoszukróz laktózból és szacharózból állítható elő, fruktofuranozidáz enzimmel végzett transzfruktozilációval (pH=5.8-6,2; T=55-60°C). A laktoszukróz sav és hőtűrése a szacharózéhoz hasonló. Erősen higroszkópos és jobb a vízmegkötő képessége, mint a szacharózé. Emésztetetlenül jut a vastagbélbe, ahol támogatja a bifidobaktériumok szaporodását. A vér glükózszintjét és az inzulintermelést nem növeli [KITAHATA és FUJITA, 1993].

2.2.2.1.4 Frukto-oligoszacharidok (FOS)

A frukto-oligoszacharidok lineáris oligoszacharidokból állnak, amelyek $\beta(1-2)$ glikozidos kötéssel egymáshoz kapcsolódó fruktóz egységekből álló molekulák, s fruktóz, vagy glükóz egységgel kezdődnek.

Az inulin különböző hosszúságú, fruktózból felépülő láncok keverékéből áll (kb. 60 fruktóz egységből álló láncokig). Az inulin több mint 36000 féle növényben előforduló tartaléktápanyag. Néhány az emberi táplálkozásban is jelentős növény inulin és rövidebb szénláncú fruktooligoszacharid tartalma (szárazanyagra vonatkoztatva): cikória: 15-20 %, fokhagyma: 9-16 %, búza: 1-4 %, csicsóka: 16-20 %, póréhagyma: 3-10 %, rozs: 0,5-1 %, spárga: 1-30 %, hagyma: 2-6 %, banán: 0,3-0,7 %. Ipari méretekben az inulint forró vizes extrakcióval cikóriából állítják elő. Az inulint a cukorbeteg is fogyaszthatja, mivel nem tartalmaz glükózt, az emberi vékonybélben emésztetlenül halad át és a glükóz abszorpciót is késlelteti. Az inulint folyékony és szilárd élelmiszertermékekben egyaránt alkalmazzák a viszkozitás, a fagyáspont, a nedvességtartalom, a szín, az emulgeálhatóság, valamint a szerkezet módosítására. Fontos tulajdonsága a magas koncentrációknál (>20 %), krémes termékek esetében a szájban jelentkező zsíros telt érzés. A Cosucra cég által gyártott Fibrulint zsírhelyettesítőként is használják.

Az ORAFTI cég (Belgium) által előállított RAFTILINE[®] márkanéven forgalmazott inulin termékekről bizonyították, hogy csökkentik a glikémiás választ, a széklet pH-ját, a vér lipidtartalmát [DELZENNE és KOK, 2001], a szorulás valószínűségét és a vér koleszterin szintjét (növelik a HDL/LDL arányt), növelik a széklet mennyiségét és gyakoriságát, valamint bifidogén hatásuk van: stimulálják a bifidobaktériumok anyagcseréjét és aktivitását. Savtűrő képességük elfogadható, nagy az oldhatóságuk, termostabilitásuk jó.

A rövidebb láncú frukto-oligoszacharidokat az inulin szabályozott enzimes hidrolízisével (ilyenek az ORAFTI cég által előállított RAFTILOSE[®] termékek), valamint bioszintetikus úton ipari méretekben szacharózból kiindulva β -fruktofuranozidáz enzimmel (NutraFlora[®] termék) állítják elő.

A kiinduló szacharózoldat nagy koncentrációja elősegíti a transzglikozilációt. A keletkezett frukto-oligoszacharidok 2-4 $\beta(1\rightarrow2)$ kötéssel összekapcsolódó fruktozil egységet tartalmaznak, amely a terminális α -D-glükózrészhez kapcsolódik. A keletkező főbb termékek: 1-kesztóz (Glu-Fru₂), 1-nisztóz (Glu-Fru₃) és 1^F-fruktozilnisztóz (Glu-

Fru₄), amelyeket a glükóztól, a fruktóztól és a maradék szacharóztól kromatográfiás módszerekkel választják el.

A frukto-oligoszacharidok élettani hatásáról számos szerző beszámol [ROBERFROID, 1993,1999b; WANG és GIBSON, 1993] . *In vivo* vizsgálatokkal bizonyították, hogy a bejuttatott inulin és oligofruktóz átlagosan 88%-ban emésztetlen marad a vékonybélben, mivel a székletből már nem kimutatható, a vastagbélben mikrobiológiai úton bomlik le [CUMMINGS *et al.*, 2001; CUMMINGS és MACFARLANE, 2002]. A vastagbélben honos baktériumok az inulint és az oligofruktózat elsősorban rövidszénláncú zsírsavakká és laktáttá fermentálják, amelyek a szervezetbe felszívódhatnak. Jelenlegi ismereteink szerint az inulin és az oligofruktózat hatékonyan elősegítik a bélmikroflóra egészséges egyensúlyának fenntartását. GIBSON [1999] bizonyította, hogy az oligofruktóz és az inulin megváltoztatja a vastagbélflórát a bifidobaktériumok javára. CATALA és munkatársai [1999] gnotobiotikus fürjekben végzett kísérlettel igazolták, hogy az oligofruktózat bifidobaktériumok számát növelik. Az inulin és az oligofruktózat rendszeres fogyasztása szerepet játszhat a vastagbélrák kockázatának csökkentésében [BIACS, 2000], valamint pozitív hatással van a táplálékban található ásványi anyagok, a kalcium és a magnézium abszorpciójára, biológiai felhasználhatóságára [CASHMAN, 2002; GRIFFIN *et al.*, 2002; LOO *et al.*, 1999; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2001, SCHOLZ-AHRENS és SCHREZENMEIR 2002]. A frukto-oligoszacharidokat a szájban előforduló *Streptococcus mutans* nem bontja, így nem képződnek savak, tehát nem okoznak fogszuvasodást [ROBERFROID, 2001].

A frukto-oligoszacharidok beviteli dózisát a humán tanulmányokban 4-15 g/nap tartományban adják meg [ROBERFROID és GIBSON, 2002]. BUDDINGTON és munkatársai [1996] humán klinikai vizsgálatok során kimutatták, hogy már 4 g neosugar/nap fogyasztása is pozitív hatást gyakorolt a fekálmikrobiota összetételére, valamint csökkent néhány redukív enzim aktivitása is. RAO [1999] a frukto-oligoszacharidok optimális mennyiségét napi 4 g-ban határozta meg egy *in vitro* kísérlet alapján. BOUHNİK és munkatársai [1998] a rövid láncú FOS optimális arányát, ami még nem okoz kellemetlen tüneteket, de már jelentősen növeli a székletből kimutatható bifidobaktériumok számát 10 g/nap adagban adják meg.

2.2.2.1.5 Palatinóz (izomaltulóz)

A palatinóz szerkezete 6-O- α -D-glükopiranozil-D-fruktofuranóz. Szacharózból állítják elő rögzített α -glükoziltranszferáz /izomaltulóz szintáz enzim segítségével. Kis

kalóriatartalmú édesítőként használják. Nem okoz fogszuvasodást (*Streptococcus mutans* nem képez savat az izomaltulózból), lebomlik a vékonybélben, ezért nem prebiotikus hatású. Azok a palatinóz oligoszacharidok, amelyek a palatinóz intermolekuláris dehidratációjakor keletkeznek emésztetlenül érik el a vastagbelet és stimulálják a bifidobaktériumok szaporodását [NAKAJIMA és NISHIO, 1993].

2.2.2.1.6 Izomalto-oligoszacharidok

Az izomalto-oligoszacharidok mind $\alpha(1\rightarrow6)$ mind $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidos kötéssel kapcsolódó glükóz molekulákból épülnek fel. Előállításuk keményítőből történik. Az első lépésben a keményítőt elfolyósítják α -amilázzal, ezután az elfolyósított keményítőt β -amilázzal és α -glükozidázzal kezelik. A β -amiláz a keményítőt maltózzá hidrolizálja, az α -glükozidáz transzglükozidáz aktivitása révén izomalto-oligoszacharidokat állít elő.

Az izomalto-oligoszacharidok bizonyítottan támogatják a bélben a bifidobaktériumok szaporodását [KOHMOTO *et al.*, 1988.]. Hatásaik a széklet összetételére: csökkentik a pH-t, a rövid szénláncú zsírsavak mennyiségét növelik, csökkentik a káros végtermékek (fenol, indol, szkatol, 4-etilfenol) mennyiségét. Fogszuvasodás gátló hatásúak. Enyhén édeskes ízűek, édesítő erejük a szacharózénak kb. fele. Viskozitásuk kicsi: a keményítőszirup és a cukor viszkozitása között van. Az élesztők nem erjesztik [YATAKE, 1993].

2.2.2.1.7 Gentio-oligoszacharid

A gentio-oligoszacharid glükóz egységekből $\beta(1\rightarrow6)$ glikozidos kötésekkel épül fel. Glükóz szirupból transzglükozilálással állítják elő. Nem bomlik le a felső emésztőtraktusban, és támogatja a bifidobaktériumok és laktobacillusok szaporodását. Igen kis mennyiségben állítják elő. Alkalmazása még nem elterjedt.

2.2.2.1.8 Szójaoligoszacharidok (SZO)

Az ún. szójaoligoszacharid szirup vízoldható főleg mono-, di-, tri-, és tertaszacharidokból áll, fő alkotója a raffinóz és a sztachióz. A szójafehérje gyártásánál keletkező szójababsavóból nyerik. Édes ízű, édesítőereje a szacharózénak kb. 70-75%-a. Viskozitása nagyobb, mint a szacharóz vagy a fruktóz szirupnak. Fagyáspontja a szacharózéval megegyező, 160 °C-ig hőstabilis. Egy *in vitro* kísérletben a *B. bifidum* kivételével támogatta a bifidobaktériumok szaporodását. Egy *in vivo* kísérletben, melyben 10 g/nap adagban fogyasztották, kimutatták, hogy a bélsárban nőtt a

bifidobaktériumok száma, a káros enzimek (azoreduktáz, β -glukuronidáz) aktivitása csökkent [KOGA *et al.*, 1993].

2.2.2.1.9 Xilo-oligoszacharidok (XO)

A xilo-oligoszacharidok xilóz egységből felépülő oligomerek. Gyártásukat ipari méretekben lignocellulózt tartalmazó anyagból (LCM) végzik. A lignocellulózok három polimerből épülnek fel: lignin, cellulóz, hemicellulóz. A XO tipikus nyersanyagai: keményfa, kukoricacsutka, szalma, kipréselt cukornád, gyapothéj, maláta préselvény, korpa, mogyoróhéj. A XO gyártása során a xilánban gazdag nyersanyagból a xilánváz néhány heterociklikus éterkötését hidrolizálják, amely során alacsonyabb polimerizációs fokú terméket kapnak. A XO-at gyakran használják élelmiszeriparban jó technológiai tulajdonságai és egészségmegőrző hatása miatt. A xilobióz édesítőereje a szacharózénak 30%-a. Igen nagy előnye a XO-nak a többi oligoszacharidhoz képest, hogy igen széles pH tartományban (2,5-8,0) és magas hőmérsékleten (100°C) is stabilak. A xilobióz vízakтивitása nagyobb, mint a xilózé, de közel azonos a glükózéval. A XO további tulajdonságai, hogy nincs mellékízük, nem karcinogének és kis kalóriatartalmúak.

Az emésztőenzimekkel végzett kísérletekben bizonyították, hogy a xilobióz nem bontható nyál, hasnyál, gyomornedv által. *In vivo* patkánykísérletekben fogyasztásuk növelte a bifidobaktériumok számát és a rövidszénláncú zsírsavak mennyiségét a bélrendszerben. A legtöbb *Bifidobacterium* képes volt hasznosítani a XO-t, míg az *E.coli* és klosztridiumok nem. A XO-at Japánban már használják funkcionális élelmiszerekben, több mint 60 vállalat, több mint 100 termékében megtalálható [VÁZQUEZ *et al.*, 2000].

A 12 osztályon kívül megemlíthetjük még az újonnan megjelenő glükooligoszacharidokat. Az α -glüko-oligoszacharidot (GOS) enzimatisz szintézissel állítják elő a *Leuconostoc mesenteroides* glükoziltraszferáz enzimének segítségével. Az enzim a szacharózból glükózt visz a maltózra, az emésztőenzimre rezisztens, egyes bifidobaktériumok képesek hasznosítani [DJOUZI *et al.*, 1995].

2.2.2.2 Rezisztens keményítő (RS)

Néhány keményítőről, mely nem emésztődik a vékonybélben bebizonyították, hogy prebiotikus tulajdonságai vannak és így funkcionális élelmiszeradalékként alkalmazhatók [CUMMINGS és BINGHAM, 1987; CUMMINGS *et al.*, 1996; FERGUSON *et al.*, 2000; GERMAN *et al.*, 1999; GREENAWAY és ANDREWS, 2000a-b].

Számos kutatást végeztek már ezen a területen, melyekben bizonyították a rezisztens keményítő funkcionális tulajdonságait, amelyek a következők:

- élelmirost forrás
- a termék állagának kialakítása
- probiotikus mikroorganizmusok növekedésének elősegítése
- probiotikus kultúrák túlélésének támogatása az élelmiszerekben
- megóvják a probiotikus baktériumokat az emésztőrendszeren való áthaladásnál
- vastagbélben is segítik a probiotikus baktériumok szaporodását
- segítenek csökkenteni és eltávolítani a patogén baktériumokat

Rezisztens keményítőből készült funkcionális élelmiszerek Ausztráliában és Új-Zélandon már évek óta kereskedelmi forgalomban vannak. Az ausztrál kutatók számos klinikai és táplálkozástudományi kísérlettel bizonyították, hogy számos baktérium képes rövidszénláncú zsírsavak szintézisével hasznosítani a rezisztens keményítőket, ezáltal biztosítva az egészséges bélműködést.

2.2.3 Szinbiotikumok

A pre- és probiotikumot egyaránt tartalmazó élelmiszereket szinbiotikus élelmiszereknek nevezzük. Mivel a szó maga is egy a szinergizmusra utal, csak abban az esetben használjuk helyesen, ha az adott prebiotikus komponens szelektíven támogatja a vele együtt lévő probiotikumot [SCHREZENMEIR és DE VRESE, 2001].

A pro- és prebiotikumok nem tehetők minden további nélkül egyenlővé a pro- és prebiotikus élelmiszerekkel. A probiotikus élelmiszer megfelelő koncentrációban élő probiotikus baktériumot tartalmaz és elfogyasztásuk után is igazolható a hatásuk. A prebiotikus élelmiszerek szállítják a tápanyagot a probiotikus baktériumoknak.

A pro- és prebiotikus élelmiszereknek szigorú kritériumoknak kell eleget tenniük.

- Alapvető követelmény, hogy ne legyen az egészségre káros hatásuk. A bennük lévő probiotikus baktériumoknak GRAS (Generally Regarded As Safe) státuszúnak kell lenniük. Kétségek merültek fel a magas antibiotikum rezisztenciával rendelkező probiotikus törzsek alkalmazásával kapcsolatban, ugyanis félő hogy a rezisztencia átkerülhet a patogén törzsekbe. Ma ez a terület igen vitatott téma az orvosok, mikrobiológusok és élelmiszertudománnyal foglalkozók körében.
- A feltételezett hatásokat *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is igazolni kell. Ezek a kísérletek szolgáltatják az adatokat a lehetséges, egészségmegőrzés céljából

fontos hatások mechanizmusának felderítéséhez, vagy új pre-, probiotikumok kereséséhez.

- Az, hogy a pro-, illetve prebiotikumok mekkora mennyiségben biztosíthatják a kívánt hatást, függ a fogyasztott ételkészítmény összetételétől és fizikai állapotától is. Egy probiotikumként kiválasztott baktériumtörzs és egy prebiotikum különböző ételkészítményekben való alkalmazásakor a feltételezett hatást minden lehetséges kombinációban bizonyítani kell.
- A pro- és prebiotikumok hatása bizonyos mértékben dóziszfüggő, de az emésztés időtartama is befolyásoló tényező. A koncentráció, amelynél még az összetevők jótékony hatásával számolhatunk, a fogyasztók egyéni adottságától is függ.
- Tekintettel kell lenni a társadalom azon szegmensére, akik valamilyen betegségben szenvednek, gyógyszeres kezelés alatt állnak, és akik a környezet egyes paramétereire sokkal érzékenyebbek, mint az egészséges emberek. E kisebbség számára is ki kell zárni minden, a funkcionális ételkészítményből származó veszélyforrást.
- Egy ételkészítmény előállításánál azonban nemcsak az egészségbiztonsági szempontok betartására kell törekedni, mert az ételkészítmény értéke az élvezeti és táplálkozás fiziológiai tulajdonságaitól is függ [DE VRESE és SCHREZENMEIR, 1998].

2.3 Bifidobaktériumok

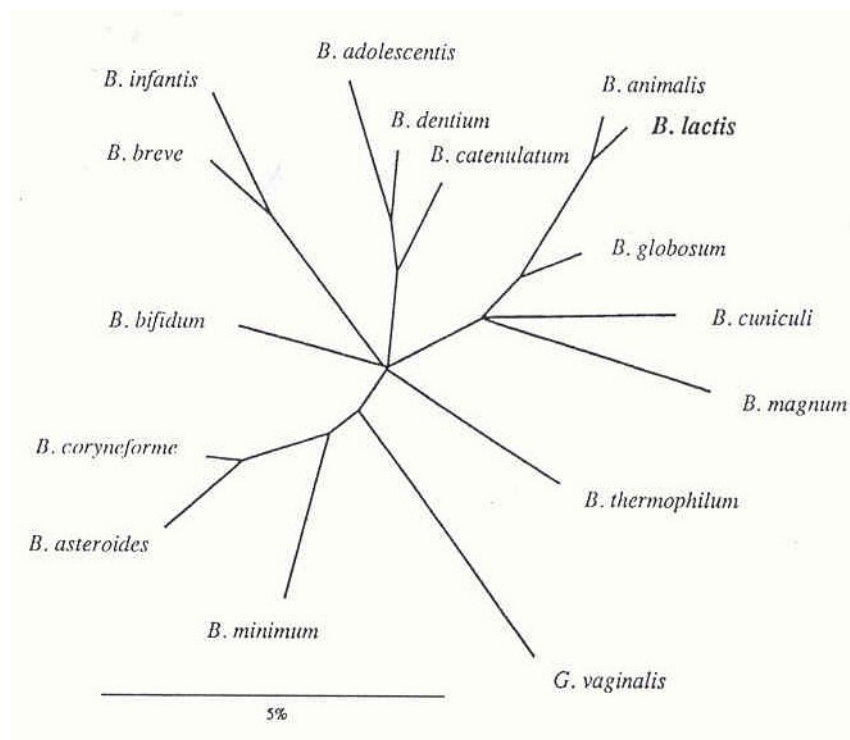
2.3.1 Taxonómia

A bifidobaktériumokat először Tissier izolálta és írta le. *Bacillus bifidus communis* (egyszerűbben *B. bifidus*) néven 1909-ben. Azóta a bifidobaktériumokat már sorolták a *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bacterium*, *Tissiera*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* és *Corynebacterium* nemzetségekhez is. 1924-ben Orla-Jensen javasolta, hogy a bifidobaktériumokat egy teljesen különálló nemzetségbe kellene sorolni, mely a *Bifidobacterium* nevet kapná. Ezt a javaslatot csak 1974-ben fogadták el és ekkor. Rogosa a Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8. kiadásában az *Actinomycetaceae* családon belül létrehozta a *Bifidobacterium* nemzetséget. Ezt megelőzően sokáig a *Lactobacillus* nemzetségben belül, mint *L. bifidus* találkozhatunk velük, ez a név tévesen még ma is számos újabb kiadású szakirodalomban is szerepel. Jelenleg a *Bifidobacterium* nemzetség 32 faja ismert [BIAVATI *et al.*, 2000].

Ezen fajok közül a *B. dentium*, a *B. inopinatum* és a *B. denticolens* bizonyult patogénnek; gennyesedést, valamint fogszuvasodást okoznak. A legújabb kutatások szerint a *B. denticolens*-t és a *B. inopinatum*-ot új nemzetséghez sorolták, így elnevezésük *Parascardovia denticolens* és *Scardovia inopinatum* lett [JIAN *et al.*, 2002]. ROY és WARD [1992] kifejlesztett egy gyors tesztet, mellyel a *B. dentium* elkülöníthető az egyéb *Bifidobacterium* fajoktól.

Eddig a patogenitással kapcsolatba hozható törzsek főleg az *adolescentis-dentium-angulatum-catenulatum* csoportból kerültek ki, bár felelőssé tettek már vérmérgezésért *B. longum*-ot és agyhártyagyulladásért *B. breve*-t is [BONAPARTE, 1997].

Igen sok vita folyik egyes fajok azonosságáról, számos szerző szerint a *B. lactis* azonos a *B. animalis*-sal [CAI *et al.*, 2000; JIAN és DONG, 2001], valamint a *B. longum* a *B. infantis*-sal [MEILE, *et al.* 1997].



3. ábra Bifidobaktériumok 16S rRNS alapján készített filogenetikai fája

A *B. infantis* reprezentálja a hozzá igen közeli rokonságban lévő *B. longum*, *B. pseudolongum* és *B. suis* fajokat (3.ábra)[MEILE *et al.*, 1997].

2.3.2 Előfordulás

A bifidobaktériumok fontos részét képezik a melegvérű állatok honos mikrobiotájának. Megtalálhatóak az emberi emésztő- és nemi szervrendszer különböző

részeiben [BENNO *et al.*, 1989; BIAVATI *et al.*, 2000; MITSUOKA, 1969; REUTER, 1963;]. Mennyiségük függ az életkortól, táplálkozási szokásoktól és az egészségi állapottól. Dominánsak a csecsemők mikrobiójában, különösen az anyatejjel táplált csecsemőknél [CHARTERIS, 1997]. Előfordulnak szennyvizekben is [LYNCH *et al.*, 2002; MUNOA és PARES, 1988; RESNICK és LEVIN, 1981].

A *B. breve* és a *B. infantis* csak az anyatejjel vagy tápszerrel táplált csecsemőknél fordul elő, míg a *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* mind újszülötteknél, mind felnőtteknél megtalálható, addig a *B. adolescentis* csak felnőtteknél [REUTER, 1963]. A vaginában *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* a jellemző, a fogászati anyagokban a *B. dentium*. Az életkor előrehaladtával a bifidobaktériumok száma jelentősen lecsökken [ARUNACHALAM, 1999]. A lakóhelynek is fontos szerepe lehet a bélmikrobiota összetételében, a falusi embereknél magasabb bifidobaktérium számot találtak, mint a városi embereknél. [BENNO *et al.*, 1989]. A különböző régiókból (Japán, Észak-Amerika, Afrika) származó emberek anaerob mikrobiójában található eltérést MOORE és MOORE [1995] tanulmányozták. Az állatokból származó bifidobaktériumok közül is számos gazdaspecifikus: a *B. magnum*, *B. cuniculi* csak nyulaknál, a *B. suis* csak sertéseknél, a *B. pullorum*, *B. gallinarum* csirkéknél, a *B. asteroides*, *B. indicum* csak méheknél fordul elő [BIAVATI *et al.*, 2000; MIKKELSEN *et al.*, 2003].

2.3.3 Azonosítás

2.3.3.1 Nemzetség szinten

1965-ben Scardovi és Trovatelli fedezte fel, hogy a *Bifidobacterium* nemzetséget más baktériumoktól a legegyszerűbben a fruktóz-6-foszfát-foszfoketoláz (F6PPK) enzim jelenlétének kimutatásával lehet megkülönböztetni. Ez az enzim előfordul még a *Gardnerella vaginalis*-nál [GAVINI *et al.*, 1996], azonban az eltérő fenotípusos tulajdonságok alapján elkülöníthetők.

A tejparban leggyakrabban a laktobacilluszoktól kell megkülönböztetni a bifidobaktériumokat. SCHLEIFER és LUDWIG [1995] 16S rRNS analízis adatai alapján a bifidobaktériumokat a nagy G+C tartalmú (>55%) Gram pozitív baktériumokon belül az *Actinomyces* elágazáshoz, míg a laktobacilluszokat a kis G+C tartalmú ún. *Clostridium* elágazáshoz sorolja. Egyetlen *Bifidobacterium* faj, amelynek G+C tartalma 45% a *B. indicum* [CROCIANI *et al.*, 1996].

Mások a laktobacilluszoktól való megkülönböztetésre olyan módszert fejlesztettek ki, mely az α -galaktozidáz enzim jelenlétének kimutatásán alapul [CHEVALIER *et al.*, 1990; DESJARDINS *et al.*, 1990]. LANGENDIJK és munkatársai [1995], valamint KAUFMANN és munkatársai [1997] a fenotípusos meghatározás helyett egy genetikai módszert ajánlanak, mely egy nemzetség specifikus 16S rRNS szekvencián alapul.

2.3.3.2 *Faji szinten*

Jelenleg széles körben elterjedt módszer a fermentációs tesztekkel való faji besorolás [CROCIANI *et al.*, 1994; GAVINI *et al.*, 1991; SCARDOVI *et al.*, 1979a]. Ezek a tesztek előzetes morfológiai és fiziológiai vizsgálatokat is igényelnek és nem mindig megbízhatóak [BIAVATI *et al.*, 1992; IWANA *et al.*, 1993; YAESHIMA *et al.*, 1991]. A házilag készített mikrolemezes azonosítással gyors és numerikus osztályozást végezhetünk [GAVINI *et al.*, 1991; BAHAKA *et al.*, 1993]. Számos szerző beszámol a bifidobaktériumok enzim mintázata alapján történő faji besorolásáról [BAHAKA *et al.*, 1993, CHEVALIER *et al.*, 1990, DESJARDIN *et al.*, 1990, YAESHIMA *et al.*, 1992a].

A *Bifidobacterium* fajok genetikai validálásához SCARDOVI és mtsai [1971] DNS homológia vizsgálatot alkalmazott. Számos követőjük akadt, akik újabb és újabb homológ DNS csoportokat írtak le a *Bifidobacterium* nemzetségen belül [LAUER és KANDLER, 1983; MATTEUZZI *et al.*, 1971; SCARDOVI és TROVATELLI, 1974; SCARDOVI és ZANI, 1974; SCARDOVI és CROCIANI, 1974; SCARDOVI *et al.*, 1979b]. Két törzs akkor sorolható egy fajhoz, ha legalább 80%-os DNS homológia van köztük [BIAVATI *et al.*, 1982].

A különböző *Bifidobacterium* fajok sejtfalának murein típusai alapján LAUER és KANDLER [1983] végzett faji besorolást. A bifidobaktériumok enzimeinek elektroforetikus mintázata is alkalmas a faji besoroláshoz. SCARDOVI és munkatársai [1979a-b] transzaldoláz és 6-foszfoglükonát dehidrogenáz (6PGD) enzimek elektroforetikus mobilitását keményítő-gél elektroforézissel vizsgálta. LAUER és KANDLER [1983] a transzaldolázok mobilitását disc-elektroforézissel poliakrilamid gélben tanulmányozta. A két előző elektroforetikus vizsgálat eredményeit összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a legtöbb esetben egyeznek a faji besorolások, jelentős különbség csak a *B. longum*, *B. infantis* és *B. suis* esetében található. Ezen fajok között igen szoros kapcsolat mutatkozik a DNS/DNS homológiájuk alapján, továbbá mindhárom faj ugyanazt a murein típust tartalmazza. Egyedül SCARDOVI és munkatársai [1979a] állapították meg azt, hogy a *B. suis* transzaldoláza gyorsabban

mozog, mint a másik két fajé. LAUER és KANDLER [1983] a bifidobaktériumok L-laktáz dehidrogenázát vizsgálva arra a következtetésre jutott, hogy ez az izoenzim faj-, sőt egyes esetekben törzsspecifikus, mert a DNS/DNS homológia alapján 80 %-ban hasonlító törzsek L-laktáz dehidrogenázának mobilitása eltérőnek bizonyult.

BIAVATI és munkatársai [1982], több mint 1000 törzset vizsgáltak az oldható sejtfehérjék poliakrilamid gél elektroforetikus mintázata alapján. Az adatokat a DNS/DNS homológia vizsgálat adataival vetették össze. Szoros korrelációt állapítottak meg a két vizsgálat eredményei között.

A 16S rRNS analízis is megfelelő módszer a nemzetségen belüli rokonság megállapításához. LEBLOND-BOURGET és munkatársai [1996] a 16S rRNS szekvencia alapján megalkották a *Bifidobacterium* fajok filogenetikus fáját és egybehangzóan más kutatócsoportokkal arra a következtetésre jutottak, hogy a közeli rokonságban lévő fajokat ezzel a módszerrel nem lehet elkülöníteni [CLAYTON *et al.*, 1995; FOX *et al.*, 1992; STACKEBRANDT és GOEBEL, 1994].

YAMAMOTO munkatársaival [1992] 16S rRNS szekvencia alapján oligonukleotid próbákat tervezett és hibridizáció segítségével a fontosabb humán fajok: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* és *B. longum* közvetlen azonosítására alkalmasnak ítélte. MATSUKI és munkatársai [1998a-b] 16S rRNS szekvencia alapján szintén létrehozott fajspecifikus (*B. longum*, *B. infantis*, *B. dentium*, *B. gallicum*) próbákat a vastagbél mikrobiotájában előforduló fajok azonosítására. BRIGIDI és munkatársai [2000] 16S rDNS célzott szekvencia PCR-rel *Bifidobacterium* törzseket határoztak meg táplálékkiegészítőkből és humán bélsárból az általuk kifejlesztett törzsspecifikus rDNS primerekkel. Ezzel a technikával végeztek még azonosítást MATSUKI és munkatársai [1998a-b], valamint VENTURA és munkatársai [2001b] is.

Az rRNS gén restrikciós mintázata alapján szintén végezhető faji azonosítás [MANGIN *et al.*, 1994, 1999; McCARTNEY *et al.*, 1996; VENTURA *et al.*, 2001a]. A restrikciós fragment polimorfizmust kombinálhatjuk a pulzáló gél elektroforézissel (PFGE), ami valószínű a legdiszkriminatívabb technika törzs szinten (McCARTNEY *et al.*, 1996). SATOKARI és munkatársai [2001] az amplifikált 16S rDNS denaturáló gradiens gél analízisével végezték bifidobaktériumok azonosítását.

LEBLOND-BOURGET és munkatársai [1996] leírták, hogy a 16S-23S rDNS köztes szakaszának evolúciós rátája tízszer nagyobb, mint a 16S rDNS-é. Ezt a szakaszt ITS (internally transcribed spacer) szakasznak hívják. 29 *Bifidobacterium* törzssel elvégezve a vizsgálatot megállapították, hogy a törzsek jól azonosíthatók ezzel a

módszerrel. KOK és munkatársai [1996] szintén ezt a technikát használták *Bifidobacterium* törzsek csecsemőbélisárból való azonosítására.

Habár igen sokan és sokféle módszert fejlesztettek ki bifidobaktériumok faji szinten való azonosításához, nem létezik egy általánosan használatos módszer [TANNOCK, 1999]. A fenti módszerek továbbá idő és költségigényesek, valamint nehezen végezhető rutin laborokban.

Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

Mikroorganizmusok azonosítására FTIR módszerrel először NAUMANN és munkatársai [1994] tettek javaslatot. A baktériumok FTIR spektruma egy ujjlenyomat szerű mintázat, mely reprodukálható és fajspecifikus. A spektrum reprezentálja a sejtkomponensek teljes összetételének, úgy mint fehérjék, membránok, sejtfalalkotók és nukleinsavak infravörös abszorbancia mintázatát. Ha rendelkezésünkre áll egy széleskörű spektrum referencia könyvtár, ezzel a módszerrel egy ismeretlen mikroorganizmus nagyon könnyen és gyorsan azonosítható [HELM *et al.*, 1991]. Ilyen spektumkönyvtárakat azonban még csak a *Lactobacillus* nemzetség egyes csoportjaira [CURK *et al.*, 1994], *Listeria* nemzetségre [HOLT *et al.*, 1995; LEFIER *et al.*, 1997], actinomicetákra [HAAG *et al.*, 1996], streptokokkuszokra, enterokokkuszokra [GOODRACE *et al.*, 1996], a *Bacillus cereus* csoportra [BEATTIE *et al.*, 1998, LIN *et al.* 1998], élelmiszereredetű élesztőkre [KÜMMERLE *et al.*, 1998] és korineform baktériumokra [OBERREUTER *et al.*, 2001] hoztak létre.

2.3.4 Morfológia

A sejtek különféle alakjai: rövid, vékony, szabályos, kokkoid szerű vagy hosszú pálcák gyenge görbülettel vagy kidudorodással, különféle elágazással; csúcsos, vékony, kettéágazó, bunkós bot alakú vagy simított véggel; egyedi vagy sok sejtből álló láncolattal; csillag vagy V alakba rendeződött aggregátumokkal. A sejtek szabálytalanul festődnek metilénkéssel. A telepek sima felületűek, domborúak, ép szélűek, színük a krém színűtől fehérig előfordulhat; fénylők és lágy konzisztenciájúak.

A sejtmorfológiát és változatait különböző tenyésztési körülmények között vizsgálták [REUTER, 1963; SCARDOVI, 1981]. A különféle helyekről izolált, újonnan felfedezett fajok lehetővé teszik, hogy tisztább képet alkothassunk a nemzetség morfológiájáról. A nagy számú TPY (Trypticase-Phytone-Yeast extract) táptalajra leoltott, anaerob körülmények között (GasPak system, BBL) tenyésztett minták

sejtmorfológiáinak összehasonlítása azt mutatja, hogy néhány fajnak meghatározott alakja vagy rendezettsége van, mely segíthet a felismerésükben. Jellemző példák, hogy a *B. bifidum* fajra jellemző az amfóra alak, a *B. magnum* a legnagyobb, a *B. asteroides* pedig csillag alakú elrendeződést mutat.

2.3.5 Sejtfalszerkezet

A bifidobaktériumok sejtfalszerkezete tipikus Gram pozitív szerkezet, vastag peptidoglükán (murein) résszel, ami poliszacharidokat, fehérjéket és teichonsavat tartalmaz. A bifidobaktériumok murein szerkezete a *Lactobacillus* és az *Actinomyces* nemzetségekkel mutatja a legközelebbi rokonságot. A *Bifidobacterium* és a *Lactobacillus* nemzetségek közötti eltérések a poliglicerin foszfolipidekben és aminoacil foszfatidilglicerinekben rejlenek [SCARDOVI, 1981]. A sejtfalszerkezet kémiai összetétele fajonként eltérő, ezt faji azonosításhoz is használják [LAUER és KANDLER, 1983]. ANDALOUSSI és munkatársai [1995] tejben, valamint pepton-élesztő kivonatlaktóz tápvelésben *B. longum* extracelluláris poliszacharid termelését mutatta ki. A kiválasztott polimer glükóz, galaktóz és kis mennyiségben hangyasavból és hexózaminból áll. A lipoteichonsav poliszacharid láncokkal létesít kapcsolatokat és fontos a baktériumsejt belfalhoz való tapadási képességében.

2.3.6 Fiziológiai tulajdonságok

A bifidobaktériumok Gram-pozitív, nem savtűrő, spórát nem képező, nem mozgó baktériumok [SCARDOVI, 1981].

2.3.6.1 Atmoszférikus igények

Habár a bifidobaktériumok anaerob mikroorganizmusok, a különböző fajok oxigéntoleranciája eltérő lehet. A *B. indicum* és a *B. asteroides* fajokon kívül nem képesek a hidrogén-peroxidot a kataláz enzimmal bontani. A hidrogén-peroxid pusztító hatása a fruktóz-6-foszfát-foszfoketoláz enzim inaktiválásán alapul [SCARDOVI, 1981]. A bifidobaktériumok a glükózanyagcsere során a NAD-ot NADH-vá redukálják. Molekuláris oxigén jelenlétében a NADH-oxidáz H_2O_2 -vé redukálja az oxigént. Ez a hidrogén-peroxid kiszabadul a sejtől és a NADH-peroxidáz vízzé redukálja. Ha ez utóbbi enzim aktivitása nem elég nagy, a hidrogén-peroxid nem tud széthasadni és toxikus lesz a bifidobaktériumokra. A bifidobaktériumok oxigéntoleranciáját az oxigénérzékenységért felelős enzimek aktivitásának mérésével igyekeztek igazolni. A NAD-oxidáz és a NAD-peroxidáz aktivitása fordítottan arányos az oxigéntoleranciával.

Amíg például a *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* részleges levegőbefűvés alatt is képesek növekedni, addig a *B. adolescentis* növekedése már igen kis koncentrációjú oxigén jelenlétében gátolt, és valóban ennek a fajnak a fenti háromhoz képest alacsonyabb NAD-oxidáz és NAD-peroxidáz aktivitása van [SHIMAMURA *et al.*, 1992].

2.3.6.2 Hőmérséklet és pH igények

A bifidobaktériumok optimális szaporodási hőmérséklete 37-43 °C között változik, de képesek 25 °C alatt és 45 °C felett is növekedni [SCARDOVI, 1981]. GAVINI és munkatársai szerint [1991] a 45 °C feletti tenyésztéssel az állati és a humán eredetű törzsek elkülöníthetők, a humán törzsek ugyanis nem képesek 45 °C felett szaporodni. A DONG és munkatársai [2000] által leírt új faj, a *B. thermacidophilum*, képes 49,5 °C-on is szaporodni.

Az optimális pH 6,5-7,0. pH=5,0 alatt, illetve pH=8,0 felett nem vagy csak igen kismértékű szaporodást jegyeztek fel [SCARDOVI, 1981].

2.3.6.3 Tápanyagszükséglet

Szénforrásként a bifidobaktériumok karbonátokat, bikarbonátokat igényelnek. Szerves savakat, zsírsavakat nem használhatunk effektív szénforrásként.

A bifidobaktériumok nitrogénforrásként képesek hasznosítani az ammónium sókat. Kivételek: *B. suis*, *B. magnum*, *B. choerinum*, *B. cuniculi*, melyek nem képesek szerves nitrogén nélkül szaporodni. Azok a fajok, melyek képesek a szerves nitrogén nélküli szaporodásra, jelentős mennyiségű aminosavat választanak ki a táptalajba. Például a *B. bifidum* 150 mg/liter treonint képes termelni. Más aminosav termelő fajok: *B. thermophilum*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. animalis*, *B. infantis*. Ezek leggyakrabban alanint, valint és aszparaginsavat termelnek. Előállítottak olyan analóg rezisztens mutánsokat, melyek megnövekedett izoleucin és valin termelést mutatnak [SCARDOVI, 1981].

A purin és pirimidin vegyületek nem esszenciálisak. A cisztein létfontosságú, nem váltható ki metioninnal, homociszteinnel vagy hasonló vegyületekkel. Egyes szerzők szerint a B vitaminok közül csak a biotin és a kalcium-pantotenát esszenciális, míg mások arról adnak számot, hogy a bifidobaktériumok a riboflavin kivételével képesek B vitaminokat szintetizálni, és így a riboflavin az amely igazi növekedési faktor a bifidobaktériumok számára. Vitaminigényüket tekintve a bifidobaktériumok heterogén csoportnak mutatkoznak, vitaminigényük nincs összefüggésben a fajok természetbeni eloszlásával [BIAVATI *et al.*, 1991a, SCARDOVI, 1981].

2.3.6.4 Bifidofaktorok

Bifidofaktoroknak nevezzük azokat az anyagokat, melyek elősegítik a bifidobaktériumok szaporodását, de nem esszenciálisak számukra. A bifidofaktor fogalmát már a Römpp Vegyészeti Lexikon 1960-as kiadásában is megtalálhatjuk.

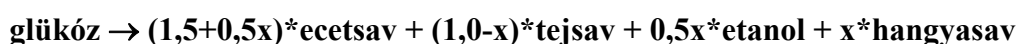
Igen fontos bifidofaktorok a tejből származó glikoproteinek. Számos olyan N-acetil-glükózamint tartalmazó szacharidot (pl. lakto-N-tetraóz, lakto-N-fukopentaóz I és II, lakto-N-neotetraóz, lakto-N-difukoheptaóz I és II, lakto-N-difukodekaóz) azonosítottak az anyatejben, mely elősegíti a bifidobaktériumok növekedését. Bifidofaktorokhoz soroljuk az anyatej oligoszacharidjain kívül az alfa-galakto-oligoszacharidokat (raffinóz, sztachióz) a frukto-oligoszacharidokat, a transzgalaktozilált oligoszacharidokat és a laktulózt is. AKIYAMA és munkatársai szerint [1992] a depolimerizált alginátok is segítik a bifidobaktériumok növekedését. Kísérletükben bifidobaktériumokat szaporítottak sovány tejben, melyet kiegészítettek algináttal, depolimerizált algináttal, laktoszukrózzal, galakto-oligoszachariddal. Azt tapasztalták, hogy a vizsgált prebiotikumok közül a depolimerizált alginát támogatta a legnagyobb mértékben szaporodásukat.

A szénhidrát alapú bifidofaktorokon kívül a peptidek is lehetnek bifidogén hatásúak [PETSCHOW és TALBOTT, 1990; POCH és BEZKOROVAINY, 1988]. Anyatej savófehérjéjét és kazeinjét tripszinnel és kimotripszinnel hidrolizálva olyan frakciókat nyertek, melyek szintén bifidofaktor hatásúnak bizonyultak. Ezeknek a frakcióknak kb. 60-70%-a szénhidrát: galaktóz, glükózamin, galaktózamin, szíálsav, és fukóz. Az emberi szervezetben az emésztés során kazein hidrolízise révén keletkeznek, nem szívódnak fel a vékonybélben, hanem eljutnak a vastagbélbe, ahol a hasznos bélbaktériumok tápanyagául szolgálnak. A legtöbb bifidofaktor kazein eredetű. Ha a humán eredetű kazeint pepszinnel vagy kimozinnel hidrolizálják, növelhető a bifidofaktor hatás [IBRAHIM, 1994]. A kappa-kazeinből származó glikomakropeptid (GMP) szintén fontos bifidofaktor, tehát mind a glikoproteinek, mind a polipeptid láncok fontos alkotórészei a bifidofaktoroknak. Egy *in vitro* kísérletben bizonyították, hogy a *B. infantis* és a *B. longum* jól nőtt humán eredetű kazeinen, de tehéntej eredetűn kevésbé. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy eltérő a két kazein oligoszacharid összetétele: a bovínkazeinnek sokkal alacsonyabb a szénhidráttartalma [MODLER, 1994]. Az enzimesen emésztett savófehérjéket ajánlják savanyított tejtermékek készítésénél bifidobaktériumok szaporodásának elősegítésére. IBRAHIM és BEZKOROVAINY [1994] összehasonlította az α -laktalbumin,

β -laktoglobulin, triptikáz-szója tápleves, phytone pepton, élesztő-, hús- és maláta kivonat bifidobaktériumok növekedésére gyakorolt hatását. Az élesztőkivonat és a két savófehérje növelte a leginkább a szaporodást.

2.3.6.5 Szénhidrátmetabolizmus

A bifidobaktériumok szacharolitikus baktériumok, minden törzs képes erjeszteni a glükózt, a galaktózt és a fruktózt. ROY és WARD [1990] kifejlesztett egy gyors gázkromatográfiás módszert a szénhidrátmetabolizmus mennyiségi meghatározására. A bifidobaktériumok szénhidrátanyagcsere útja különbözik mind a homo-, mind a heterofermentatív baktériumokétól. Az aldoláz és a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimek hiánya eleve kizárja, hogy a glükózt a glikolízis vagy a hexózmonofoszfát úton bontsák. A fent említett enzimek helyett a bifidobaktériumok fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz enzimet (EC 4.1.2.22) termelnek, amely a bifidus út (fruktóz-6-foszfát út) első enzime, a fruktóz-6-foszfátot acetilfoszfáttá és eritróz-4-foszfáttá hasítja. A cukorlebontás végterméke: ecetsav és tejsav 3:2 moláris arányban, bár egyes törzsek több ecetsavat és kevesebb tejsavat termelnek. Az ecetsav és tejsav elméleti 1,5:1-ös aránya azonban alig található meg a *Bifidobacterium* tenyészetekben, ugyanis a piruvát foszforilitikus hasítása hangyasavra és acetil foszfátra, valamint az acetil foszfát etanolra történő redukciója gyakran megváltoztatja a fermentáció egyensúlyát az ecetsav, hangyasav és etanol javára. Ha X a keletkező hangyasav mennyisége, az általános reakcióegyenlet a következőképpen alakul:



Szén-dioxidot nem termelnek (kivéve glükonát bontásakor). Kis mennyiségben hangyasavat, etanolt és borostyánkősavat is termelnek. A vajsav és a propionsav termelése nem jellemző. BARCENILLA és munkatársai [2000] izoláltak egy butiráttermelő *Bifidobacterium* törzset, amit *B.longum/infantis* fajként azonosítottak. Leoir galaktóz anyagcsere útjának enzimeit -galaktokináz (EC 2.7.1.6), hexóz-1-foszfát uridililtranszferáz (EC 2.7.7.12) és UDP galaktóz-4-epimeráz (EC 5.1.3.2)- konstitutívak glükózban szaporított *Bifidobacterium* tenyészetekben, míg más mikroorganizmusokban ezeket az enzimeket galaktóz és fukóz indukálja. Az UDP galaktóz-pirofoszforiláz jelenléte arra utal, hogy a humán eredetű nemzetség fajaiban a galaktóz útnak egy alternatív lehetősége is működik.

A foszfoenol-piruvát oxálacetáttá történő enzimes karboxilálását vizsgálva összehasonlítottak néhány -humán fekáliából és méhektől származó- *Bifidobacterium* fajt *Actinomyces bovis* és *Actinomyces israelii* törzsekkel: a bifidobaktériumoknál a reakció a foszfát akceptortól független és irreverzibilis volt, míg az *Actinomyces*-eknél ez az inozintól vagy guanozin-difoszfáttól függött [SCARDOVI, 1981].

2.3.6.6 *Proteolitikus anyagcsere*

A *B. bifidum*, *B. thermophilum*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. animalis* és *B. infantis* képesek alanint, aszparaginsavat, valint és treonint termelni *in vitro* körülmények között [SCARDOVI, 1981]. A bifidobaktériumok proteolitikus enzimrendszerét részletesen EL-SODA [1992] tanulmányozta. A *B. infantis*, *B. longum* és *B. adolescentis* fajoknál aminoszintetáz, dipeptidáz, tripeptidáz és karboxipeptidáz aktivitás jelenlétét írták le.

2.3.7 *Biokémiai jellemzők*

A bifidobaktériumok **kataláz** negatívak, kivéve a *B. indicum* és *B. asteroides* törzseket, melyek kataláz pozitívak amikor levegő jelenlétében nőnek, akár adagolunk hemint akár nem. Az **ammóniát** általában nitrogénforrásként hasznosítják. **Ureáz aktivitásra** 21 faj 414 törzsét vizsgálták. A legerősebb ureáz aktivitású törzsek a *B. suis* fajhoz tartoztak, melyek több mint 80 %-a mutatott aktivitást. A *B. cuniculi* kivételével minden fajnál találtak ureáz aktivitást. A humán *Bifidobacterium* fajokhoz tartozó *B. breve*, *B. longum* törzseinek csak 10 %-a mutatott ureáz aktivitást, a *B. bifidum* faj törzsei ennél is kevesebben. A bifidobaktériumokra nem jellemző a **nitrát-redukció**, azonban a lizált vörösvértestek jelenlétében szaporodó sejtek képesek erre. Ezen növekedési körülmények között citokróm b és citokróm d szintetizálódik [SCARDOVI, 1981]. A **zselatint** nem folyósítják és **indol** negatívak.

2.3.8 *Antibiotikum rezisztencia*

Általánosságban elmondható, hogy a *Bifidobacterium* fajok rezisztensek a kanamycin, a neomycin, a streptomycin, a polymyxin, a gentamicin, a nalidixin sav és a metronidazol antibiotikumokkal szemben. Az oleandomycin, a lincomycin, a clindamycin, a vancomycin, a penicillinG, az ampicillin, az erythromycin, a bacitracin, a chloramphenicol, a nitrofurantoin antibiotikumok erősen gátló hatásúak a bifidobaktériumokra. A tetraciklin érzékenység *in vivo* és *in vitro* körülmények szerint változó. A *Bifidobacterium* nemzetség fajai tehát egyforma érzékenységet mutatnak a

legáltalánosabban használt antibiotikumokkal szemben. Azonban a polymyxinnel szembeni érzékenység eltérő a fajok között, 10-500 µg/ml antibiotikum tartományban. A bifidobaktériumok antibiotikum rezisztenciáját számos kutató vizsgálta [LIM *et al.*, 1993; CHARTERIS *et al.*, 1998c; TEMMERMAN *et al.*, 2002]. CHARTERIS és munkatársai [1998c] által vizsgált összes törzs érzékeny volt ampicillin, penicillin G, erythromycin, cefalosporin, bacitracin, chloramphenicol, clindamycin és tetraciklin antibiotikumokra.

2.3.9 Antagonista hatás

A bifidobaktériumok egyik igen fontos tulajdonsága, hogy gátolni képesek más mikroorganizmusok szaporodását. Antagonista hatásukat számos patogén ellen, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* és *Vibrio cholerae* leírták [GIBSON és WANG, 1994a]. A gátlási mechanizmus főleg a rövidszénláncú zsírsavak (ecetsav, tejsav) termelésén alapul [IBRAHIM és BEZKOROVAINY, 1993a] bár néhány törzsnél leírták olyan antimikrobiális anyagok és bakteriocin (Bifidocin B) termelését, melyek széles spektrumban hatásosak mind Gram pozitív, mind Gram negatív baktériumokra [BIAVATI *et al.*, 2000]. Az ecetsav bakteriosztatikusabb a tejsavnál azonos pH körülmények között. Az, hogy a bifidobaktériumok -ellentétben a joghurtban előforduló egyéb baktériumokkal- ecetsavat is termelnek, magyarázza azt a tényt, hogy nagyobb gátló hatásuk van a káros baktériumokra. FUJIWARA és munkatársai [1997] emberi bélnyálkahártya GA1 sejtjén végzett kísérletben bizonyították, hogy egyes *Bifidobacterium* fajok által termelt fehérje eredetű faktor –melyet a folyadéktenyészet felülúszójából nyertek- gátló hatással van az enterotoxikus *E. coli* (ETEC) PB 176-os törzs kitapadására. BERNET és munkatársai [1993] 13 *Bifidobacterium* törzsnél vizsgálták azt, hogy van-e hatásuk a hasmenést okozó káros baktériumokra. Kísérleteikben egyes vizsgált *Bifidobacterium* törzsek az enterotoxikus és enteropatogén *E. coli*-ra, *Y. pseudo-tuberculosis*-ra és a *S. typhimurium* fajokra gátló hatást mutattak. LEE és munkatársai [2003] egészséges csecsemő bélsarából izolált bifidobaktériumokat szkrínelték a *Clostridium difficile* elleni antimikrobás hatásuk alapján. A *C. difficile* igen fontos kórházi patogén, mely felelős az antibiotikum fogyasztással társuló hasmenésért. A gátlást mutató törzseket *B. infantis*-ként azonosították.

2.3.10 Adherencia

A kolonizáció, a bél nyálkahártyájához való tapadás előnyt jelent a probiotikumként alkalmazott törzseknél. Az ember bélmikrobiotájának összetétele az

élet folyamán változik. Születéskor az emésztőrendszer steril, de a szülőcsatornából és a környezetből származó mikroorganizmusok gyorsan benépesítik. Az elsőként megjelenő mikroba az *E. coli*. Ez a baktérium lecsökkenti a redoxpotenciált, így az anaerobok is képesek kolonizálni. Ezen anaerobok közé tartoznak a bifidobaktériumok. Az anyatejben levő bifidofaktoroknak és a tápszerekben levő transz-galaktozilált oligoszacharidoknak köszönhetően válik uralkodóvá a csecsemő bélsárban a *Bifidobacterium* populáció. Az elválasztás után, a táplálékok drasztikus megváltozásával csökken a bifidobaktériumok száma és állandó szinten marad a felnőtt életkorban, majd idős korban jelentősen lecsökken. Az életkor jelentősen befolyásolja a probiotikus törzsek tapadását. Idős személyeknél azzal magyarázzák a bifidobaktériumok csökkenő számát, hogy a bélnyálkahártya változása miatt azok kevésbé képesek megtapadni. OUWEHAND és munkatársai [1999] kereskedelmi forgalomban starter kultúráként kapható *Bifidobacterium* törzsek tapadóképességét vizsgálták az általuk preparált, különböző életkorú egyedek nyálkahártyáján. *In vitro* kísérleteik eredményei is azt mutatták, hogy idős emberektől származó preparátumokhoz kevésbé tapadnak ezek a törzsek. Megvizsgálták azt is, hogy a táplálkozással befolyásolható-e a probiotikus törzsek tapadása. Az alacsony ill. magas rosttartalmú étrend nem befolyásolta jelentősen a bélsárban kiválasztott nyálka (mucus) tapadási felületét, de a magas rosttartalmú étrenden lévők több bélsár nyálkát (mucus) termeltek [OUWEHAND *et al.*, 2000]. PEREZ és munkatársai [1998] azt találták, hogy azok a törzsek, melyek agglutinálódó tulajdonsággal rendelkeznek, jobban tapadnak a humán szövettenyészetekhez valamint, hogy a hidrofobicitás is szükséges a tapadáshoz. Amikor az elektrosztatikai töltés negatív a sejt felületén, a sejtek nagyobb mértékben mutatnak autoagglutinációt. Savas pH-n a sejtek könnyebben agglutinálódnak, tehát jobban tapadnak a humán szövettenyészetéhez. BERNET és munkatársai [1993] 13 *Bifidobacterium* törzs tapadási képességét humán vastagbélből származó Caco-2 sejtenyészetben pásztázó elektromikroszkóppal vizsgálva azt tapasztalták, hogy a baktériumok a Caco-2 sejtekhez tapadtak, anélkül, hogy azokat károsították volna. Megállapították, hogy a bifidobaktériumok tapadásához nem szükséges kalcium. Találtak azonban egy fehérjeszerű fajspecifikus faktort, amely szerepet játszott a tapadásban, ezt a baktérium sejtben és a sejtenyészet felülúszójában is kimutatták. *Bifidobacterium longum* törzsek esetében megállapítást nyert, hogy a Caco-2 sejtekhez történő tapadásuknál fontos tényező azok autoaggregálódási képessége és hidrofobicitása is [DEL-RE *et al.*, 2000].

A *B. infantis* olyan poliszacharidokat termel, melyek a bélhámsejtekhez történő tapadását segítik. A bifidobaktériumok lipoteichoinsav általi tapadása függ a koncentrációtól és a kontaktidőtől. A bélhámsejt és a baktérium közötti kölcsönhatás a lipoteichoinsav összetételétől is függ, minél több zsírsavat tartalmaz, annál jobb a tapadás [ARUNACHALAM, 1999].

2.4 Bifidobaktériumok élettani hatásai

Ahhoz hogy az ételmiszerrel bejutatott bifidobaktériumok ki tudják fejteni hatásukat a vastagbélben, túl kell hogy éljék a gyomor-vékonybél tranzitot. A gyomorban erős savas hatások (pH=2-3) érhetik kb. 90 percen át, majd a vékonybélben az epesavak maró hatásának kell ellenállniuk. BERRADA és munkatársai [1990] *in vitro* és *in vivo* körülmények között is tesztelték a túlélőképességüket, s az eredmények között csak kis eltérést tapasztaltak. Megállapították, hogy eltekintve néhány kivételtől a bifidobaktériumok túlélése az emésztőtraktusban általában jó, de törzsfüggő [POCHART *et al.*, 1992]. IBRAHIM és BEZKOROVAINY [1993b] epesó (nátrium-glikokolat) jelenlétében tanulmányozva a bifidobaktériumok túlélését megállapították, hogy az általuk vizsgált törzsek túlélnek a fiziológiai, sőt a magasabb epesókoncentrációt. CHARTERIS és munkatársai [1998b] egy *in vitro* módszert fejlesztettek ki az emberi bélcsatorna felső szakaszában uralkodó viszonyok modellezésére. A gyomornedvet pepszinnel és nátrium-kloriddal, a bélnedvet pankreatinnal és nátrium-kloriddal helyettesítve a fehérje és a mucin lehetséges védő hatásait is vizsgálták. Azt találták, hogy a gyomor tranzitra érzékeny törzsek rezisztensebbek a vékonybél tranzitra, valamint a tejfehérjék és a mucin védőhatását gyakorol a baktériumokra.

MARTEAU és munkatársai [1997] kifejlesztették az emésztőrendszer dinamikus számítógép vezérelt modellrendszerét, melyet TIM-nek (TNO'S intestinal model) neveztek el és mellyel prognosztizálható a probiotikumok túlélése. POCHART és munkatársai (1992) *in vivo* perfúziós módszerrel vizsgálták hat egészséges, *Bifidobacterium*-ot tartalmazó fermentált tejet fogyasztó felnőttél a bifidobaktériumok túlélését. Megállapították, hogy a bifidobaktériumok túlélnek a gyomor-béltraktuson való áthaladást. 8 órával a fermentált készítmény elfogyasztása után a bevitt bifidobaktériumok 23,5%-a életben maradt. HOIER [1992] savanyított tejben vizsgálta a Bb-12 törzs túlélőképességét a gyomor tranziton át. Még pH 2-nél is 100 %-os túlélést állapított meg, s két óra elteltével is csak enyhe sejtszámcsökkenést tapasztalt.

Igen nagyszámú összefoglaló cikket találhatunk a bifidobaktériumok kedvező élettani jellemzőire [ARUNACHALAM, 1999; DAVIDE, 1995; HUGES és HOOVER, 1991; O’SULLIVAN és KULLEN, 1998; OUWEHAND és SALMINEN, 1998; SAARELA *et al.*, 2002]. Az alábbiakban a legfontosabb jótékony hatásokat mutatom be.

2.4.1 Hatásuk a bélmikrobiota egyensúlyára, bélbetegségekre

A fejlődő országokban az akut fertőző gasztroenteritisz okozói a *Shigella*, az enteropatogén és enterotoxikus *E. coli*, a *Campylobacter* és rotavírus, míg a fejlett országokban a *Campylobacter* és a *Salmonella*. A széles hatásspektrumú antibiotikumok is gyakran okoznak hasmenést, valamint nem specifikus vizes hasmenés tünetet. Néhány tanulmányban, melyekben bifidobaktériumokat orálisan hasmenés elleni terápiás céllal alkalmaztak, bizonyították, hogy hatással vannak a hasmenéses tünetek csökkentésében [SCARPIGNATO és RAMPAL, 1995; MARTEAU *et al.*, 2001]. Ismert tény az is, hogy az anyatejjel táplált csecsemők esetében kevesebb a hasmenés előfordulása, mint a tápszerrel táplált csecsemőknél, mivel az előbbieket bélmikrobiotájának 90 %-át a bifidobaktériumok alkotják, míg az utóbbiaknál már igen összetett a vastagbélben rezidens baktériumközösség.

A bifidobaktériumok szerves savak termelése által stimulálják a bélmozgást, így nő az ürítési gyakoriság és a bélsár nedvességtartalma, ezáltal a székrekedésre is jótékony hatással vannak [ISHIBASHI és SHIMAMURA, 1993; YAESHIMA *et al.*, 1997].

Nagyon súlyos krónikus bélnyálkahártyagyulladás a Chron betegség, aminek okát még pontosan nem ismerik, de valószínű, hogy összefüggésben áll a bélmikrobiota egyensúlyának megváltozásával. A Chron betegségben szenvedő betegek székletében számottevően kevesebb bifidobaktériumot találtak, mint az egészséges emberekében.

2.4.2 Koleszterinszint-csökkentés

A magas szérumszintű koleszterin a szív- és érrendszeri betegségek rizikófaktor. Egyesek szerint bizonyított, hogy a savanyított tejtermékek fogyasztása csökkenti a szérumszintű koleszterin szintet, mivel feltehetően a bennük található probiotikus törzsek képesek a koleszterin asszimilálására [PEREIRA és GIBSON, 2002]. KLAVER és van der MEER [1993] szerint sem a laktobacilluszok sem a bifidobaktériumok nem képesek a koleszterint asszimilálni. Feltételezésük szerint az, hogy az *in vitro* körülmények között végzett kísérletükben a bifidobaktériumok csökkentették a koleszterinszintet azzal magyarázható, hogy az 5,0 alatti pH-n a koleszterin összeesésesedett a dekonjugált

epesavakkal. GOPAL és munkatársai [1996] *in vitro* körülmények között laktobacillusok és bifidobaktériumok epesavtűrését és koleszterin csökkentő hatását hasonlították össze. A legtöbb vizsgált törzs csökkentette a tápleves koleszterintartalmát (a laktobacillusok jobban, mint a bifidobaktériumok). Nem találtak azonban összefüggést a baktériumnövekedés, valamint a tápleves pH-ja és a koleszterincsökkenés között, de enyhe korrelációt véltek felfedezni a bifidobaktériumok epesavtűrése és koleszterincsökkentő képessége között.

2.4.3 Vitamintermelés

DEGUCHI és munkatársai [1985] öt humán forrásból izolált faj 24 törzsének vizsgálata alapján megállapították, hogy a bifidobaktériumok képesek a következő vízdoldható vitaminok szintetizálására: tiamin, folsav, nikotinsav, piridoxin, B12, riboflavin.

2.4.4 Antikarcinogén aktivitás

Általában a fermentált tejkészítmények vagy tejsavbaktériumok antikarcinogén hatásának tanulmányozását négy módon végzik: 1; a mutagén aktivitás gátlásának *in vitro* tanulmányozásával, 2; *in vivo* vizsgálatokkal: a fekálenzimek szerepének kimutatása a prokarcinogének karcinogénekké alakításában, 3; tumor szupressziót vizsgáló *in vivo* kísérletekkel labor állatokon, 4; epidemiológiai tanulmányokkal arra vonatkozólag, hogy a rák kialakulása hogyan függ össze a táplálkozási szokásokkal. A bélbaktériumok képesek befolyásolni a béltartalom kémiai összetételét. Egyes mikroorganizmusok az epesókat potenciális karcinogénné alakítják át. A rákos folyamatok elindítását visszaszoríthatjuk, ha csökkentjük a béllumen pH-ját, ezáltal a rothasztó baktériumok szaporodását gátoljuk. A bifidobaktériumok ecetsavat és tejsavat termelnek, ezáltal csökkentik a bélben a pH-t, és gátolják a káros baktériumok szaporodását. Az egyes mikroorganizmusok által termelt, a bélsárban jelenlévő enzimeknek szintén szerepe lehet a karcinogének termelésében, így a rákos folyamatok kialakulásában. A bifidobaktériumok nem rendelkeznek β -glükuronidáz, nitroreduktáz, azoreduktáz enzimekkel. MARTEAU és munkatársai [1990] humán kísérletekben, melyben napi 300 g *L. acidophilus*-t, *B. bifidum*-ot, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*-t, valamint *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*-t tartalmazó fermentált tejet fogyasztottak, a redukzív és hidrolitikus fekálenzimek aktivitásában bekövetkezett hatást vizsgálták. A fermentált tejtermékek fogyasztásának hatására az azoreduktáz és a β -glükuronidáz aktivitás nem változott, a nitroreduktáz aktivitás viszont 38 %-kal csökkent és maradt is

ezen az alacsonyabb értéken még három hétig. OGATA és munkatársai [1997] egészséges felnőtt emberekkel végzett kísérletükben egy hétig vizsgálták, hogy milyen hatással van a bél egészségi állapotára (széklet mikrobiotája, rothasztó anyagok termelődése, szerves sav koncentrációja) a *B. longum* BB536 törzs orális bevitele. A vizsgált személyek fejenként napi 200 ml tejbe kevert $2 \cdot 10^9$ élő BB536 jelű törzset fogyasztottak. A kísérlet végén néhány káros fekálenzim aktivitása, valamint a bélsár ammóniatartalma csökkent. A bifidobaktériumok nem termelnek rákkeltő alifás amino vegyületeket, kénhidrogént, nitrátokat, fenolokat, N-nitrozo, krezol, indol vegyületeket és toxinokat. Ezenkívül szerepük lehet a prokarcinogének eliminálásában is. GRILL és munkatársai [1995] hat *Bifidobacterium* törzs hatását vizsgálva nitritekre és nitrozoaminokra kimutatták, hogy eltávolítják a nitriteket. Ez nem enzimatisz úton történt, hanem valószínűleg a savtermeléssel hozható összefüggésbe. Egy törzsnél kimutatták, hogy intracelluláris anyagcseréje következtében a nitrozoaminokat lebontja. Tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok antikarcinogén hatásának vizsgálatáról WOLLOWSKI és munkatársai [2001] részletesen számot adnak. Leírják, hogy a mutációk gátlásán kívül a bifidobaktériumok megakadályozták a DNS károsodásokat a karcinogén anyagokkal kezelt patkányoknál. Habár az indirekt vizsgálatok állatokkal és *in vitro* rendszerekben megerősítik, hogy a probiotikumok csökkentik a rákos folyamatok kialakulását az epidemiológiai bizonyítékok hiányosak, sőt MOORE és MOORE [1995] leírták, hogy egyes *Bifidobacterium* fajok jelenléte a bélsárban összefüggésbe hozható a bélrák kialakulásának növelt kockázatával.

Általánosságban elmondható, hogy az élő probiotikus sejtek antikarcinogén hatása nagyobb, mint a holt sejteké és az antikarcinogenitás mind a sejtek által kifejtett, mind az általuk termelt zsírsavak hatásán keresztül valósul meg. A zsírsavak közül a butirát gátolja legjobban a mutagéneket, ezt követi az acetát, a piruvát és a laktát nem mutatott észlelhető gátlást [LANKAPUTHRA és SHAH, 1998].

2.4.5 Immunrendszer erősítése

Az immunrendszer stimulálást és az antikarcinogén hatást nehéz egymástól elkülöníteni, hiszen az immunrendszer erősítése az egyik legjobb fegyver a rákmegelőzésben. Normális körülmények között egy benépesített emésztőrendszernek nagyon erős stimuláló hatása van az immunrendszerre. Vizsgálatok azt mutatják, hogy a tejsavbaktériumok bekerülve a szervezetbe, annak specifikus védekezését erősítik a fertőzések és rákkeltő hatások ellen [YAMAZAKI *et al.*, 1985; ISOLAURI *et al.*, 2001].

A bifidobaktériumok immunválasz stimuláló hatása valószínűleg azon alapszik, hogy képesek citokinek termelésének indukálására, ez a tulajdonságuk feltehetően törzsfüggő. A bifidobaktériumok képesek nagy mennyiségű IgA termelésének indukálására is, ezt *in vitro* körülmények között Peyer-plakk sejtvonalat alkalmazó technikával bizonyították. YASUI és OHWAKI [1991] egerből származó Peyer-plakk sejteken *in vitro* körülmények között *B. breve*-vel végzett kísérletükben tesztelték az immunválaszt. Azt tapasztalták, hogy mind az antitesttermelés, mind a Peyer-plakk sejtek szaporodása nőtt a *B. breve* kezelés hatására. Szintén bizonyítást nyert, hogy a *B. longum*-mal fermentált tejet fogyasztó egerek tüdejéből vett aktivált makrofágok mennyiségében statisztikailag szignifikáns növekedést lehetett tapasztalni. A bifidobaktériumok a humán vér limfociták γ -interferon termelését is képesek stimulálni.

KADO-OKA és munkatársai [1991] bifidobaktériumok fagociták funkcióira gyakorolt hatását vizsgálva megfigyelték, hogy a bifidobaktériumok stimulálták a fagociták citotoxikus aktivitását és a mitogenikus aktivitással összefüggő IL-1 termelést. Eredményeikből arra következtettek, hogy ezek a tulajdonságok közeli kapcsolatban állhatnak a bifidobaktériumok immunerősítő hatásával.

TAKAHASHI és munkatársai [1993] az immunválaszt vizsgálták egerekben, amelyeket 8 hétig *B. longum*-ot illetve *L. acidophilus*-ot tartalmazó diétán tartottak. A *B. longum*-mal etetett egereknél a baktériumsejt citoplazmája immunválaszt indukált, de a baktériumsejtek sejtfala esetében ezt nem tapasztalták. A *L. acidophilus*-szal etetett egereknél már hat hét után a baktériumsejt citoplazmájára és a sejtfalára is antitest immunválasz volt mérhető. Mindkét mikroorganizmussal történő etetés hatására már két hét után megnövekedett a Peyer plakk sejtek szaporodásának mértéke. Eredményeik azt mutatják, hogy a nyálka stimulálása tejsavbaktériumokkal szisztémás immunválaszt indukál.

PESTKA és munkatársai [2001] bifidobaktériumot tartalmazó joghurtokkal etettek egereket és vizsgálták a limfocita populáció változását a spleen és a Peyer plakk sejtekben. Eredményeik azt mutatják, hogy a két hétig tartó probiotikus joghurtok fogyasztásának csak kis hatása van a limfocita eloszlásra a szisztematikus vagy nyálka (mucosal) immun kompartmenekben.

2.4.6 További hatások

A savas végtermékek protonálják a toxikus ammóniát (vagy aminosavat) ammónium ionokká képezve, csökkentik ezáltal a vér ammónia szintjét. Mivel

hasznosítani képesek az ammóniát, csökkentik a vastagbél ammónia szintjét. Elősegítik egy antibiotikumos kezelés során elpusztult bélflóra helyreállítását. Foszfoprotein foszfatáz enzimükkel lebontják az anyatej kazeinjeit, így a felszívódást elősegítik és támogatják az aminosavanyagcserét. Exopoliszacharidokat termelnek [ROBERTS *et al.*, 1995], melyeknek a bélhámsejthez való tapadás elősegítésén kívül további jótékony hatásai lehetnek az emberi szervezetre [RUAS-MADIEDO *et al.*, 2002].

2.5 Bifidobaktériumot tartalmazó termékek

A legelsőként előállított termékek egyike a *Bifidobacterium bifidum*-ot tartalmazó tápszer, amelyet 1948-ban Németországban Mayer fejlesztett ki, és emésztési zavarban szenvedő csecsemők kezelésére használt. A tejiparban a szigorúan anaerob bifidobaktériumok -melyek kevésbé sav- és oxigéntoleránsak mint a tejsavbaktériumok- megjelenése lassú folyamat volt. 1968-ban Schuler és munkatársai *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* és *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* fajokat tartalmazó fermentált tejterméket (BIOGARDE®) fejlesztettek ki és vezettek be a német piacra. Japánban a bifidobaktériumot tartalmazó tejtermékek 1971-ben jelentek meg kereskedelmi forgalomban [ISHIBASHI és SHIMAMURA, 1993]. Ma már a bifidobaktériumot tartalmazó termékek széles körben elterjedtek Japánban, Európában sőt Kanadában és az Egyesült Államokban is [HUGES és HOOVER, 1991]. HUGES ÉS HOOVER szerint [1991] a világon közel 80 bifidobaktériumot tartalmazó, többnyire tejterméket gyártanak. 1992-ben Orihara és munkatársai csak a japán piacon 70 terméket jegyeztek fel. Jelenleg a gyártók több mint 100 féle „bifidus-terméket” kínálnak világszerte, melyek főként a tejtermékek, illetve édességek és gyógyszerészeti alapanyagok termék kategóriákba tartoznak.

Európában a bifidobaktérium kultúrákat legtöbbször termofil vagy mezofil tejsavbaktériumokkal kombinálva alkalmazzák a tejtermékek fermentálásához. A joghurt típusú termékek starter kultúrái általában a következő törzseket tartalmazzák: *Bifidobacterium* spp., *L. acidophilus*, *S. salivarius subsp. thermophilus* (BAT típusú kultúra) vagy az előbbieken kívül tartalmaz még *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* törzset is (BATL típusú kultúra). Németországban a BAT típusú kultúrával beoltott tejet „ivójoghurnak” nevezik. Franciaországban csak a hagyományos starterkultúrával (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *S. salivarius subsp. thermophilus*) erjesztett tej nevezhető joghurtnak, a BAT és BATL kultúrákat tartalmazó termékeket „fermentált tejnek” nevezik. Egyesek szerint a bifidobaktériumok tejsavbaktériumokkal együtt kevésbé életképesek,

mások szerint viszont a *L. acidophilus* és a bifidobaktériumok között szimbiózis van. Ez utóbbit azzal magyarázzák, hogy a *L. acidophilus* anyagcseréje során olyan nitrogén vegyületek képződnek, melyek elősegítik a bifidobaktériumok szaporodását [KNEIFEL, 1996; KLAVER *et al.*, 1990]. Az Egyesült Államokban és néhány európai országban is elterjedt *Bifidobacterium*-ot tartalmazó „édes tejet” úgy készítenek, hogy a hőkezelt tejhez a *Bifidobacterium*-ot utólag adják [HUGES és HOOVER, 1991]. Létezik olyan „édes tej”, amely a *Bifidobacterium*-on kívül *L. acidophilus*-t is tartalmaz, ez főleg Japánban ismert, bár kezd elterjedni az európai piacon is [KURMANN és RASIC, 1988]. Ezek nem fermentált tejek, hanem olyan tejkészítmények, amelyekhez nagy sejtszámú baktériumkultúrát adnak, de erjesztés nem történik velük. Bifidobaktériumot tartalmazó termékekről ROBINSON [1989], SALJI [1992] valamint ARUNACHALAM [1999] is részletes összefoglalót nyújt. Megemlíti az acidophilus-bifidus joghurtot, a bifidus tejet, a bifidus joghurtot és a bifidhurtot. A tejipari termékek mellett a gyógytáplálékként előállított termékeket is felsorolja. Ezek gyógyszer formájú készítmények.

BLANCHETTE és munkatársai [1995a-b] bifidobaktériummal fermentált túrókrémet készítettek úgy, hogy a tejszínt fermentálták bifidobaktériummal és ezt keverték össze a száraz túróval és sóval. MURAD és munkatársai [1998] bifidobaktériumot tartalmazó ún. Kariesh sajt (olcsó egyiptomi lágysajt) előállítását tűzték ki célul. Az elkészített sajt érzékszervi tulajdonságai nagyon jónak bizonyultak és a tárolási idő lejártával is 3×10^8 sejt/g bifidobaktérium élősejtszámot tartalmazott a termék. DAIGLE és munkatársai [1999] Cheddar típusú bifidobaktériumot tartalmazó probiotikus sajtot gyártottak. A sajtot *B. infantis* törzsszel fermentált tejszínnel készítették. A termék fiziológiai tulajdonságában (zsír, fehérje, szárazanyagtartalom, só, hamutartalom, pH) nem találtak változást a hagyományosan készült Cheddar sajtokhoz képest, valamint a bifidobaktériumok a tárolási idő alatt (84 nap) $>10^6$ tke/g sejtszámban képesek voltak túlélni. DINAKAR és MISTRY [1994] *B. bifidum* törzsszel készítettek Cheddar sajtot. A bifidobaktériumokat κ -karragenátba zárt és liofilezett gyöngyök formájában adták a sajt készítés során az aludttejhez. Ez szintén nem befolyásolta a sajt minőségét. A bifidobaktériumok 24 hétig 10^5 - 10^6 tke/g koncentrációban életképesek maradtak.

HEKMAT és McMAHON [1992] bifidobaktériumot tartalmazó fagylaltot készítettek. A jégkrémkeveréket *B. bifidum*-mal és *L. acidophilus*-szal fermentálták majd lefagyasztották. A 17 hetes tárolás alatt a bifidobaktériumok száma a kezdeti 10^8 tke/ml-ről 10^7 tke/ml-re csökkent.

Újabb és újabb bifidobaktériumot tartalmazó termékeket fejlesztenek ki, így például gyümölcslevekben, szalámikban, desszert jellegű termékek előállításánál alkalmazzák. Manapság bifidobaktériumokkal erjesztett szójatejből is készítenek joghurt típusú termékeket, megcélózva ezzel a vegetáriánus illetve tejérzékeny fogyasztókat [MURTI *et al.*, 1992; KAMALY, 1997; SCALABRINI *et al.*, 1998; HOU és CHOU, 2000].

Általában négy *Bifidobacterium* fajt alkalmaznak a probiotikus tejtermékekben: *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* de igen sok vizsgálat szerint a legtöbb termékből a *B. animalis* mutatható ki, ami több kutató szerint azonos a *B. lactis* fajjal [REUTER *et al.*, 2002].

2.5.1 Bifidobaktériumok túlélése a tejtermékekben

A Nemzetközi Tejszövetség (International Dairy Federation (IDF)) 1992-ben 10^6 tke/g élelmiszer mennyiségben határozta meg a probiotikus tejtermékekben a minimális *Bifidobacterium* sejtszámot. Ma a fermentált tejre vonatkozó szabvány kimondja, hogy a bifidobaktériumot tartalmazó fermentált tejben a sejtszámnak 10^7 tke/g élelmiszer kell, hogy legyen és lejárata végéig meg kell tartsa a 10^6 tke/g élelmiszer koncentrációt [ISHIBASHI és SHIMAMURA, 1993].

Fontos, hogy a bifidobaktériumok a termék szavatossági időtartama alatt életképesek maradjanak. Ezt sav és oxigén érzékenységük miatt nehéz biztosítani. Számos közlemény foglalkozik bifidobaktériumok tejtermékekben történő túlélésének vizsgálatával [DECHTER és HOOVER, 1998; DINAKAR és MISTRY, 1994; GHODDUSI és ROBINSON, 1997; HEKMAT és McMAHON, 1992; HUGES és HOOVER, 1993].

2.5.1.1 Savérzékenység

Sokan bebizonyították, hogy a savas termékekben gyorsabban csökken a bifidobaktériumok száma, mint a magasabb pH-jú termékekben. HUGES és HOOVER 1993-ben végzett tanulmányai során azt az eredményt kapták, hogy hűtött nem fermentált tejben a bifidobaktériumok életképessége jobb, mint a fermentált tejben. Ezt azzal magyarázták, hogy a fermentált mintának a pH-ja alacsonyabb volt (fermentálté pH=5, nem fermentálté pH=6,3). A 4,4 alatti pH-jú termékekben a bifidobaktériumok száma naponta tizedelődik. Az erős savtermelés miatt *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-nak negatív hatása van a bifidobaktériumok életképességére. A *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hidrogénperoxidtermelése további káros hatást gyakorol a kataláz aktivitással

nem rendelkező bifidobaktériumokra. Az utólagos savtermelés szintén hatással van a túlélésre [ISHIBASHI és SHIMAMURA, 1993]. Bifidobaktériumok fagylaltban való túlélését vizsgálták HEKMAT és McMAHON [1992]. A túlélés szempontjából optimális pH 5,5 volt, 4,6 alatti pH tartományban nem éltek túl a 17 hét tárolási időt. A sajt többek között azért ígérkezik jó közegnek a bifidobaktériumok életbenmaradására, mert megfelelőek a pH körülmények.

2.5.1.2 Oxigénérzékenység

A bifidobaktériumok szigorúan anaerob szervezetek. Az „oxigénmérgezés” fontos és kritikus probléma, főleg azért, mert az oxigén könnyen bejut a tejbe és oldódik a joghurtgyártás alatt. Alacsony oxigéntartalom, alacsony redoxpotenciál szükséges ahhoz, hogy a bifidobaktériumok szaporodni tudjanak. Az oxigén nemcsak a gyártás alatt jelent problémát, hanem a csomagolóanyag oxigén áteresztő képessége is csökkentheti a túlélési esélyeket [ISHIBASHI és SHIMAMURA, 1993; JANSSON *et al.*, 2001].

Mind az oxigén, mind a savtűrő képesség faj- illetve törzsfüggő tulajdonság. Több kutató kimutatta, hogy a *B. animalis* (*B. lactis*) savtűrő és oxigéntoleráns. Azonban nem humán eredetű, ezért oxigéntoleráns humán izolátumok szelektálását, nemesítését és alkalmazását ajánlják [BIAVATI *et al.*, 2000].

DAVE és SHAH [1997] különböző probiotikus baktériumokkal készített joghurtokban vizsgálta az egyes törzsek túlélőképességét. A joghurtgyártás során a tejet különböző anyagokkal (cisztein, savópor, savófehérjekoncentrátum, savas kazeinhidrolizátumok és tripton) egészítették ki. Megállapították, hogy a cisztein, a savófehérjekoncentrátum, a savas kazeinhidrolizátumok és a tripton növelte a bifidobaktériumok túlélését, míg a savópor nem.

2.5.2 Termékfejlesztés

A termék minősége, vagyis a megfelelő sejtszám két módon biztosítható, megfelelő törzsek kiválasztásával, és/vagy speciális technológia alkalmazásával.

Törzsszelekció

Általában a hagyományos tejtermékeknél a törzsszelekció azon alapul, hogy az adott mikroorganizmus milyen jól szaporodik a tejben. A probiotikus termékeknél olyan törzset kell választani, melynek egészségvédő hatása van a fogyasztóra. Jelenleg nincs egybehangzó vélemény arra vonatkozóan, hogy milyen tulajdonságokat kell előnyben részesíteni.

Biztonsági szempontok

A modern taxonómiai vizsgálatok lehetővé teszik egy adott törzs megfelelő besorolását, ez az alapja a biztonsági előírásoknak. Ahhoz, hogy egy törzs megkapja a GRAS státuszt az szükséges, hogy elég régóta használják biztonságosan. Ha bármilyen kétség felmerül a törzs biztonsága felől, igen drága és időigényes toxikológiai vizsgálatnak kell alávetni, mielőtt probiotikumként alkalmazhatnák.

Biotechnológiai szempontok

- Szaporodjon és ezáltal savanyítsa a tejet.
- Ellenálljon a fagyasztásnak, fagyasztva szárításnak és a koncentrálni eljárásoknak, hogy koncentrált formában is adagolható legyen.
- Álljon ellen a fermentált tej savasságának, hogy így életképes maradjon a szavatossági idő alatt.
- A vele készített termék megfelelő érzékszervi tulajdonságokkal rendelkezzen. Ne okozzon ecetes ízt, a termelt ecetsav mennyisége ne legyen több mint 0,4g/l. Ezt a törzsszelekción kívül az inokulum mennyiségével és fermentációs paraméterekkel (idő, hőmérséklet) is biztosíthatjuk.

Funkcionális szempontok

- Humán eredetű legyen a törzs.
- Ellenálljon az emésztősavaknak és az epesavaknak.
- 37°C-on képes legyen szaporodni.
- Termeljen a vastagbélben sok rövid szénláncú zsírsavat (ecetsavat, tejsavat).
- Bontsa a laktózt, és képes legyen az epesavat dekonjugálni, hogy így csökkentse a koleszterinszintet,
- Tapadjon a humán sejtekhez, bár ez a kritérium egyesek szerint nem szükséges, ha a terméket rendszeresen fogyasztják [BONAPARTE, 1997].

2.5.2.1 Starterkultúrák készítésének optimalizálása, koncentrált starter kultúrák

Bifidobaktérium starterkultúrák készítéséhez megfelelő táptalaj szükséges. Számos kutatás folyik ezen a területen. A bifidobaktériumok számára szükséges táptalajösszetevők az élesztőkivonat, tejfehérjehidrolizátumok, vitaminok, aminosavak és ásványi anyagok. Ezeken kívül ciszteint, aszkorbinsavat, mint redoxpotenciál

csökkentőt, laktalbumint a nagy szaporodás elérése érdekében, pufferként β -glicerinfoszfátot adnak a táptalajhoz. A tej önmagában is jó táptalaj a bifidobaktériumok számára, de még jobbá tehető speciális tápanyagok hozzáadásával [COLLINS és HALL, 1983].

A bifidobaktériumok számát növelhetjük a termékekben koncentrált starterkultúrák alkalmazásával. Ezen starterek átlagos sejtszáma nagyobb, mint 10^{11} tke/g. Ezt úgy tudjuk elérni, hogy fagyasztva szárítjuk vagy mélyfagyasztjuk (-196°C) a tömegtenyészetet. Ultraszűréses, mikroszűréses illetve centrifugálásos technológiák is alkalmazhatók erre a célra. A koncentrált kultúrák alkalmazása számos előnnyel jár: A felszaporítási eljárás elhagyható, ezáltal a tisztaság és az aktivitás könnyebben biztosítható és ellenőrizhető, valamint az együtt nehezen növő törzsekből könnyebb a kevert kultúrát tartalmazó termék előállítás.

2.5.2.2 Immobilizálás, mikrokapszulázás

Az immobilizálás és mikrokapszulázás megvédi a bifidobaktériumokat a savas hatástól. Az immobilizálást végezhetjük gélbezárással. Gélbezárásra alkalmazható anyagok: zselatin, növényi gumik stb. [DOLEYRES *et al.*, 2002; KHALIL és MANSOUR, 1998; MACEDO *et al.*, 1999; SHEU és MARSHALL, 1993; SULTANA *et al.*, 2000; SUN és GRIFFITHS, 2000]. Mikrokapszulázásnál főleg módosított keményítőt, dextrint alkalmazhatunk. Ezeket az anyagokat porlasztva szárítással, fluidizálással vagy extrudálással juttathatják a baktériumra. A rezisztens keményítő nem bomlik le a vékonybélben, így a vastagbélig megvédi a bezárt sejteket [MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002]. A bifidobaktériumok képesek megtapadni a keményítőszemcsék felületén. Azok a törzsek melyek jól tapadnak hidrolizálni is képesek a keményítőt [CRITTENDEN *et al.*, 2001; GREENAWAY és ANDREWS, 2000a-b]. Még jobb védelmet biztosíthatunk számukra, ha amilóz filmmel vonjuk be a tapadás után a baktériumokat tartalmazó szemcséket [CRITTENDEN *et al.*, 2001].

2.5.2.3 Bifidobaktériumok genetikai fejlesztése

A *Bifidobacterium longum* [SGORBATI *et al.*, 1982, ROSSI *et al.*, 1996] és a *Bifidobacterium breve* [IWATA és MORISHITA, 1989] fajoknál kimutatták plazmidok jelenlétét. A plazmid lehetővé teszi a genetikai anyag átvitelét, és így módosíthatjuk a bifidobaktériumokat (oxigéntolerancia). A bifidobaktériumok genetikai módosítással történő nemesítésének kidolgozása a jövő a feladatai közé tartozik.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált mikroorganizmusok

33 db liofilezett autentikus *Bifidobacterium* törzset a DSMZ-től (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany), az NCTC-től (National Collection of Type Cultures, England) és az ATCC-től (American Type Culture Collection, Rockville, Md,USA) szereztem be (3. táblázat).

3. táblázat Autentikus *Bifidobacterium* törzsek

	FAJ	GYŰJTEMÉNYES SZÁM			EREDET	REFERENCIA
		DSMZ	NCTC	ATCC		
1	<i>B. ruminatum</i>	6489 ^T			Kérődző bendő	BIAVATI - MATTARELLI, 1991
2	<i>B. merycicum</i>	6492 ^T			Kérődző bendő	BIAVATI - MATTARELLI, 1991
3	<i>B. saeculare</i>	6531 ^T			Nyúl bélsár	BIAVATI <i>et al.</i> , 1991b
4	<i>B. denticolens</i>	10105 ^T			Fogszuvasodás	CROCIANI <i>et al.</i> , 1996
5	<i>B. inopinatum</i>	10107 ^T			Fogszuvasodás	CROCIANI <i>et al.</i> , 1996
6	<i>B. lactis</i>	10140 ^T			Francia joghurt	MEILE <i>et al.</i> , 1997
7	<i>B. adolescentis</i>	20083 ^T	11814	15703	Felnőtt béltraktus	REUTER, 1963
8	<i>B. infantis</i>	20088 ^T		15697	Csecsemő béltraktus	REUTER, 1963
9	<i>B. asteroides</i>	20089 ^T		25910	Méh bélzet	SCARDOVI - TROVATELLI, 1969
10	<i>B. pseudolongum globosum</i>	20092 ^T		25865	Marhabendő	YAESHIMA <i>et al.</i> , 1992b
11	<i>B. gallicum</i>	20093 ^T			Felnőtt béltraktus	LAUER, 1990
12	<i>B. subtile</i>	20096 ^T		27537	Szennyvíz	SCARDOVI - TROVATELLI, 1974
13	<i>B. angulatum</i>	20098 ^T		27535	Emberi bélsár	SCARDOVI - CROCIANI, 1974
14	<i>B. pseudolongum</i>	20099 ^T		25526	Sertés bélsár	MITSUOKA, 1969
15	<i>B. minimum</i>	20102 ^T		27538	Szennyvíz	SCARDOVI - TROVATELLI, 1974
16	<i>B. catenulatum</i>	20103 ^T		27539	Emberi bélsár	SCARDOVI - CROCIANI, 1974
17	<i>B. animalis</i>	20104 ^T		27527	Patkánybél	MITSUOKA, 1969
18	<i>B. thermophilum</i>	20210 ^T		25525	Sertés bélsár	MITSUOKA, 1969
19	<i>B. suis</i>	20211 ^T		27533	Sertés bélsár	MATTEUZZI <i>et al.</i> , 1971
20	<i>B. breve</i>	20213 ^T	11815	15700	Csecsemőbél	REUTER, 1963
21	<i>B. indicum</i>	20214 ^T		25912	Méh bélzet	SCARDOVI - TROVATELLI, 1969
22	<i>B. coryneforme</i>	20216 ^T		25911	Méh bélzet	SCARDOVI - TROVATELLI, 1969
23	<i>B. longum</i>	20219 ^T	11818	15707	Felnőtt béltraktus	REUTER, 1963
24	<i>B. magnum</i>	20222 ^T		27540	Nyúl bélsár	SCARDOVI - ZANI, 1974
25	<i>B. asteroides</i>	20431			Méh bélzet	SCARDOVI - TROVATELLI, 1969
26	<i>B. boum</i>	20432 ^T		27917	Marhabendő	SCARDOVI <i>et al.</i> , 1979b
27	<i>B. pullorum</i>	20433 ^T		27685	Nyúl bélsár	SCARDOVI - TROVATELLI <i>et al.</i> , 1974
28	<i>B. choerinum</i>	20434 ^T		27686	Sertés bélsár	SCARDOVI <i>et al.</i> , 1979b
29	<i>B. cuniculi</i>	20435 ^T		27916	Nyúl bélsár	SCARDOVI <i>et al.</i> , 1979b
30	<i>B. dentium</i>	20436 ^T		27534	Fogszuvasodás	SCARDOVI - CROCIANI, 1974
31	<i>B. pseudocatenulatum</i>	20438 ^T		27919	Csecsemő bélsár	SCARDOVI <i>et al.</i> , 1979b
32	<i>B. bifidum</i>	20456 ^T	10471	29521	Anyatejes csecsemő széklet	ORLA-JENSEN, 1924
33	<i>B. gallinarum</i>	20670 ^T		33777	Csirkebél	WATABE <i>et al.</i> , 1983

^T: típustörzs

Vizsgálataim óta változások történtek a bifidobaktériumok nomenklatúrájában. A *B. denticolens*-t és *B. inopinatum*-ot új nemzettséghez sorolták, így új elnevezésük: *Parascardovia denticolens* és *Scardovia inopinatum* [JIAN *et al.*, 2002].

10 *Bifidobacterium* törzset, melyeket BONAPARTE és munkatársai izoláltak és azonosítottak [1997], Dr. Wanding-tól (Institute für Fleischhygiene, Berlin) kaptam (4. táblázat).

4. táblázat Bonaparte izolátumok

TÖRZS NÉV	FAJ	EREDET
B11	<i>B. animalis</i>	Wiesby starterkultúra, Németország
B12	<i>B. longum</i>	Reuter 1964= DSM20219 ^T
B15	<i>B. animalis</i>	Franciország
B16	<i>B. animalis</i>	Franciország
B17	<i>B. animalis</i>	Bio-Danone, fermentált tejtermék, Franciország
B22	<i>B. animalis</i>	BA nature, fermentált tejtermék, Franciország
B23	<i>B. animalis</i>	Biogarde, starterkultúra, Németország
B39	<i>B. animalis</i>	Synbio, starterkultúra, Németország
B55	<i>B. animalis</i>	Starterkultúra, Franciország
B77	<i>B. longum</i>	Wisbyvac, starterkultúra, Németország

Ezen kívül az általam izolált törzseket regisztráltam és tartósítottam, amelyek a "4. Kísérleti eredmények és értékelésük" című részben kerülnek bemutatásra.

A *Gardnerella vaginalis* törzset szintén a DSMZ-től szereztem be. Az enteropatogén törzseket a HNCMB-től (Hungarian National Collection of Medical Bacteria) kaptam (5. táblázat).

5. táblázat Enteropatogén törzsek

BAKTÉRIUM FAJOK	HNCMB SZÁM
<i>Escherichia coli</i>	35033
<i>Escherichia coli</i>	35034
<i>Escherichia coli</i>	30213
<i>Salmonella choleraesuis</i>	10051
<i>Salmonella derby</i>	10032
<i>Klebsiella sp.</i>	52047
<i>Proteus mirabilis</i>	60007
<i>Yersinia enterocolitica</i>	98001
<i>Shigella dysenteriae</i>	20001
<i>Shigella flexnerii</i>	20015

3.2 Felhasznált tápközegek

TPY (Trypticase-Phytone-Yeast extract) leves [SCARDOVI, 1981]

Tryptone Soy Broth (OXOID CM129)	30	g
Glükóz	12,5	g
Élesztőkivonat	2,5	g
Tween 80	1	ml

Cisztein-HCl	0,5	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	g
CaCl ₂	0,15	g
FeCl ₃	0,02	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=6,8-7,0

sterilizálás 121°C-on 15 percig.

TPY(Trypticase-Phytone-Yeast extract) agar

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

pH=6,8-7,0

sterilizálás 121°C-on 15 percig.

RCM agar (Reinforced Clostridial Medium)

Élesztőkivonat	3	g
Húskivonat	10	g
Trypticase pepton (BBL)	10	g
Glükóz	5	g
Vízoldható keményítő	1	g
NaCl	5	g
Na-acetát	3	g
Cisztein-HCl	0,5	g
Agar-agar	15	g
Desztillált víz	1000	ml

Sterilizálás 121°C-on 15 percig. A sterilizálás utáni pH 6,8.

RCBA agar (Reinforced Clostridial Blood Agar)

Reinforced Clostridial Agar (Oxoid CM151)	52,5	g
Glükóz	5	g
Desztillált víz	850	ml
Sterilizálás 15 perc, 120 °C		
Steril lóvér	75	ml
0,4%-os Kína-kék oldat	75	ml

Glükóz nélküli RCM leves

Élesztőkivonat	3	g
Húskivonat	10	g
Pepton	10	g
Cisztein-HCl	0,5	g
NaCl	5	g
Na-acetát	3	g
Agar-agar	0,1	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=6,8-7,0

121 °C-on 15 percig sterilizálva

MRS (de Man Rogosa Sharpe) leves

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

pH=6,8-7,0

Sterilizés 121°C-on 15 percig.

MRS (de Man Rogosa Sharpe) agar

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

NNLP agar [TERAGUCHI *et al.*, 1978]

900 ml MRS agar (OXOID CM361) kiegészítve a következő ágensekkel:

Neomycinsulfát	0,2	g
Nalidixsav	0,03	g
Litium-klorid	6	g
Paramomycinsulfát	0,25	g

100 ml vízben oldva és sterilre szűrve

PY

Phytone pepton (BBL)	20	g
Élesztő kivonat	10	g
Agar-agar	15	g
Desztillált víz	1000	ml

pH=6,8-7,0

Sterilizés 121°C-on 15 percig.

Galaktóz agar [IWANA *et al.*, 1993]

Proteose pepton (BBL)	10	g
Trypticase pepton (BBL)	10	g
NaCl	2	g
Cisztein-HCl	0,5	g
K ₂ HPO ₄	1,5	g
MgSO ₄	0,2	g
LiCl	0,4	g
Élesztő kivonat	10	g
Agar-agar	15	g
Desztillált víz	900	ml

Sterilizés 121°C-on 15 percig. A sterilizés utáni pH 6,8.

10 g galaktózt 100 ml vízben feloldunk, s külön sterilizve adjuk a táptalajhoz.

Beeren's agar [BEERENS, 1990]

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

Sterilizés 121°C, 15 perc

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

DP agar [BONAPARTE, 1997]

Készítése megegyezik a Beeren's agarral, de 1ml 0,2%-os Dicloxacillin oldatot kell még literenként hozzáönteni.

DSMZBIF táptalaj [DSMZ katalógusból]

Kazein pepton	10	g
Húskivonat	5	g
Élesztő kivonat	5	g
Glükóz	10	g
K ₂ HPO ₄	3	g
Tween80	1	ml

Desztilláltvíz 1000 ml

pH:6,8.

Sterilezés 15perc, 121°C-on

Sterilezés után kiegészítve: Na-aszkorbáttal (1%), cisztein-HCl-lel (0,05%).

Perfringens agar

Perfringens agar base

(Oxoid CM 587) 46 g

Desztillált víz 1000 ml

Sterilezés 10 perc, 121 °C

Bacillus cereus supplement

(Oxoid SR 099 E) 4 ml

Ezt az agart két rétegben készítjük. A Petri-csészében lévő megszilárdult rétegre szélesztünk, majd erre öntjük a második réteget.

Slanetz and Bartley medium (S & B)

Slanetz and Bartley medium

(Oxoid CM 377) 42 g

Desztillált víz 1000 ml

Csak fel kell forralni.

Kristályibolya-Neutrálvörös-Epe-Glükóz agar (Violet red bile glucose agar

VRBGA)

Violet red bile agar

(Oxoid CM485) 38,5 g

Desztillált víz 1000 ml

Anaerob véres alap (AV)

Húskivonat 1,6 g

Élesztőkivonat 5 g

Trypticase pepton (BBL) 10 g

NaCl 5 g

Cisztein-HCl 0,3 g

Glükóz 2 g

Agar-agar 10 g

Desztillált víz 1000 ml

Sterilezés 121°C-on 20 percig. A sterilezés utáni pH 7,4-7,5.

Anaerob véres agar

Anaerob véres alap kiegészítve 10% defibrinált marhavérrel.

Bizmut-szulfít agar

Agar táptalaj

Húskivonat

(Lab-Lemco, OXOID) 4 g

Lúgos élesztőfelszín 10 ml

Tripszinnel emésztett kazein 8 g

4n NaOH 2,5 ml

Agar-agar 10 g

Csapvíz 1000 ml

Sterilezés 121°C-on 30 percig, sterilezés utáni pH:7,3-7,4

Alapkeverék

1. Minden komponenst külön-külön oldunk
2. Glükóz 20g, 100ml forrásban lévő desztillált vízben oldunk
3. Na₂HPO₄·2H₂O 20g, 100ml forrásban lévő desztillált vízben oldunk
4. Bizmut-ammónium citrát 16g, 120ml forró desztillált vízbe mérünk és teljes oldódásig NH₄OH-t adunk hozzá, hogy a végső pH 7,0 legyen.
5. Na₂SO₃ 10g, 120ml forró desztillált vízben oldunk
6. Fe(NH₄)₂(SO₄)·6H₂O 2,6g, 20ml hideg desztillált vízben oldunk

7. 1%-os brillantzöld-festékoldat 10ml

Az 1-es és 2-es oldatokat összeöntjük és forraljuk 0,5 percig, majd hozzáadjuk a 3-as és 4-es keverékhez és az elegyet 12 percig forraljuk. Ezután hozzáadjuk a 5-ös és 6-os oldatokat, állandó keverés mellett jól zárható üvegekbe töltjük és legalább 4 hétig állni hagyjuk.

Teljes táptalaj:

800ml felolvasztott (90-95°C) bizmut-agarhoz 160ml bizmut-alapbkeveréket adunk. Legfeljebb másnapig tárolhatjuk hűtőszekrényben.

Eozin metilénkékagar (EM)

Pepton (Kőbányai)	10	g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2	g
Agar-agar	9	g
Csapvíz	1000	ml

pH: 7,4-7,6 121°C-on 30 perc sterilizálás, majd hozzáadunk

Laktóz	10	g
Mavekal	5	ml
Eozin	0,32	g
Metilénkék	0,065	g

Összekeverjük, 121°C-on 30 percig sterilizáljuk

Wilkins-Chalgren agar (WC)

Tryptone	10	g
Zselatin pepton	10	g
Élesztőkivonat	5	g
Glükóz	1	g
Nátrium-acetát	5	g
L-arginin	1	g
Nátrium-piruvát	1	g
K-vitamin	0,0005	g
Hemin	0,005	g
Desztillált víz	1000	ml

Sterilizálás 121°C-on 15 percig.

A sterilizálás utáni pH 7,1±0,2.

Rogosa agar (Ro)

Trypticase pepton (BBL)	10	g
Élesztőkivonat	5	g
Glükóz	20	g
Tween 80	1	g
KH ₂ PO ₄	6	g
Ammónium-citrát	2	g
Na-acetát	25	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	5	g
MnSO ₄ ·2 H ₂ O	0,12	g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,034	g
Agar-agar	15	g
Desztillált víz	1000	ml

Sterilizálás 121°C-on 15 percig. A sterilizálás utáni pH 5,5.

vagy

Rogosa (Oxoid CM 627)	82	g
Desztillált víz	1000	ml
Csak fel kell forralni.		
96%-os ecetsav	1,32	ml

VL (Meat-Yeast agar)

Tryptone	10	g
Húskivonat	3	g
Élesztőkivonat	6	g
Glükóz	2	g
NaCl	5	g
Cisztein-HCl	0,3	g
Agar-agar	18	g
Desztillált víz	1000	ml

Sterilizés 121°C-on 15 percig. A sterilizés utáni pH 7,4-7,5.

Tioglikolátos leves (TG)

Élesztőkivonat	5	g
Tripszinnel emésztett kazein	15	g
NaCl	2,5	g
Glükóz	5,5	g
Na-tioglikolát	0,5	g
L-cisztein	0,25	g
4 N NaOH	1	ml
Agar-agar	0,5	g
0,1 %-os rezaurin oldat	1	ml
Desztillált víz	1000	ml

A komponenseket -rezaurin nélkül- 800 ml desztillált vízben feloldjuk, majd felforraljuk. Beállítjuk a pH-t 7,4-7,5-re, végül hozzáadjuk a rezaurint és 1000 ml-re egészítjük ki. Ha szükséges leszűrjük.

Húslé-bouillon (B)

Pepton	10	g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	2	g
Húslé	1000	ml

Sterilizés 115°C-on 20 percig. A sterilizés utáni pH 7,4.

Húslé

Megtisztított marhahús	500	g
Desztillált víz	1000	ml

Forralás 1 órán át, a húslét gézen szűrve elválasztjuk a hústól. Hozzáadunk literenként 3g NaCl-ot, felforraljuk, majd 10-15 percig állni hagyjuk, és ismételt leszívásokkal zsírtalanítjuk. 115 °C-on 30 percig sterilizzuk.

Holman-bouillon (HB₀)

Tisztított, darált marhahús	500	g
Húslé-bouillon	1000	ml

A húst a bouillonban áramló gőzben 2 óráig főzzük, majd gézen átszűrjük. A főtt húst kémcsövekbe kb. 2 cm magasságban szétosztjuk. A szűrlet pH-ját 4 N NaOH-dal 7,9-re állítjuk be. Végül a szűrletet a kémcsövekbe szétosztott hússal fejtjük úgy, hogy a húst 2-3 cm magasra fedje. A csöveket 115 °C-on 30 percig autoklávozzuk.

Antibiotikum-teszt agar (AA)

Marhahúskivonat	5	g
Savval emésztett kazein	17,5	g
Agar-agar	13	g
Desztillált víz	1000	ml

Sterilizés 115°C-on 30 percig. A sterilizés utáni pH 7,4.

APT agar (All purpose medium with Tween)

APT agar por , Merck "1.10453	59,5	g
Desztillált víz	1000	ml

Sterilizés 121°C-on 15 percig. A sterilizés utáni pH 6,7.

3.3 Anaerob tenyésztés módszerei, körülményei

A bifidobaktériumok anaerob mikroorganizmusok, így szaporodásuk egyik alapvető feltétele az anaerob környezet. Ennek biztosítására több módszert alkalmaztam:

A kémcsőben lévő folyékony tápközegeket beoltás után *vazpar* (vazelin parafin 1:1 arányú keveréke) dugóval zártam el a levegő elől, alternatívaként anaerob jarban vagy munkahelyen inkubáltam. Petri-csészében lévő szilárd táptalajokat a lemezöntés vagy szélesztés után: automata anaerosztátban (SCHOLZEN) vagy Anaerob Jar+GasPak system-ben (OXOID), illetve anaerob munkahelyen (Bugbox (Ruskin Technology)) inkubáltam. A tenyésztéseket 37°C-on végeztem.

3.4 Módszerek

3.4.1 Bifidobaktériumok izolálása

Bifidobacterium törzseket humán forrásból valamint élelmiszerekből izoláltam. Huszonhét anyatejjel táplált csecsemőtől és 35 egészséges fiatal felnőttől gyűjtöttem bélsár mintákat. A mintákat 1-2 órán belül feldolgoztam, hogy minimálisra csökkentsem az anaerob mikroorganizmusok pusztulását. A bélsár mintákból borsónyi mennyiséget bifidoszelektív agarokra (NNLP, GL, DP) szélesztettem. A 3-5 nap 37 °C anaerob körülmények között történő inkubálás után a kinőtt telepeket tovább oltottam, majd ismételt inkubálás után a tenyészeteket mikroszkóp alatt megvizsgáltam.

A törzsek sejtmorfológiai vizsgálatához Olympus B201 típusú fénymikroszkópot használtam. A felvételeket Olympus DIGITAL CAMEDIA C2020ZOOM kamerával készítettem. Az elektronmikroszkópos felvételek az egyetem Élelmiszertudományi Karának Központi Laboratóriumában készültek.

A bifidobaktériumokra jellemző sejtmorfológiájú sejteket TPY levesben tenyésztettem.

3.4.2 Azonosítás

3.4.2.1 Nemzetség szintű besorolás fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz teszttel [SCARDOVI, 1981; ORBAN, 2000].

6. táblázat A F6PPK teszt reagensei

Jelölés	Összetétel
1	0,05 M foszfát puffer (pH 6,5) + cisztein 500 mg/l
2	NaF 6 mg/ml + K v. Na jodoacetát 10 mg/ml
3	Hidroxilamin-HCl 13,9 g/100 ml, pH beállítás 6,5-re NaOH-val, minden egyes alkalommal frissen készítendő
4	Triklórecetsav (TCA) 15%-os vizes oldata
5	4M HCl
6	FeCl ₃ ·6H ₂ O 5%-os oldata 0,1 M HCl-ben
7	Fruktóz-6-foszfát (F6P)(nátrium sója 70%-os tisztaság) 80 mg/ml vízben

A kimutatás lépései:

1. A 48 órás TPY levesben kinőtt tenyészetből 10 ml-t lecentrifugálunk, kétszer mossuk az 1-es pufferrel, majd 1-es pufferrel 1ml-re visszaszuszpendáljuk a sejteket.
2. A sejteket hűtött körülmények között feltárjuk (ultrahanggal vagy ORBAN és munkatársai [2000] szerint a CTAB (Sigma) felületaktív detergenssel).
3. A feltárt mintához a 2-es és 7-es reagensekből 0,25 ml-t adunk.
4. 30 perces 37 °C-on történő inkubálás után a reakciót leállítjuk 1,5 ml 3-as reagenssel.
5. 10 perces szobahőmérsékleten való pihentetés után 1-1 ml 4-es (TCA) és 5-ös (HCl) reagenst adunk az oldathoz.
6. Szobahőmérsékleten tárolhatjuk, majd hozzáadunk 1 ml 6-os színeképző reagenst.
7. Homogenizáljuk.

Bármilyen lilás-pirosas szín, mely azonnal jelentkezik pozitív eredményként értékelhető.

3.4.2.2 Azonosítás faji szinten

3.4.2.2.1 16S rDNS analízis

A sejtlízis és a 16S rDNS amplifikálást von STETTEN és munkatársai [1998] szerint végeztem. A PCR-nél univerzális 16S rDNS primereket 5'f [5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'] és 3'r [5'-CGGCTACCTTGTACGAC-3'] (*E. coli* 1511-1493) használtam.

A PCR lépései:

- | | |
|-----|-------------------------------------|
| 1x | denaturáció, 5 min, 95°C |
| 30x | denaturáció, 20 s, 95°C |
| | primer beépülés, 40 s, 55°C |
| | láchosszabbítás, 2 min, 72°C |
| 1x | végző láchosszabbítás, 5 min, 72°C. |

1. A DNS tisztítás QIAquick PCR Purification Kittel (Qiagen) a gyártó utasítása szerint történt.
2. Ezt követte a tisztított termék kicsapatása [FACIUS *et al.*, 1999].
3. A szekvenáló PCR-T [FACIUS *et al.*, 1999] (ThermoSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit) 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech) felhasználásával végeztem. A PCR mixhez még kiegészítésül 11% (v/v) DMSO-t és 7% (v/v) formamidot adtam (ezt nagy G+C tartalmú Gram pozitív baktériumoknál ajánlják) Ennél a PCR-nél a 5'f IRD800 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3') univerzális primert (*E.coli* 8-26) használtam

Lépések:

- 1x denaturáció, 5 min 88°C
- 25x denaturáció, 30 s 88 °C
- primer beépülés, 25 s 42°C
- láncosszabbítás, 3 min 50°C
- 1x végső láncosszabbítás, 5 min 50°C.

4. A szekvenálást LI-COR szekvenátorral (MWG Biotech) végeztem.
5. Az azonosítás génbankban (BLAST) található szekvenciákkal történt. 97%-os vagy annál nagyobb homológia esetén a faji besorolás megtörténhet [STACKEBRANDT és GOEBEL, 1994].

3.4.2.2.2 Erjesztési vizsgálatok

Bifidobaktériumok faji azonosítására kifejlesztettem egy házilag elkészíthető mikrotiterlemez-es erjesztési vizsgálatot, melyről részletesen a módszerek fejlesztése részben írok.

A mikrotiterlemez-es azonosítás lépései:

1. Az RCM agaron tenyésztett 48 órás sejtekből egy kicsinyi mennyiséget 12 ml Glükóz nélküli RCM levesbe szuszpendáltam.
2. A baktériumszuszpenzióból 150µl-t a mikrotiterlemezekben lévő szénhidrátoldatokra oltottam melyek brómkrezolbíbor indikátort tartalmaztak.
3. A lemezeket 48 óráig anaerob körülmények között 37°C-on inkubáltam.
4. A színreakcióval (brómkrezolbíbor savtermelés hatására liláról sárgára vált) jelzett szaporodási képességet kétnapos és egyhetes korban ellenőriztem.
5. A fermentációs mintázat alapján szoftver segítségével faji besorolást végeztem.

„6 Összetett szénhidrát” teszt

CROCIANI és munkatársai [1994] szerint hat összetett szénhidráttal végzett fermentációs próba alapján az alábbi ábrán látható azonosítókulcs segítségével a humán

bifidobaktériumok faj szerint elkülöníthetők. Habár 12 humán *Bifidobacterium* faj ismert [SATOKARI *et al.*, 2001] Crociani adatbázisa csak kilenc fajt tartalmaz.

7. táblázat Humán eredetű bifidobaktérium fajok meghatározása

α -L-F	D-G	Ar	Ga	Gu	Am	FAJ
+	+					<i>B.infantis</i>
	–					<i>B.breve</i> (<i>B.pseudocatenulatum</i>)
–	–	+				<i>B.longum</i>
		–	+			<i>B.bifidum</i>
			–	+		<i>B.dentium</i>
				–	+	<i>B.adolescentis</i> (<i>B.pseudocatenulatum</i>)
					–	<i>B.catenulatum</i>

α -L-F: α -L-fukóz, D-G: D-glükuronát, Ar: arabinogalaktán, Ga: gasztrikus mucin, Gu: guar gumi, Am: amilopektin.

Az előbbieken ismertetett mikrotiterlemezeiről leolvassva a hat összetett szénhidrát bontási reakciójának eredményét, a fenti azonosítókulcs segítségével is elvégezhető az azonosítás. Ez az azonosító kulcs csak a humán eredetű fajok azonosítására alkalmas, tehát az élelmiszerekben leggyakrabban használt *B. lactis* fajra nem.

3.4.2.2.3 Fourier Transzformációs Infravörös Spektroszkópia

Fourier transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópia is alkalmazható megfelelő referenciakönyvtár létrehozását követően baktériumok faji besorolására.

Az azonosítás lépései Fourier transzformációs spektroszkópiával:

1. Tenyésztés 37 C-on 48 óráig RCM agaron (OXOID CM151) anaerob körülmények között.
2. Mintaelőkészítés: Kacsnyi mennyiséget 100 μ l desztillált vízbe szuszpendálunk. A sejtszuszpenzióból 35 μ l-t a ZnSe optikai lemezre (mintatartóra) viszünk, megszárítjuk, így egy áttetsző filmet nyerünk, amelyet azután közvetlenül használunk fel a FT-IR spektroszkópiás mérésnél.
3. Mérés IFS-28B típusú FT-IR spektrofotométerrel (Bruker) KÜMMERLE és munkatársai [1998] valamint OBERREUTER és munkatársai [2001] szerint. Minden törzs spektrumát három ismétlésben veszünk fel és ebből spektrumátlagot képezünk.
4. Az adatok feldolgozásához OPUS szoftver 3-as verzióját használtam.

Az azonosítás jóságának meghatározása: Egy adott törzs spektrumátlagát kivesszük a teljes spektrum-referencia könyvtárból, majd ezt a spektrumot újra teszteljük a maradék adatbázissal szemben. Ha az első találat egy ugyanabba a fajba tartozó törzs és a spektrumok közti távolság (spectral distance value (SD)) 1.0 alatt van, az eredményt faji szintű korrekt azonosításként vesszük. Félreidentifikálást akkor jegyzünk fel, ha a törzset úgy azonosítja a program, hogy fenti kondíciók nem teljesülnek. Az egy fajhoz tartozó összes tesztelt törzs azonosítási eredményeit átlagolva megkapjuk a fajra vonatkozó azonosítás jóságát.

Az FT-IR spektroszkópiás módszert fejlesztettem ki bifidobaktériumok faji azonosítására. Ennek részletes ismertetése a "Kísérleti eredmények és értékelésük" című fejezetben található.

3.4.3 Prebiotikus oligoszacharidok hasznosításának vizsgálata

A különböző oligoszacharidok hasznosítási vizsgálatánál a erjesztési teszteknel alkalmazott mikrotiterlemezés módszert alkalmaztam és a következőkben felsorolt oligoszacharidokat teszteltem:

Frukto-oligoszacharid: Raftiline por, Ratilose por (ORAFTI, Belgium).

Laktoszukróz: LS-40L és LS-55L szirupok, LS-55 por (Ensuiko Sugar Refining Co., Japan).

Izomalto-oligoszacharid: OLIGOTIME, OLIGOMT-500, Isomalto-500 szirupok (Showa Sangyo Co., Japan).

Xylo-oligoszacharid: Xylo-oligo 70 szirup, Xylo-oligo-95 por (SUNTORY, Japan).

3.4.4 Bifidobaktérium és enteropatogén törzsek kölcsönhatása

0,1 ml patogén-baktérium szuszpenziót Petri-csészébe pipettáztam majd 20 ml felolvasztott Anaerob alap agarral elszuszpendálva lemezeket készítettem. A megszilárdulás után az agarok felületére 1 csepp *Bifidobacterium* szuszpenziót cseppentettem. Anaerob körülmények között 48 óráig tartó inkubációt követően a feltisztulási zóna mutatta a bifidobaktériumok antagonista hatását.

3.4.5 Tapadás humán szövettenyészetekhez

HeLa, HT29 és Hep2 humán sejtvonalak 24 órás monolayer szövettenyészetét a következőkben leírtak szerint kezeltem:

1. A szövettenyészetekről eltávolítottam a tápközeget és 500 µl 10^3 sejt/ml koncentrációjú *Bifidobacterium* szuszpenziót, majd 1 ml tápközeget pipettáztam rá.

2. 37 °C-on 3 óráig inkubáltam.
3. Ismét eltávolítottam a szövettenyészetéről a folyadékot és 50 mM-os foszfát pufferrel (pH=7) mostam. Ezután 1 ml tápközeget adtam hozzá.
4. 37 °C-on 2 óráig inkubáltam
5. Ismét eltávolítottam a szövettenyészetéről a folyadékot és 50 mM foszfát pufferrel (pH=7) mostam.
6. Ezt alkoholos rögzítés majd 1%-os metilénkékkel történő festés követte.

A tapadást fénymikroszkóp alatt értékeltem ki. A szöveti adherencia képességének mértékét a szövettenyészetekhez tapadt *Bifidobacterium* sejtek száma alapján állapítottam meg.

Bifidobaktériumok tapadási vizsgálatát elvégeztem a Caco-2P sejtvonal 72 órás kezeletlen és butiráttal kezelt (5 mmol/l 48 óra) tenyészetén is.

Lépések:

1. A tápfolyadék leöntése után a sejteket Ca/Mg tartalmú PBS pufferrel (phosphate-buffered saline: pH 7,4, NaCl 0,8%, Na₂HPO₄ 0,115%, KCl 0,02%, KH₂PO₄ 0,02%, CaCl₂ x 2H₂O 0,0133%, MgCl₂ x 6H₂O 0,01%) mostam.
2. A sejteket tízszeresükre hígítottam a Ca/Mg tartalmú PBS pufferrel úgy hogy kb. 10⁷ baktérium/ml koncentrációjú sejtszuszpenziót kaptam. Ebből 1ml-t pipettáztam a Caco2P sejtekre majd 1 órán át inkubáltam.
3. A baktériumszuszpenzió leöntése után háromszor 10-10 percig mostam a Caco-2P sejteket Ca/Mg tartalmú PBS pufferrel.
4. 10 percig rögzítettem Ca/Mg tartalmú PBS-sel pufferolt 10%-os formaldehid oldattal
5. 30 percig festettem 10 % Giemsa-oldattal, vagy Gram festéssel majd desztillált vízzel öblítettem.
6. A sejtenyészet szárítása után fénymikroszkópos vizsgálatot végeztem, és elektronmikroszkópos felvételeket készítettem.

3.4.6 Állattetési kísérletek

Külön-külön ketrechen nevelt hím egereket csoportokba osztottam és a kísérleti tervben megadott diétán tartottam. A diéta hatására mikrobiota összetételében bekövetkező változásokat vizsgáltam. Minden második napon minden egértől friss bélsarat gyűjtöttem, amelyet hígítófolyadékba (0,85 %-os NaCl oldat) szuszpendáltam. Az így kapott szuszpenziót Anaerob véres agarra, EM agarra és RCM agarra szélesztettem. A lemezeket 48 órás anaerob inkubálás után értékeltem ki.

Kiértékelés: Az anaerob véres agaron kinőtt telepek számából következtettem a bélmikrobiotát alkotó összes sejtszámra (tke/g) (enterobakteriumok, tejsavbaktériumok és más baktériumok pl. bakteriodeszek). Az EM agaron kinőtt telepek az *Enterobacteriaceae* család tagjait mutatták (pl. *E. coli*). Az RCM agaron kinőtt telepek számából következtettem az anaerob tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok jelenlétére. Ezen telepeket mikroszkóp alatt is megvizsgáltam és a Gram pozitív, nemspórázó, bunkós végű pálcákat tekintettem Bifidobaktériumnak.

3.4.7 Életképesség és biológiai hatás vizsgálata az emésztőtraktust szimuláló kísérletekben

Az emésztőtraktus működésének szimulálására kétféle módszert fejlesztettem ki. Az első csak a gyomorban uralkodó körülményeket, a második a száj-gyomor-vékonybél szakaszt szimulálja. Erről részletesen a „Kísérleti eredmények és értékelésük” című részben számolok be. A bifidobaktériumok túlélésének vizsgálatát egy laboratóriumi modell rendszerben (TIM1) is elvégeztem.

3.4.7.1 Túlélés a gyomor-vékonybél (TIM1) modellben

A TIM1 a hollandiai TNO által kifejlesztett gyomor és vékonybélszakaszt szimuláló laboratóriumi modell rendszer. A legfontosabb változtatható környezeti paraméterek a következők: hőmérséklet, perisztaltikus mozgás általi transzport, pH, vízfelszívódás (abszorpció), gyomor és emésztőnedvek szekréciója.

A modellnek négy fő része van: 1; a gyomrot, 2; duodenumot, 3; jejunumot, 4; ileumot szimuláló szakaszok (**4.ábra**). Ezek mindegyike két egymással összeköttetésben lévő egységből épül fel, melyek egy külső üvegházból és egy belső perisztaltikát végző rugalmas falu szilikonhüvelyből állnak. Az üveg és a flexibilis fal közé pumpált vízzel lehet a rendszert 37 °C-ra, vagyis **testhőmérsékletűre** termosztálni, valamint ezzel biztosítjuk a **perisztaltikus mozgást** is, úgy hogy a víz nyomását a számítógép által vezérelt forgódugattyús szivattyúval periodikusan változtatjuk. A rugalmas fal alternáló kompressziója-relaxációja biztosítja a bélpép keveredését. Az egyes bélszakaszok perisztaltikus szelepekkel vannak összekötve, melyek három csőből állnak, mindegyik belsejében rugalmas falu cső van. Minden perisztaltikus ciklus alatt konstans térfogatú bélpép továbbítódik. A perisztaltikus ciklusok gyakoriságát vezérlő számítógép irányítja, így a bélpép áramlása szabályozott.

A **szekeáció** búvárszivattyúkkal és lépésszabályzóval biztosított. (Gyomor szakasz: 0,5 ml/perc, duodenum: 1 ml/perc).

Az egyes szakaszokba a következő ágensek adagolása történik:

Gyomorba: HCl, gyomornedv lipázzal, gyomornedv pepszinnel.

Duodénumba: NaHCO₃, epeoldat, pankréászoldat, vékonybélmedv

Jejunumba: NaHCO₃

Ileumba: NaHCO₃

Ezek összetétele a következő:

Gyomornedv összetétele:

3,1 g/l	NaCl
1,1 g/l	KCl
0,15 g/l	CaCl ₂ ·2H ₂ O
0,6 g/l	NaHCO ₃

Gyomornedv lipázzal:

150 g gyomornedvben 37,5 mg lipáz (aktivitás: 150.000U/g, Rhizopus lipase F-AP 15 Amano Pharmaceuticals)

Gyomornedv pepszinnel:

150 g gyomornedvben melynek a pH-ját előzetesen 4-re állítottuk 1 mol/l HCl-val 42 mg pepszin (90.000 units, Sigma art. P-7012).

Pankréász oldat (pH=7,8)

10,5 g pankréászhoz (PANCREX-V powder Paines&Byrne, Greenford, England) adjunk 150 g vizet majd keverjük 10 percig mágneses keverővel. Ezután 20 percig 9000 rpm-en 4°C-on centrifugáljuk (Beckman centrifuga JA-10-es rotor). A felülúszót használjuk a továbbiakban.

Epe oldat 4% (pH=6,2)

10 g epe port (Bile porcine extract, Sigma B-8631) oldjunk fel 250g vízben. Keverjük mágneses keverővel, amíg fel nem oldódik (kb. 15 perc)

Vékonybélmedv:

5,0 g/l	NaCl
0,6 g/l	KCl
0,3 g/l	CaCl ₂ ·2H ₂ O

A vizsgálat főbb lépései:

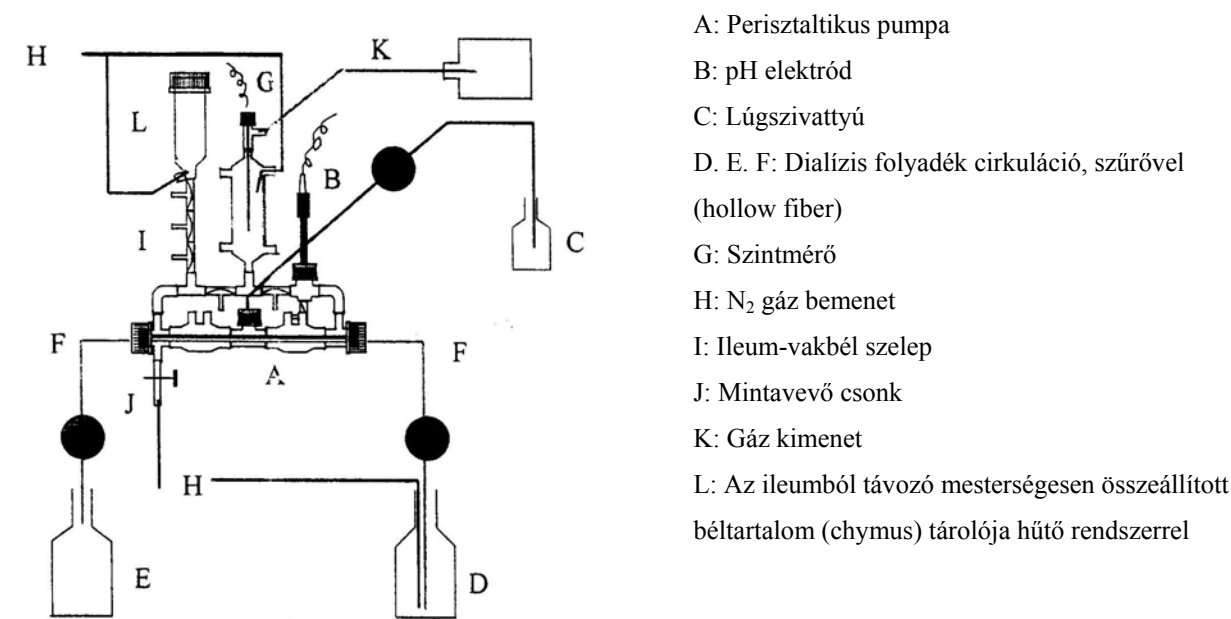
1. A szükséges oldatok elkészítése, modell összeszerelése és elindítása. 1 óra szükséges az állandósult állapot eléréséhez, amikor a megfelelő környezeti paraméterek kialakulnak.

2. „*Etetés*”: 100 ml joghurthoz 200 ml mesterségesen előállított nyálat (6,2 g/l NaCl, 2,2 g/l KCl, 0,22 g/l CaCl₂, 1,2 g/l NaHCO₃) és 5 ml kb. 10¹² sejt/ml koncentrációjú bifidobaktérium kultúrát adtam. Ezt a keveréket a gyomorba öntöttem.
3. „*Emésztés*”: 360 percig, mintavétel a 0., 60., 120., 180., 240., 300., 360. percekben
4. *A minták feldolgozása*: A mintákból a mintavétel után közvetlenül tizedelő hígítási sort készítettem és a hígítási tagokból 0,1 ml-t Beeren's agarra szélesztettem. (A lemezeket anaerob körülmények között, 37 °C-on 3-5 napig inkubáltam.)
5. *A minták kiértékelése*: Az inkubációs idő letelte után a kinőtt telepeket megszámloltam, valamint mikroszkóp alatt szűrőpróbaszerűen morfológiájukat ellenőriztem.

3.4.7.2 Vastagbél-szimulációs kísérlet a TIM2 laboratóriumi modellben

A TIM2 szintén a TNO által kifejlesztett számítógép által vezérelt laboratóriumi modell, amely a vastagbél (csak a vakbél és felszálló ág, hiszen a mikrobiológiai folyamatok zöme itt játszódik) fiziológiai működését szimulálja. A rendszer folyamatosan nyomon követi és szabályozza a különböző paramétereket, úgy mint: hőmérséklet, pH, a víz és kismolekulájú oldott anyagok felszívódása, valamint anaerob mikrobiotát (8. táblázat) tartalmaz.

A TIM2 két egymással azonos felépítésű egységből áll, így egyszerre 2 párhuzamos kísérletet végezhetünk. Az 5. ábra egy ilyen egységet mutat be.



5. ábra TIM2 felépítése [MINEKUS *et al.*, 1999; VENEMA *et al.*, 2000].

TIM2 berendezés működése

A **testhőmérséklet** beállítása és a **perisztaltikus mozgás** működési elve megegyezik a TIM1 modellnél leírtakkal. A **pH szabályozás** is hasonló, bár ez a modell csak lúgot képes adagolni, a vastagbélben zajló fermentáció során keletkezett savak közömbösítésére. A **vízfelszívódás (dialízis)** is hasonlóképpen megoldott, mint a TIM1-nél, bár itt a szemipermeábilis membránok a rendszeren belül futnak és a dialízisfolyadék összetétele is eltérő. Az **anaerob környezetet** folyamatosan áramló N₂ gáz biztosítja.

A **mesterséges mikrobiota** összetétele megegyezik egy egészséges felnőtt bélflórájának összetételével. A bélflóra inokulumot a TNO intézetben állítják elő fed-batch fermentációval, majd pillanatszerűen folyékony nitrogénben lefagyasztják és – 80 °C-on tárolják. A fermentációt úgy végzik, hogy székletmintákat gyűjtenek 10 egészséges felnőtt embertől (19-35 éves), akik nem dohányoznak, nem fogyasztottak a mintavétel előtt legalább két héttel pro- vagy prebiotikumot és nem szedtek antibiotikumot mintavétel előtt legalább három hónapig. 5 literes fermentorban 20-20g bélsár keveréket használnak inokulumként és anaerob körülmények között fed-batch fermentációval felszaporítják. Tápközegként mesterségesen előállított bélpépet használnak.

8. táblázat A TIM2 mikrobiotájának átlagos összetétele

Nemzetség	tke/ml
<i>Bifidobacterium</i>	10 ⁹ -10 ¹⁰
<i>Bacteroides</i>	10 ⁹ -10 ¹⁰
<i>Lactobacillus</i>	10 ⁵ -10 ⁷
<i>Enterobacteriaceae</i>	10 ⁵ -10 ⁶
<i>Enterococcus</i>	10 ⁵ -10 ⁶
<i>Clostridium</i>	10 ⁴ -10 ⁵

A modellben az ileumból távozó mesterségesen összeállított béltartalom (*chymus*) tárolója tartalmazza a baktériumok szaporodásához szükséges tápanyagokat (fehérje, szénhidrát, vitaminok, ásványi anyagok), a *chymus* szabályozott időközönként szállítódik az ileum-vakbél szelepen keresztül a vastagbél egységbe.

A TIM2 vizsgálat főbb lépései

1. A szükséges oldatok elkészítése, modell összeszerelése és elindítása, az anaerob környezet kialakulásáig járatás 2 óráig

2. Beoltás a bélflóra inokulummal (20ml) inkubálás 1 napig.
3. Mintavétel a lumenből és a dialízisfolyadékból 4 napon keresztül 24 óránként.
4. A minták feldolgozása: A mintákat a mintavételt követően –80°C-on tároltam (a tke meghatározásra félretett mintákhoz 20% glicerint adtam).
5. A mintákból a következő analíziseket végeztem el:

A) Összes sejtkoncentráció és a jellemző nemzetségek, fajok kimutatása

A mintákból anaerob munkahelyen hígítási sort készítettem majd az egyes tagokból a következő táptalajra szélesztettem: RCBA, S & B, Rogosa, Perfringens, VRBGA, Beeren's.

A **9. táblázat**ban bemutatom, hogy mely hígítási tagokból szélesztettem az egyes táptalajokra, valamint a tenyésztési körülményeket és az értékelés módját.

9. táblázat A mikrobióta összetételének értékelése

Táptalaj	Hígítási tagok	Tenyésztés	Kiértékelés
RCBA	-6,-7,-8	Anaerob inkubátor, 37 °C, 3 nap	A kinőtt telepek közül kékeket bacteroidesnek a barnákat bifidobaktériumnak számoljuk.
S & B	-5,-6	37 °C, 2 nap	Enterokokkuszok kimutatására alkalmas. Piros telepeket számoljuk.
Rogosa	-3,-4	37 °C, 2 nap, 1nap	Laktobacillusok kimutatására alkalmas
Perfringens	-4,-5	Anaerob inkubátor, 37 °C, 1nap	A fekete telepeket szulfátredukáló klosztridiumként számoljuk
VRBG	-4,-5	37 °C, 2 nap, 1nap	Minden Enteribacteriaceae pirosas-lila telepet képez
Beeren's	-6,-7	Anaerob inkubátor, 37 °C, 3 nap	A kinőtt telepeket bifidobaktériumnak számoljuk

B) Rövid-szénláncú zsírsavak (SCFA) gázkromatográfiás vizsgálata

A dialízis minták és a centrifugált (15000 rpm, 5 perc) lumen minták felülúszójának 50 µl-éből történt a meghatározás JOURNAL [1982] szerint Chromopack CP9001 típusú gázkromatográf, Stabilax-DA GC oszlopon (hosszúság: 15 m, átmérő:0,53 mm, filmvastagság: 0,1 µm).

C) L- és D-laktát enzimes mennyiségi meghatározása

A megfelelően hígított dialízis mintákból 300 µl-t az analizátor speciális mintatartó csöveibe pipettáztam. A lumen mintákat lecentrifugáltam és a felülúszók tízszeres hígítását alkalmaztam. A mérést Cobas Mira Automata analizátorral a gyártó (Roche Diagnostic Systems) utasításai szerint végeztem.

D) Ammóniakoncentráció meghatározása

Az ammóniumtartalmat a dialízis folyadékból közvetlenül, a lumen mintákból centrifugálás utáni felülúszó tízszeres hígításában mértem a gyártó utasítása szerint ORION 95-12 ionszelektív elektróddal.

4 KÍSÉRLETI ERDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1 Módszertani kutatások eredményei

4.1.1 Faji azonosítás erjesztési vizsgálatok alapján

Bifidobaktériumok fenotípusos faj szerinti azonosításához egy házilag készített mikrotiterlemezes módszert fejlesztettem ki, amelyet az API 50CH teszt (bioMérieux) valamint CROCIANI és munkatársai [1994] „6 összetett szénhidrátbontási teszt bifidobaktériumok azonosítására” munkája alapján állítottam össze.

Mikrotiter lemezekbe 53 féle 25 μ l brómkrezolbíbor indikátort (30 mg/l) tartalmazó szénhidrátoldatot pipettáztam. A könnyen fermentálható szénhidrátok koncentrációja 0,8 %, az összetett szénhidrátoké 0,5 %-os volt. Az 54. reakció arginin bontásán alapul.

Szénhidrátok: glükóz, galaktóz, szorbóz, D-glükózamin, D-ribóz, D-xilóz, L-arabinóz, D-arabinóz, L-ramnóz, szacharóz, maltóz, trehalóz, α -metil-D-glukozid, cellobióz, szalicin, arbutin, melibióz, laktóz, raffinóz, adonit, melecitóz, glicerín, eritrit, ribit, xilit, L-arabit, szorbit, D-mannit, dulcit, mezo-inozit, D-lixóz, D-turanóz, N-acetil-D-glükózamin, D-arabit, glükonát, 2-keto-glükonát, amigdalín, metil-xilozid, metil-mannozid, fruktóz, mannóz, gencióbióz, inulin, keményítő, glikogén, dextrin, eszkuin, α -L-fukóz, D-glükuronát, arabinogalaktán, gasztrikus mucin, guar gumi, amilopektin. Az utolsó hat a Crociani szerinti összetett szénhidrát.

Eljárás: A baktériumszuszpenzióból 150 μ l-t a mikrocövekben lévő szénhidrátokra pipettáztam. Az inkubálás után a pozitív illetve negatív reakciókat feljegyeztem, és a az általam írt „BIFMTP” szoftverrel értékeltem ki, melyet irodalmi adatok alapján és a típustörzsek valamint izolátumok [BONAPARTE, 1997] erjesztési adatai alapján szerkesztettem. A program adatbázisát, az 54 reakciót és a 65 referencia törzset a **10. táblázat** tartalmazza.

4.1.2 Faji azonosítás Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiával

A módszerfejlesztésnél először a bifidobaktériumok spektrumkönyvtárát kellett létrehoznom, mivel ez nem állt rendelkezésemre. A FML Mikrobiológiai Intézete sikeresen használja ezt a meghatározási módszert élesztők laktobacillusok és corynebaktériumok azonosítására. A munka első lépéseként, olyan tápközeget kerestem,

amelyen megfelelően szaporodik minden *Bifidobacterium* faj, így elegendő biomasszát kaphatunk az analízisek elvégzéséhez.

10. táblázat A BIFMTP szoftverjének adatbázisa (54 reakció és 65 referenciatorzs)

Reakciók	Referencia törzsek
1 0001 Säure aus Glucose	0001 B. lactis (Lit.,Rest v. MTP)
2 0002 NH3 aus Arginin	0002 B. infantis (Lit.,Rest v. MTP)
3 0003 Säure aus Galactose	0003 B. gallicum (Lit.,Rest v. MTP)
4 0004 Säure aus Sorbose	0004 B. catenulatum (Lit.,Rest v. MTP)
5 0005 Säure aus D-Glucosamin	0005 B. animalis (Lit.,Rest v. MTP)
6 0006 Säure aus D-Ribose	0006 B. breve (Lit.,Rest v. MTP)
7 0007 Säure aus D-Xylose	0007 B. longum (Lit.,Rest v. MTP)
8 0008 Säure aus L-Arabinose	0008 B. pseudocatenulatum (Lit.,Rest v. MTP)
9 0009 Säure aus D-Arabinose	0009 B. bifidum (Lit.,Rest v. MTP)
10 0010 Säure aus L-Rhamnose	0010 B. adolescentis (Lit.,Rest v. MTP)
11 0011 Säure aus Saccharose	0011 B. angulatum (Lit.,Rest v. MTP)
12 0012 Säure aus Maltose	0012 B. dentium (Lit.,Rest v. MTP)
13 0013 Säure aus Trehalose	0013 B. cuniculi (Lit.,Rest v. MTP)
14 0014 Säure aus a-Methyl-D-glucosid	0014 B. choerinum (Lit.,Rest v. MTP)
15 0015 Säure aus Cellobiose	0015 B. boum (Lit.,Rest v. MTP)
16 0016 Säure aus Salicin	0016 B. asteriodes (Lit.,Rest v. MTP)
17 0017 Säure aus Arbutin	0017 B. suis (Lit.,Rest v. MTP)
18 0018 Säure aus Melibiose	0018 B. thermophilum (Lit.,Rest v. MTP)
19 0019 Säure aus Lactose	0019 B. pseudolongum ssp. pseudolongum (Lit.,Rest v. MTP)
20 0020 Säure aus Raffinose	0020 B. subtile (Lit.,Rest v. MTP)
21 0021 Säure aus Melezitose	0021 B. pseudolongum ssp. globosum (Lit.,Rest v. MTP)
22 0022 Säure aus Glycerin	0022 B. asteriodes (Lit.,Rest v. MTP)
23 0023 Säure aus Erythrit	0023 B. saeculare (Lit.,Rest v. MTP)
24 0024 Säure aus Ribit	0024 B. merycicum (Lit.,Rest v. MTP)
25 0025 Säure aus Xylit	0025 B. ruminatum (Lit.,Rest v. MTP)
26 0026 Säure aus L-Arabit	0026 B. asteriodes (W3388/DSM20089)
27 0027 Säure aus Sorbit	0027 B. subtile (W3391/DSM20096)
28 0028 Säure aus D-Mannit	0028 B. gallicum (W3390/DSM20093)
29 0029 Säure aus Dulcit	0029 B. saeculare (W3383/DSM6531)
30 0030 Säure aus m-Inosit	0030 B. catenulatum (W3394/DSM20103)
31 0031 Säure aus D-Lyxose	0031 B. suis (W3397/DSM20211)
32 0032 Säure aus D-Turanose	0032 B. thermophilum (W3396/DSM20210)
33 0033 Säure aus N-Acetyl-D-glucosamin	0033 B. boum (W3404/DSM20432)
34 0034 Säure aus D-Arabit	0034 B. angulatum (W3412/DSM20098)
35 0035 Säure aus Gluconat	0035 B. merycicum (W3382/DSM6492)
36 0036 Säure aus 2-Keto-Gluconat	0036 B. asteriodes (W3403/DSM20431)
37 0037 Säure aus Amygdalin	0037 B. dentium (W3413/DSM20436)
38 0038 Säure aus Methylxylosid	0038 B. cuniculi (W3407/DSM20435)
39 0039 Säure aus Methylmannosid	0039 B. choerinum (W3406/DSM20434)
40 0040 Säure aus Fructose	0040 B. infantis (W3387/DSM20088)
41 0041 Säure aus Mannose	0041 B. ruminatum (W3381/DSM6489)
42 0042 Säure aus Gentibiose	0042 B. longum (W3401/DSM20219)
43 0043 Säure aus Inulin	0043 B. breve (W3398/DSM20213)
44 0044 Säure aus Stärke	0044 B. pseudolongum ssp. globosum (W3389/DSM20092)
45 0045 Säure aus Glycogen	0045 B. pseudolongum ssp. pseudolongum (W3392/DSM20099)
46 0046 Säure aus Dextrin	0046 B. lactis (W3386/DSM10140)
47 0047 Säure aus Esculin	0047 B. animalis (W3395/DSM20104)
48 0048 Nullkontrolle	0048 B. pseudocatenulatum (W3408/DSM20438)
49 0049 Säure aus Porcine gastric mucin	0049 B. adolescentis (W3411/DSM20083)
50 0050 Säure aus Guar Gum	0050 B. denticolens (W3384/DSM10105)
51 0051 Säure aus Amilopectin	0051 B. inopinatum (W3385/DSM10107)
52 0052 Säure aus D-Glucuronate	0052 B. minimum (W3393/DSM20102)
53 0053 Säure aus L-Fucose	0053 B. pullorum (W3405/DSM20433)
54 0054 Säure aus Arabinogalactan	0054 B. bifidum (W3409/DSM20456)
	0055 B. animalis (BONA1)
	0056 B. animalis (BONA2)
	0057 B. animalis (BONA3)
	0058 B. animalis (BONA4)
	0059 B. animalis (BONA5)
	0060 B. animalis (BONA6)
	0061 B. animalis (BONA7)
	0062 B. longum (BONA8)
	0063 B. longum (BONA9)
	0064 B. longum (BONA10)
	0065 B. animalis (BONA11)

Ezután az összes típustörzs és a 16S rDNS analízissel és fermentációs tesztekkel azonosított saját izolátumok, valamint Dr. Wandigtól kapott izolátumok [BONAPARTE, 1997] spektrumát felvéve létrehoztam a *Bifidobacterium* referencia könyvtárat. Ezt követte a saját még nem azonosított izolátumok spektrumának felvétele és a faji azonosítás.

4.1.2.1 Típustörzsek szaporodása különböző táptalajokon

A FT-IR-es méréshez megfelelő mennyiségű baktériumtömeg előállításának biztosítására, különböző tápagarokon és körülmények között hasonlítottam össze a *Bifidobacterium* fajok szaporodását (11. táblázat).

11. táblázat: Típustörzsek szaporodása különböző táptalajokon

DSMZ szám	Fajnév	MRS 37°C	APT 30°C	NNLP 37°C	DP 37°C	DSMBIF 37°C	RCM 37°C
6489	<i>B. ruminatum</i>	+++	+++	+++	+	+++	+++
6492	<i>B. merycicum</i>	+++	+	+++	+	+++	+++
6531	<i>B. saeculare</i>	+	-	+	+++	++	+++
10105	<i>B. denticolens</i>	-	-	-	-	++	+++
10107	<i>B. inopinatum</i>	++	+++	+	+	+++	+++
10140	<i>B. lactis</i>	+++	++	+++	+++	+++	+++
20083	<i>B. adolescentis</i>	+++	+++	+++	+	+++	+++
20088	<i>B. infantis</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++
20089	<i>B. asteroides</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++
20092	<i>B. pseudolongum globosum</i>	++	++	+	+++	++	++
20093	<i>B. gallicum</i>	++	++	++	+++	+++	+++
20096	<i>B. subtile</i>	+++	+++	+++	+	+++	+++
20098	<i>B. angulatum</i>	++	-	++	+	+++	+++
20099	<i>B. pseudolongum</i>	++	+	++	+++	+++	+++
20102	<i>B. minimum</i>	+++	+++	+++	n.a.	+++	+++
20103	<i>B. catenulatum</i>	++	-	++	+	+++	+++
20104	<i>B. animalis</i>	+++	+	+++	+++	+++	+++
20210	<i>B. thermophilum</i>	+++	+	+++	-	+++	+++
20211	<i>B. suis</i>	+++	+++	+++	n.a.	+++	+++
20213	<i>B. breve</i>	++	-	++	++	+++	+++
20214	<i>B. indicum</i>	+++	++	+++	n.a.	+++	+++
20216	<i>B. coryneforme</i>	+	+	+	n.a.	+++	+++
20219	<i>B. longum</i>	+++	-	+++	+++	+++	+++
20222	<i>B. magnum</i>	+++	++	-	n.a.	+++	+++
20431	<i>B. asteroides</i>	+++	++	+++	-	+++	+++
20432	<i>B. boum</i>	+++	+	+++	+++	+++	+++
20433	<i>B. pullorum</i>	-	-	-	+	+++	+++
20434	<i>B. choerinum</i>	-	++	-	+++	+++	+++
20435	<i>B. cuniculi</i>	+++	-	+++	+++	+++	+++
20436	<i>B. dentium</i>	-	+	+	+++	+++	+++
20438	<i>B. pseudocatenulatum</i>	+++	+	+++	-	+++	+++
20456	<i>B. bifidum</i>	+++	+++	+	+	+++	+++
20670	<i>B. gallinarum</i>	+++	+++	+++	n.a.	+++	+++

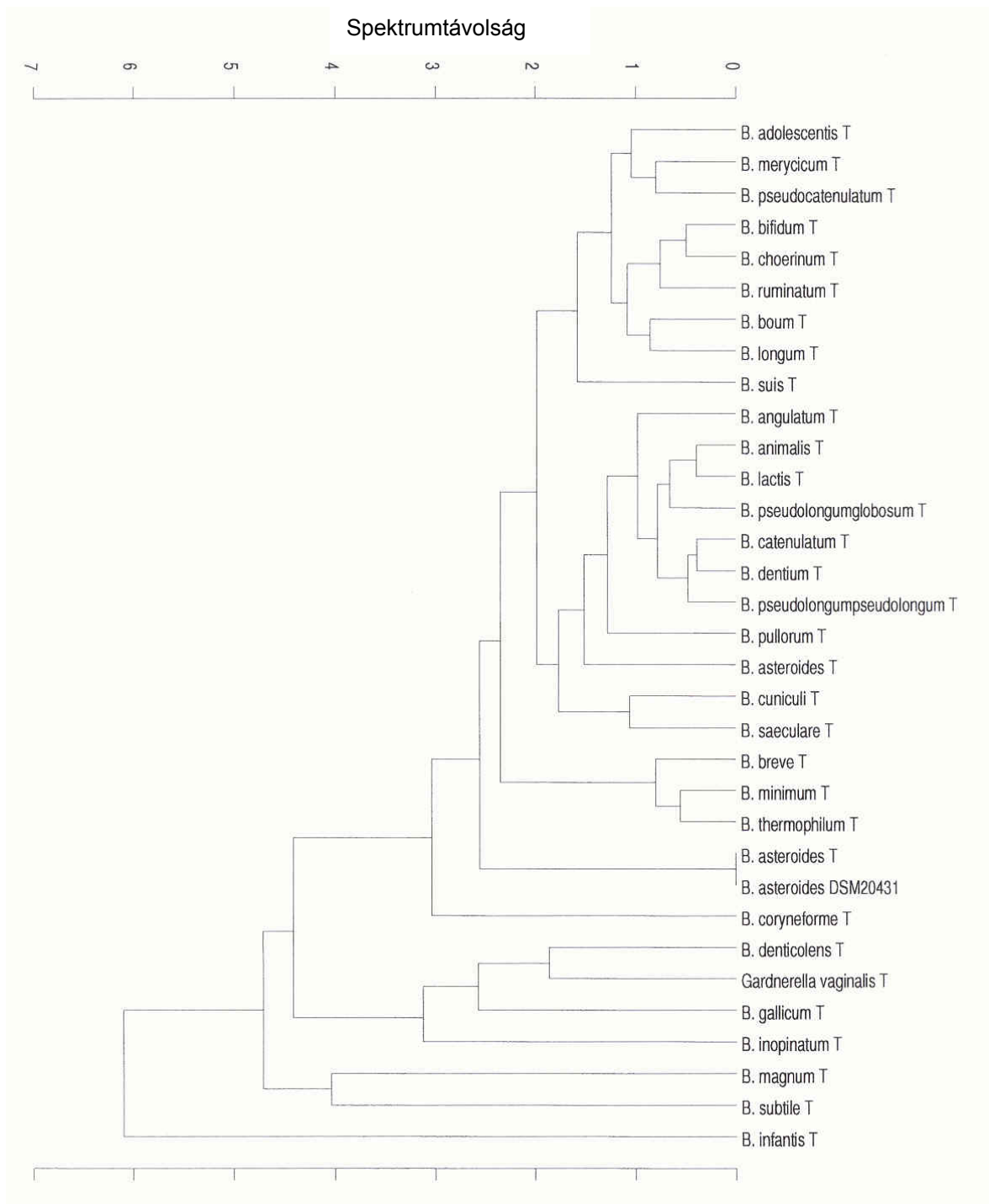
+=kismértékű szaporodás, tűszúrásnyi telepek, ++= közepes mértékű szaporodás,

+++=nagymértékű szaporodás, -= egyetlen egy telep sem fejlődött ki, na= nem vizsgáltam

Az MRS és APT agart rutinszerűen használják tejsavbaktériumok tenyésztésére FT-IR spektroszkópiás vizsgálatoknál. Ezek nem bizonyultak megfelelőnek a bifidobaktériumok tenyésztésére. Az NNLP és DP agarok bifidobaktériumok izolálásához kifejlesztett szelektív agarok, azonban ezeken is eltérő szaporulatot mutattak a különböző *Bifidobacterium* fajok. A DSMBIF agar, a DSMZ katalógus által bifidobaktériumok tenyésztése számára ajánlott táptalaj. Az általam elvégzett vizsgálatokban is kedvező eredményeket adott, azonban elkészítése igen időigényes, így a hasonlóan jó szaporulatot biztosító RCM agart választottam, amely dehidratált formában készen kapható és egyszerűen és gyorsan elkészíthető.

4.1.2.2 Referenciakönyvtár létrehozása

A 33 referenciatörzzsel (31 *Bifidobacterium* típusörzs, *Gardnerella vaginalis* típusörzs, a DSMZ egy nem típusörzse) három (vagy több) független mérésből spektrumátlagot, ezekből a rokonsági szint megállapításához egy dendogramot készítettem. A hasonlóságok az egyes fajok között a következők voltak (**6. ábra**): *B. animalis*/*B. lactis* (SD-érték = 0,3), *B. bifidum*/*B. choerinum* (0,5), *B. catenulatum*/*B. dentium*/*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* (0,5) és *B. minimum*/*B. thermophilum* (0,5). Az összes többi faj SD-értéke nagyobb volt mint 0,5, amely igen kis hasonlóságot mutat, illetve ha $SD > 1.0$ a disszimilitás esete áll fenn, valamint, ha $SD = > 1,5$ az igen nagy különbséget jelent.



6. ábra *Bifidobacterium* típustörzsek dendogrammja

4.1.3 A környezeti stressz hatások modellezése kémcső kísérletekkel

Az átlagos élelmiszer tranzitidő, valamint az emésztőnedvek összetételének figyelembevételével az alábbiakban leírt modelleket dolgoztam ki és valósítottam meg az emésztési folyamat *in vitro* szimulálására.

4.1.3.1 Gyomor szimuláció

A probiotikus termék elkészítése

10 ml TPY levesben 37°C-on, anaerob körülmények között felszaporítottam a kiválasztott törzseket. Majd a levesből a törzseket egyenként 2,8 % zsírtartalmú 150-150 ml tejbe oltottam át, és 48 óráig 37 °C-on anaerob körülmények között inkubáltam.

A fermentált termékeknek meghatároztam a pH-ját és az élősejtszám koncentrációt.

A gyomor szimuláció lépései

A felső emésztőtraktusban a bifidobaktériumokat érő legnagyobb sokkhatás a gyomorban uralkodó savas környezet (pH=2-3). Ezt úgy modelleztem, hogy 1,25 N-os HCl oldattal lesavanyítottam (pH=3) az előbbieken előállított termékeket.

A lesavanyított termékeket 90 percig 37°C-on inkubáltam. Mintát vettem a 0., 5. és 90. percben. 1ml mintához 0,5 ml 0,111 N-os NaOH-ot és 8,5 ml Ringer-oldatot adtam, és hígítási sor elkészítése után lemezöntéssel vizsgáltam az élősejtszámot. A folyamat során pH ellenőrzést is végeztem.

4.1.3.2 A szájüregben, a gyomorban és a vékonybélben lejátszódó folyamatok szimulálása

A probiotikus termék elkészítése

10 ml TPY levesben 37 °C-on, anaerob körülmények között felszaporítottam a kiválasztott törzseket. A levesből a törzseket egyenként 2,8 G/V % zsírtartalmú 50-50 ml tejbe oltottam át, és 48 óráig 37 °C-on anaerob körülmények között inkubáltam. Az inkubálási idő után joghurt típusú termékeket kaptam, amelyeknek megmértem a pH-ját és lemezöntéssel meghatároztam az élősejtszámát.

Oldatok

Nyálat helyettesítő oldat

-NaCl	6,2 g
-CaCl ₂	0,22 g
-KCl	2,2 g
-NaHCO ₃	1,2 g
-Desztillált víz	1000 ml

Autoklávozás 121 °C-on 15 percig.

Gyomornedvet helyettesítő oldat

- 81 ml pepszinogén a nyálat helyettesítő 1000ml elektrolit oldatban feloldva
- 1 M HCl

Autoklávozás 121 °C-on 15 percig.

Az epét helyettesítő oldatok

2 %-os epesav

- Epekivonat (SIGMA) 8 g
- Desztillált víz 200 ml

Sterilizés: steril szűrőn átszűrve.

4 %-os epesav

- Epekivonat (SIGMA) 4 g
- Desztillált víz 100 ml

Sterilizés: steril szűrőn átszűrve.

Hasnyálat helyettesítő oldat

- Pancreatin (SIGMA) 14 g
- 0,3 M NaHCO₃ oldat 200 ml

Sterilizés: steril szűrőn átszűrve.

0,3 M NaHCO₃ oldat

- NaHCO₃ 5 g
- Desztillált víz 200 ml

Autoklávozás 121°C-on 15 percig.

A szimuláció lépései

Az emésztőtraktus felső szakaszának szimulálását anaerob körülmények között hajtottam végre. A joghurt típusú mintákhoz az anaerob boxban 50-50 ml nyálat, 10-10 ml pepszinogén oldatot, 10-10 ml 1 M HCl-ot adtam, és vizsgáltam a sejtszám alakulását és a pH változását.

40 perc múlva újból pepszinogén oldatot (15 ml) és 1 M HCl-ot (15 ml) adagoltam, és mértem a pH-t.

80 perc múlva 14 ml pepszinogén oldatot adtam a mintákhoz, és sejtszámlálást végeztem, és ismét megmértem a pH-t.

60 perc múlva már a vékonybélben levő állapotok szimulálására a mintákhoz 14 ml 4 %-os epesavat, 8 ml hasnyálat helyettesítő oldatot és 10 ml nyálat helyettesítő oldatot adtam és megmértem a pH-t és szükség esetén pH korrekciót alkalmaztam (pH=6,0), majd sejtszám meghatározást végeztem.

90 perc múlva 13 ml 4 %-os epesavat, 7,5 ml hasnyálat helyettesítő oldatot és 7,5 ml nyálat adtam a mintákhoz, és vizsgáltam a pH alakulását.

30 perc múlva 60 ml 2 %-os epesavat, 1,5 ml hasnyálat helyettesítő oldatot és 1,5 ml nyálat adtam a mintákhoz, majd 3 órán keresztül állni hagytam azokat, majd a pH-t megmértem és meghatároztam az élősejt koncentrációt.

4.2 Bifidobaktériumok izolálásának eredményei

32 törzset izoláltam humán forrásból (25 csecsemő, 7 felnőtt). Élelmiszerekből, starterkultúrákból és gyermektápszerből, pedig összesen 27 törzset, ezeket a **12. és 13. táblázatok** szemléltetik. Az izolátumokat nemzetség szinten F6PPK tesztel, faji szinten fermentációs tesztekkel, FT-IR spektroszkópiával és 16S rDNS analízissel azonosítottam. Az izolált törzsek, fény és elektronmikroszkópos sejtmorfológiáit a mellékletek **5 és 6 ábrája** mutatja.

4.2.1 Azonosítás nemzetség szinten

A fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz teszt bifidobaktériumok nemzetség szinten való azonosítására alkalmas, mivel a F6PPK a bifidobaktériumok kulcsenzime [SCARDOVI, 1981]. Egyetlen nemzetség (egyetlen faja) mutat még pozitív reakciót erre a tesztre, a *Gardnerella vaginalis*. Ez a baktérium a humán genitális és urinális traktusban fordul elő, azonban sejtmorfológiájában és szaporodási feltételeiben jelentősen eltér a bifidobaktériumoktól [PICKETT *et al.*, 1981]. A sejtek feltárására ORBAN [2000] a berendezés-igényes ultrahangos feltárás helyett a sejtek átjárhatóvá tételére egy felületaktív detergenst (CTAB (cetyltrimethylammonium bromid), Sigma) ajánl. Nyolc ismert *Bifidobacterium* törzsnél a sejtek feltárását mindkét módszerrel elvégezve meggyőződtem arról, hogy mindkét módszer biztonságosan használható. Eredményeim alapján a továbbiakban a felületaktív anyaggal történő előkezelési módszert alkalmaztam a F6PPK tesztnél, amellyel az izolátumok nemzetség szintű besorolását végeztem.

4.2.2 Azonosítás faji szinten

A bifidobaktériumok izolálását és a különböző eredetű *Bifidobacterium* törzsekből álló mikroorganizmus gyűjtemény létrehozását akkor tekintettem befejezettnek, amikor az izolátumok faji besorolása is megtörtént. A faji azonosítás céljából 3 különböző módszert alkalmaztam, amelyeket részben magam fejlesztettem ki. Ennek megfelelően különböző szubsztrátumok erjesztési vizsgálatait végeztem el, egyrészt irodalmi adatokra támaszkodva, másrészt az általam kifejlesztett teszt segítségével. Molekuláris genetikai módszerek közül a 16S rDNS analízist használtam az izolátumok faji besorolásához. FT-IR spektroszkópiás módszert fejlesztettem ki *Bifidobacterium* fajok azonosítására ismert fajok törzseinek referencia spektrumkönyvtárának létrehozásával.

4.2.2.1 Erjesztési próba

A *Bifidobacterium* törzsek faji besorolására alkalmas 54 reakciót tartalmazó szoftveresen értékelhető mikrotiterlemezes vizsgálati módszert dolgoztam ki. 21 élelmiszereredetű izolátum közül három kivétellel az összes izolátumot *B. animalis* és *B. lactis* fajokként azonosítottam (**13.táblázat**). A legtöbb izolátumnak a referencia törzshöz viszonyított eltérése igen alacsony volt, ezért feltételezhető, hogy a két faj között igen nagy a hasonlóság és így az is, hogy csak véletlenszerűen történt az, hogy az adott esetben egyik vagy másik faj került-e az azonosítási lista élére. A teszttel három törzset *B. longum*-ként azonosítottam, de ezek lényegesen nagyobb eltérést mutattak a referencia törzsek tulajdonságaihoz képest. Ezzel a három törzssel elvégeztem a Crociani féle azonosítást, mellyel szintén *B. longum* fajként azonosítottam.

A 28 humán izolátum esetében elvégzett mikrotiterlemezes teszt eredményei a következőképpen alakultak (**12.táblázat**): 11 *B. longum*, 8 *B. bifidum*, 3 *B. dentium*, 4 *B. breve*, 1 *B. animalis* és 1 *B. angulatum* izolátum. Nem minden azonosítás volt jó minőségű. A legtöbb *B. longum* törzs elfogadható hasonlóságot mutatott a referencia törzsekhez. Más részről a *B. breve*, *B. dentium* és *B. angulatum* izolátumok már inkább disszimilárisak voltak a referencia adatokkal. A *B. bifidum* és *B. longum* törzsek esetében különböző hasonlósági eredmények mutatkoztak. Kiemelném a G 1436 törzset mely 19 reakcióban tért el *B. angulatum* referencia törzstől, tehát ez az azonosítás volt a legkétesebb. A 6 összetett szénhidrátot tartalmazó azonosító-kulccsal elvégzett azonosítás eredményei két kivétellel (G1436, G1443) megegyeznek a fenti eredményekkel.

4.2.2.2 16S rDNS analízissel

A 16S rDNS analízissel a fenti azonosítási eredményeket erősítettem meg. Az élelmiszereredetű izolátumok között legnagyobb hasonlóság a *B. animalis* és *B. lactis* között mutatkozott. A G1463 törzsnél például a BLAST a következő eredményt adta: 1297 pont szerint *B. lactis*, 1291 pont szerint *B. animalis*. A *B. longum* és *B. infantis* között szintén nagy hasonlóság mutatkozott, pl. a G1547 izolátum BLAST azonosítása a következő: 1891 pont szerint *B. infantis* és 1879 pont szerint *B. longum*. Ezeknél a törzseknél tehát aszerint, hogy melyik volt az első találat a *B. longum/infantis* ill. a *B. infantis/longum* elnevezést alkalmaztam. Megerősítettem azt a tényt, hogy *B. animalis* és *B. lactis* valamint *B. longum* és *B. infantis* fajok között 16S rDNS analízissel

különbséget tenni nem lehet, mert köztük a hasonlóság 99%-os [MEILE *et al.*, 1997]. Eredményeim is igazolják CAI és munkatársai 2000-ben készült munkájukban felvetett javaslatának jogosságát, hogy a *B. lactis* és *B. animalis* fajok azonosnak tekinthetők, ezért célszerű a *B. lactis* elnevezés eltörlése, illetve a *B. lactis* és *B. animalis* név szinonimaként való használata. A *B. lactis* és *B. animalis* fajok közti hasonlóságot a HSP60 hősokk génjük szekvenálásával is igazolták [JIAN *et al.*, 2001]. Másrészt VENTURA és munkatársainak [2001b] sikerült a *B. lactis* fajt egy 16S rDNS primerrel a többi *Bifidobacterium* fajtól elkülöníteni. A *B. animalis* és *B. lactis* külön fajba tartozásáról napjainkig nincs állásfoglalás a Nemzetközi Bakteriológiai Szövetségnél (International Committee on Systematic Bacteriology).

A Németországból, Magyarországról és Lengyelországból származó probiotikus élelmiszerekből csak *B. animalis*-t sikerült izolálnom. Meglepőbb eredmény az, hogy a gyártó által megadott *B. bifidum*, *B. longum* és *B. infantis* összetételű starterben is csak *B. lactis*-t -amely fel sem volt tüntetve- és *B. longum*-ot találtam.

Ez azt mutatja, hogy leggyakrabban ezt a törzset használják az élelmiszeriparban, vagy kisebb valószínűséggel azt, hogy véletlenszerűen csak olyan termékeket vontam be a kísérletbe, amely ezzel a törzzsel készült. Itt meg kell említenem, hogy számos termék címkéjén a *B. bifidum* és *B. longum* fajok voltak feltüntetve, annak ellenére, hogy ezekből is *B. lactis* izoláltam. Ilyen tapasztalatot más szerzők munkájában is olvastam. Például BIAVATI [1992] közleményében, ahol hat fermentált tejterméket vizsgáltak, és a címkén található jelölés ellenére csak *B. animalis*-t találtak. Egy másik kísérletben 15 tejtermékből izoláltak bifidobaktériumot, amelyből 11 *B. animalis* volt, szintén a jelöléssel ellentétben. Ezzel a problémával a legújabb tanulmányokban is találkozhatunk [BONAPARTE, 1997; MATTARELLI, 2002; REUTER, *et al.* 2002; TEMMERMAN, 2002]. Az a feltételezés azonban, hogy a *B. lactis* technofunkcionális tulajdonságai így túlélőképessége jobb a többi faj törzseinél, valószínűleg tényleg helytálló, ezért is alkalmazzák szívesen ezt a fajt a gyártók.

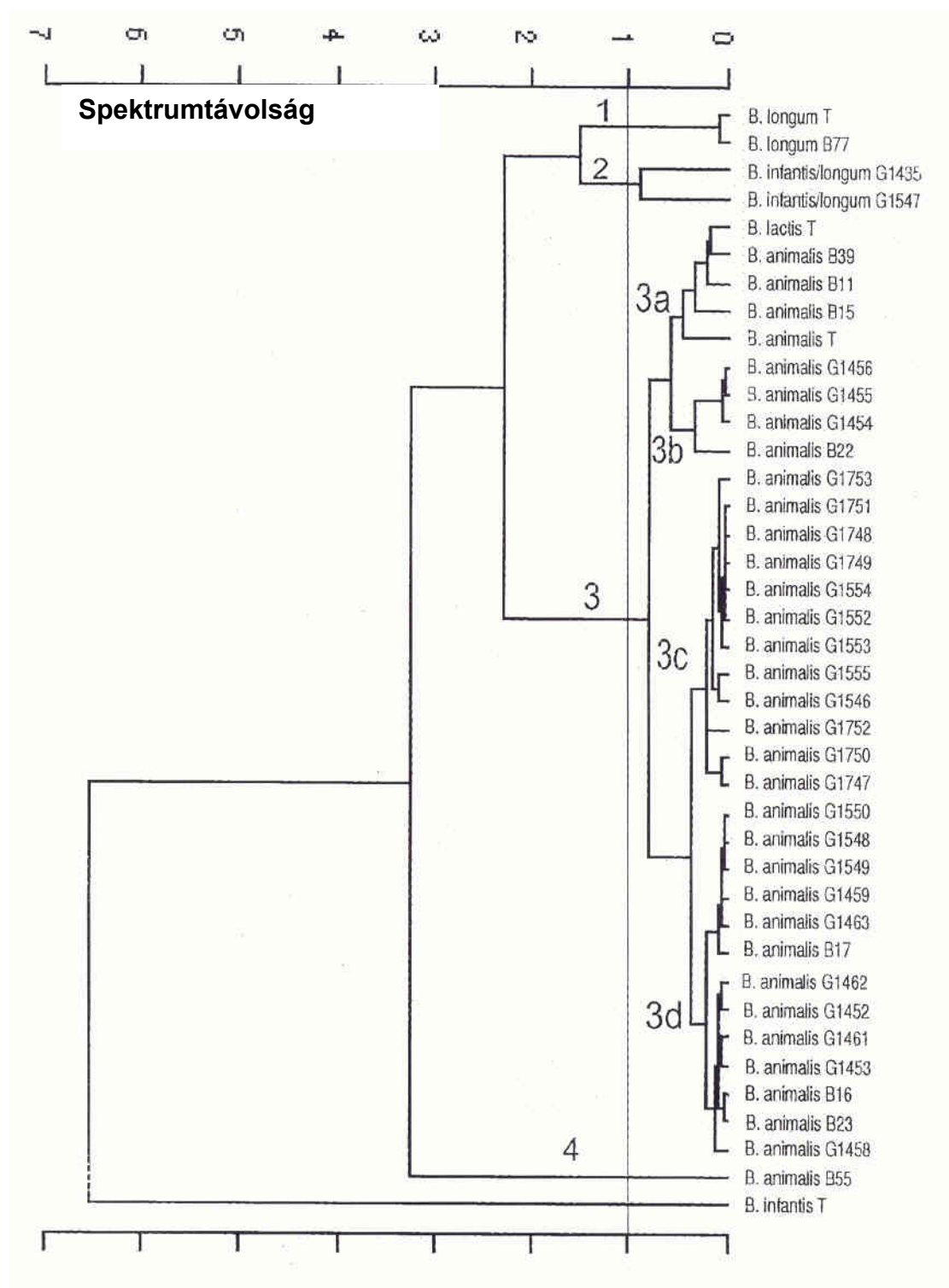
A 16S rDNS analízist a 28 humán izolátummal is elvégeztem (12.táblázat). A legtöbb csecsemő izolátum *B. bifidum* volt, ezt követte a *B. infantis/longum*, *B. breve*, és *B. dentium*. A G1436 és G1443 törzseket *B. pseudocatenulatum* fajként azonosítottam ezzel a vizsgálati módszerrel. Az összes felnőtt izolátum *B. infantis/longum* volt egyet

kivéve amelyet *B. dentium* fajként azonosítottam. Szintén szoros BLAST azonosításokat/eredményeket kaptam a *B. infantis* és *B. longum* esetében pl. 1879/1837, 1829/1781 és 1509/1479 a G1541, G1577 és G 1444 törzseknél.

A bifidobaktériumok azonosítása meglehetősen problematikus a fajok fenotípusos és genotípusos heterogenitása miatt [LEBLOND-BOURGET *et al.*, 1996]. Az általam is alkalmazott 16S rDNS analízissel egyes fajok nem különböztethetőek meg teljes mértékben. Például a 16S rDNS szakaszon lévő hasonlóság a *B. longum* és a *B. infantis* valamint a *B. animalis* és *B. lactis* fajok között 99% [MEILE *et al.*, 1997] ami azt jelenti hogy a 97%-os pontossággal megszekvenált törzsekről nem állapíthatjuk meg, hogy melyikhez tartozik. A tradicionális módszerekkel is igen nehéz őket elkülöníteni. Ugyancsak jelentős hasonlóság található *B. longum/infantis* és *B. suis* és *B. breve* között [LAUER és KANDLER, 1983]. Ezért fordulhatott elő a **12. táblázatban** látható két félreidentifikálás.

4.2.2.3 Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiával

Először 27 saját és 9 Bonaparte [1997] élelmiszeripari izolátummal végeztem el az FT-IR spektroszkópiás mérést. A 36 izolátum FT-IR spektrumát összehasonlítottam a 33 referencia törzsével. Csak a *B. animalis*, *B. lactis* és *B. longum* fajok típustörzsével mutattak hasonlóságot egyes izolátumok. Ezt figyelembe véve egy olyan dendogramot készítettem (**7. ábra**) mely a 36 izolátumot és négy szomszédos/közeli típustörzs rokonságát mutatja be. A B77 jelű izolátum a *B. longum* típustörzsszel igen közeli rokonságot mutat (1. klaszter). Két *B. longum*-ként azonosított starterkultúra izolátum képezi a 2. klasztert (2a, 2b). A 3. klasztert *B. animalis* izolátumok alkotják, a 3a szubklaszterben három Bonaparte izolátum van a *B. lactis* és *B. animalis* fajok típustörzsével együtt. A 3b szubklaszterben négy izolátum helyezkedik el. A 3c szubklaszter tíz élelmiszerből izolált törzset és két az SKW Vállalat által gyártott starterkultúrából izolált törzset (G1555, G1546), a 3d szubklaszter tíz élelmiszerből izolált törzset és három a Chr. Hansen Vállalat által forgalmazott starterkultúrából izolált (G1548, G1549, G1550) törzset foglalja magában. A B55 nevű törzs egyedül képezi a 4. klasztert.



7. ábra Élelmiszereredetű izolátumok dendogramja

a számok ill. betűk a klasztereket ill. szubklaszttereket jelentik

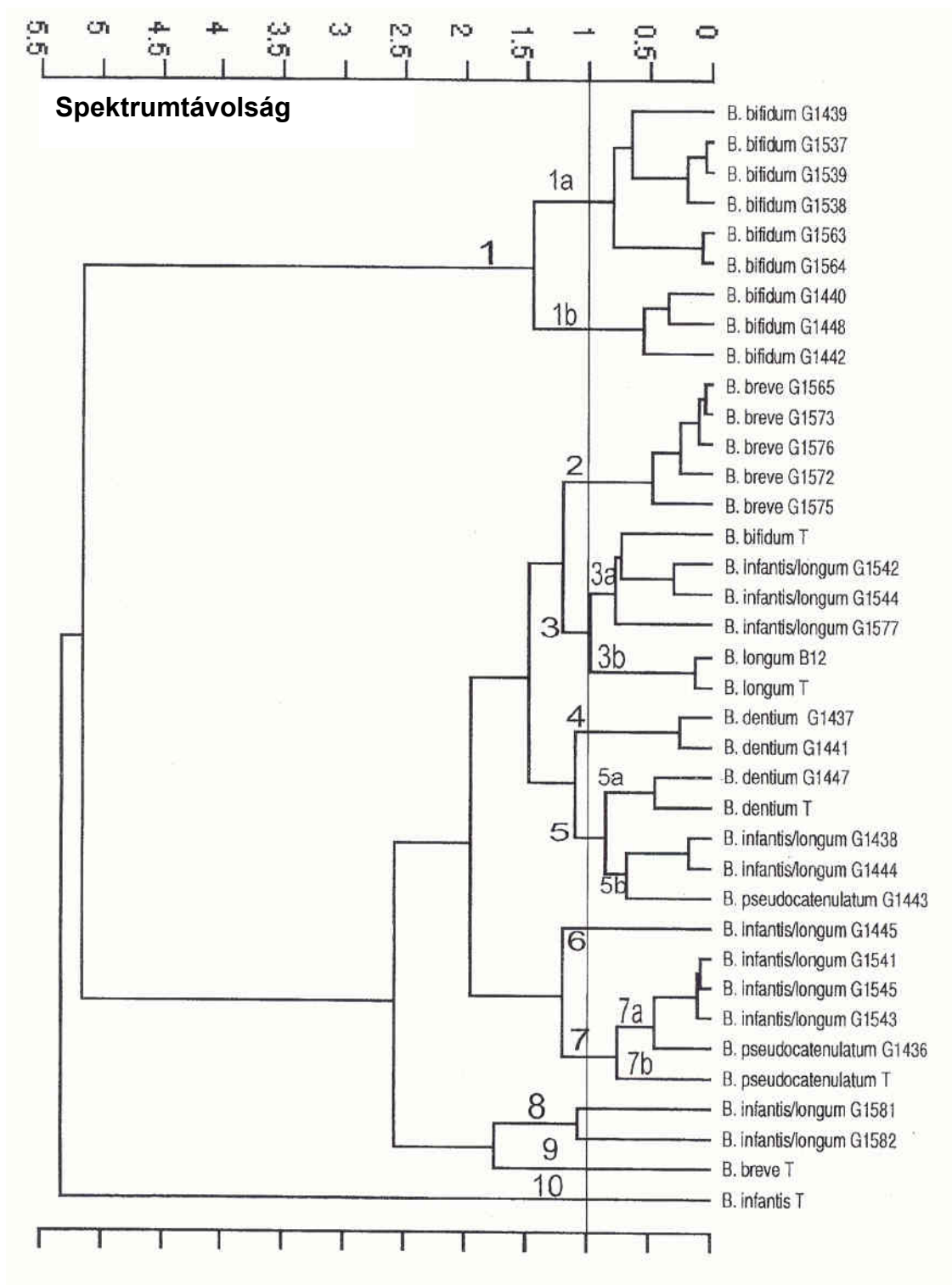
Ezután 31 humán izolátum FT-IR spektrumát vettem fel. Ezeket szintén a 33 referencia törzsszel hasonlítottam össze. Hasonlóságot a típustörzsekkel nem minden esetben találtam. Sem a *B. bifidum* sem a *B. breve* fajhoz tartozó izolátumok nem voltak egy klaszterbe sorolhatók típustörzseikkel (8. ábra). Az 1. klasztert kilenc *B. bifidum*

izolátum a 2. klasztert öt *B. breve* izolátum alkotja. A *B. bifidum* típustörzs nagyobb hasonlóságot mutat a 3a szubklaszter törzseivel, mint a 2. klaszterrel, így rokonságot mutat néhány *B. infantis/longum* izolátummal. A *B. infantis/longum* izolátumok nem tiszta allokációval öt klaszterbe sorolhatók: 3a, 5b, 6, 7a, 8. Csak három klaszter tartalmaz felnőtt izolátumokat (3a, 6, 7a). A *B. dentium* G1447 jelű törzs, amely egy felnőtt izolátum, nagy hasonlóságot mutat a *B. dentium* faj típustörzsével (5a) és szintén ehhez a fajhoz tartozó két csecsemő izolátummal a 4. klasztert képezve. A két *B. pseudocatenulatum* fajhoz tartozó izolátum (G1436, G1443) nem mutat tiszta allokációt. Csak az első helyezkedik el a típustörzs mellett. A 3b szubklaszterben a *B. longum* B12 nagy affinitást mutat a *B. longum* típustörzsszel. A *B. infantis* típustörzs az összes izolátumtól igen messze helyezkedett el.

A fentiekben leírt összes törzs felvett IR spektrumát azzal a fajnévvel jelöltem meg amit a genotípusos és fenotípusos azonosítás eredményeként kaptam. Ezeket a spektrumokat együtt a típustörzsek spektrumával összegyűjtöttem egy RSK-be (referencia spektrum könyvtár). Minden törzset egyszer kivettem az RSK-ból és ezután a könyvtárhoz –amely ezt a spektrumot nem tartalmazta- viszonyított hasonlóság találati-listáját vizsgáltam.

Az eredményeket a **12. és 13. táblázatokban** láthatjuk. Az élelmiszer eredetű izolátumok esetében igen jó minőségű azonosságokat láthatunk a *B. animalis* és *B. infantis/longum* fajok esetében, a spektrumtávolság/spectral distance az első találathoz képest minden esetben igen kicsi volt ($SD = <0,4$). A G1435, G1547 és B55 törzsek esetében már rosszabb minőségű volt az azonosítás ($SD = 0,4 - 1,0$). A G1547 törzs szintén kétes eredményt adott az egyéb azonosítási módszerekkel.

A humán izolátumok IR spektroszkópiás azonosítása a legtöbb esetben jó eredményt adott. Egyértelmű azonosítás volt végezhető a *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis/longum* és *B. dentium* fajhoz tartozó törzsek esetében. A *B. pseudoactenulatum* faj G1436 törzsét viszont tévesen *B. infantis/longum* és a G1443 törzsét *B. animalis*-nak azonosítottam. Ezeknél a törzseknél (G1436 és G 1443) a mikrotiterlemez módszer sem adott a 16 S rDNS analízissel egyező eredményt. A *B. infantis/longum* G1445 törzs esetében nem értem el egyértelmű azonosítást. A G1581 és G1582 törzseknél szintén rossz minőségű azonosítást kaptam.

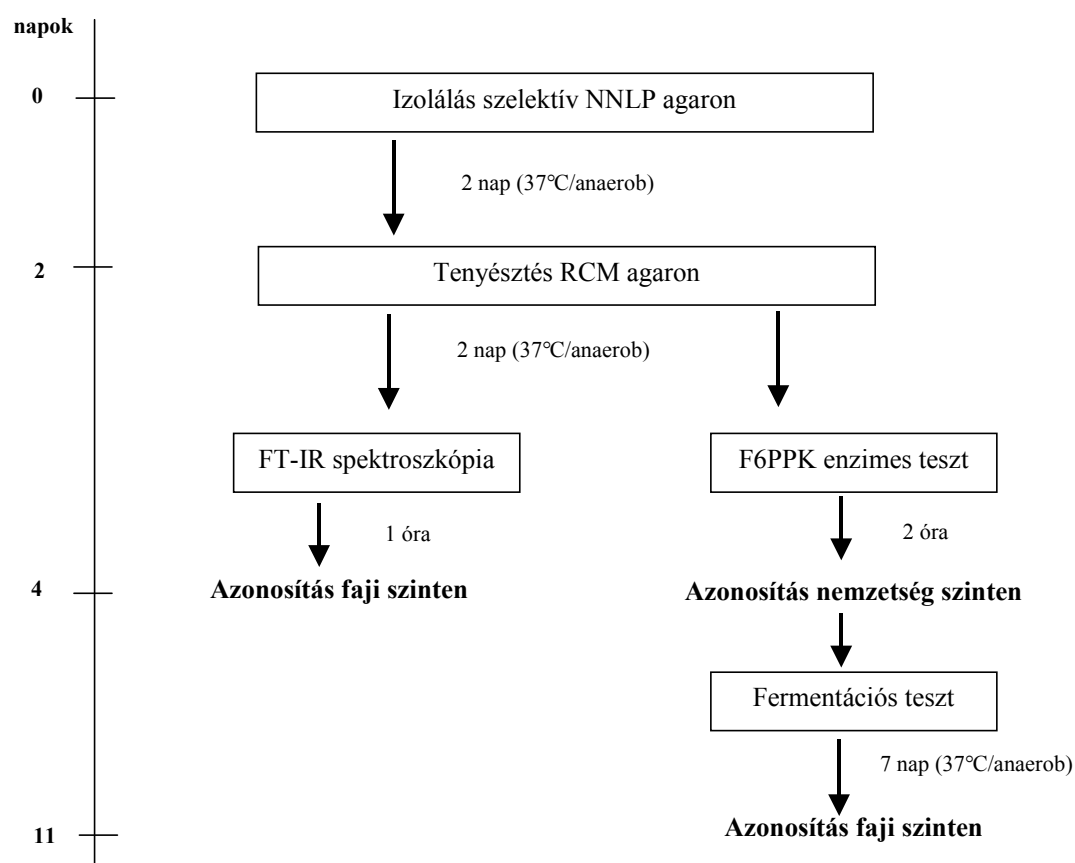


8.ábra Humán eredetű izolátumok dendogramja

a számok ill. betűk a klasztereket ill. szubklaszttereket jelentik

Az FT-IR azonosítás validálását illetően megállapítható, hogy az azonosítás jósága a következők szerint alakult: *B. animalis/lactis* 100% (33 törzs), *B. bifidum* 100% (9 törzs), *B. breve* 100% (5 törzs), *B. dentium* 100 % (3 törzs), *B. infantis/longum* 80%

(15 törzs). A *B. pseudocatenulatum*-nál 0% -volt validálás eredménye, igaz ez csak két törzs adataiból adódott. Ennek a félreidentifikálásnak az oka lehetett, hogy a G1436 és G1443 törzsek spektrumai jobban hasonlítottak *B. animalis*-hoz mint a *B. pseudocatenulatum* típustörzshöz. Ez a példa demonstrálja hogy a IR spektroszkópiás azonosításhoz nem elég csak típustörzsekből készített referencia-könyvtárhoz hasonlítani. Legalább tíz, az adott fajhoz tartozó –lehetőleg különböző helyekről származó- izolátum spektrumát kell felvenni a könyvtárba. Csak ezzel az eljárással lehet garantálni, hogy az adott faj legtöbb spektrumtípusát figyelembe vesszük mintázat szerinti felismerési technika során. A FT-IR analízis megfelelő technikának bizonyul bifidobaktériumok azonosításához. Sokkal gyorsabb, mint a tradicionális fermentációs tesztek valamint olcsóbb és egyszerűbb, mint a molekuláris analízisek. A három vizsgálat (fermentációs teszt, 16S RDNS analízis, FT-IR spektroszkópia) közül a leggyorsabb azonosítási módszernek a FT-IR spektroszkópiás mérés bizonyult. Ezt szemlélteti a 9. ábra.



9. ábra A FT-IR spektroszkópiával és fermentációs tesztekkel végzett azonosítás időtakarékoság szerinti összehasonlítása *Bifidobacterium* fajok azonosításánál

Azonosítási vizsgálatok eredményeit analízálva megállapítható, hogy hasonlóan *B. animalis* és *B. lactis* fajokhoz a rokonság a *B. infantis* és *B. longum* fajok között szintén kérdéses. Annak ellenére, hogy a fermentációs tesztekkel az összes ebbe a csoportba tartozó izolátumot *B. longum*-ként azonosítottam, a 16S rDNS analízisnél elvégzett BLAST program első találatként szinte mindig a *B. infantis*-t adta meg, melyet alig 30-40 pontkülönbséggel követett a *B. longum*. Érdekesség, hogy ennek ellenére a FT-IR spektroszkópiánál a *B. longum* és *B. infantis* típustörzsek erős disszimilitást mutattak. Ez mégsem tekinthető ellentmondásnak, mert néha egy fajon belül is találhatunk különböző spektrumtípusokat [KÜMMERLE *et al.*, 1998; OBERREUTER *et al.*, 2001].

A 16S rDNS analízis igen megbízható azonosítási technika és alkalmas a molekuláris szintű hasonlóság és azonosságok kimutatására, valamint a filogenetikai rokonsági kapcsolatok feltárására, de mivel időigényes, drága és munkaigényes, nem ajánlható rutin laboratóriumok (pl. tejipari cégek) vizsgálati módszereként. Az FT-IR bár gyors, költségkímélő módszer, de speciális berendezést igényel és hazánkban még nem terjedt el. Az általam kidolgozott fermentációs tesztet megfelelőnek tartom rutin szerű vizsgálathoz, nem igényel nagyműszert és a házilag történő előállítást figyelembevéve költségkímélő módszernek tekinthető.

12. táblázat Humán izolátumok

Törzs szám	Törzs név	Eredet	Azonosítás			
			53 reakciós mikrotiter-lemezes teszt (RD) ^c	összetett szénhidrát teszt	16S rDNS analízis (homológia az első találattal / bázis)	FT-IR spektroszkópia klaszterszám/faj (SpD) ^d
G ^a 1436	B1.1	csecsemő	<i>B. angulatum</i> (19)	<i>B. p'catenulatum</i>	<i>B. p'catenulatum</i> (98%/1000)	7a / <i>B. longum/infantis</i> (0,31)
G1437	B2.1	csecsemő	<i>B. dentium</i> (11)	<i>B. dentium</i>	<i>B. dentium</i> (96%/600)	4 / <i>B. dentium</i> (0,19)
G1438	B2.2	csecsemő	<i>B. longum</i> (7)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (96%/800)	5b / <i>B. longum/infantis</i> (0,13)
G1439	B1.2	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (12)	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> (97%/1000)	1a / <i>B. bifidum</i> (0,53)
G1440	B3.2	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (7)	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> (97%/900)	1b / <i>B. bifidum</i> (0,31)
G1441	B2.3	csecsemő	<i>B. dentium</i> (13)	<i>B. dentium</i>	<i>B. dentium</i> (98%/1000)	4 / <i>B. dentium</i> (0,19)
G1442	B3.1	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (11)	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> (97%/1000)	1b / <i>B. bifidum</i> (0,44)
G1443	B4.1	csecsemő	<i>B. animalis</i> (8)	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. p'catenulatum</i> (97%/900)	5b / <i>B. animalis</i> (0,39)
G1444	B6.1	csecsemő	<i>B. longum</i> (9)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (97%/800)	5b / <i>B. longum/infantis</i> (0,13)
G1445	A1.2	felelőtt	<i>B. longum</i> (6)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (96%/900)	6 / <i>B. p'catenulatum</i> (0,71) <i>B. longum/infantis</i> (0,81)
G1447	A3.2	felelőtt	<i>B. dentium</i> (11)	<i>B. dentium</i>	<i>B. dentium</i> (97%/900)	5a / <i>B. dentium</i> (0,36)
G1448	B5.1	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (9)	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> (97%/1000)	1b / <i>B. bifidum</i> (0,31)
G1537	B7.1	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (9)	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> (97%/1100)	1a / <i>B. bifidum</i> (0,02)
G1538	B7.2	csecsemő			<i>B. bifidum</i> (98%/400)	1a / <i>B. bifidum</i> (0,15)
G1539	B7.5	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (5)	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> (97%/400)	1a / <i>B. bifidum</i> (0,02)
G1540	B7.7	csecsemő			<i>B. ruminatums</i> (90%/600)	<i>B. dentium</i> (0,83)
G1541	A4.3	felelőtt	<i>B. longum</i> (6)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (97%/1000)	7a / <i>B. longum/infantis</i> (0,05)
G1542	A4.4	felelőtt	<i>B. longum</i> (6)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (96%/600)	3a / <i>B. longum/infantis</i> (0,23)
G1543	A4.6	felelőtt	<i>B. longum</i> (6)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (96%/800)	7a / <i>B. longum/infantis</i> (0,06)
G1544	A4.8	felelőtt	<i>B. longum</i> (6)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (95%/900)	3a / <i>B. longum/infantis</i> (0,23)
G1545	A4.9	felelőtt	<i>B. longum</i> (4)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (97%/900)	3a / <i>B. longum/infantis</i> (0,05)
G1563	B8.2	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (5)	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> (85%/600)	1a / <i>B. bifidum</i> (0,05)
G1564	B8.3	csecsemő	<i>B. bifidum</i> (5)	<i>B. bifidum</i>		1a / <i>B. bifidum</i> (0,05)
G1565	B9.1	csecsemő	<i>B. breve</i> (14)	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i> (97%/1000)	2 / <i>B. breve</i> (0,03)
G1572	B9.10	csecsemő			<i>B. breve</i> (98%/800)	2 / <i>B. breve</i> (0,19)
G1573	B9.11	csecsemő	<i>B. breve</i> (14)	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i> (97%/1000)	2 / <i>B. breve</i> (0,03)
G1575	B9.14	csecsemő	<i>B. breve</i> (16)	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i> (97%/1100)	2 / <i>B. breve</i> (0,27)
G1576	B9.15	csecsemő	<i>B. breve</i> (17)	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i> (97%/1100)	2 / <i>B. breve</i> (0,06)
G1577	B10.1	csecsemő	<i>B. longum</i> (9)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (97%/1000)	3a / <i>B. longum/infantis</i> (0,59)
G1578	B10.2	csecsemő				8 / <i>B. breve</i> (0,74)
G1581	B11.1	csecsemő	<i>B. longum</i> (11)	<i>B. longum</i>	<i>B. longum/infantis</i> (74%/300)	8 / <i>B. longum</i> (0,83)
G1582	B11.2	csecsemő			<i>B. infantis/longum</i> (92%/500)	<i>B. longum/infantis</i> (0,88)
B ^b 12	Reuter	felelőtt	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>		3b / <i>B. longum</i>

^a saját izolátum (a G a gliceriben tartósításra utal), ^b Bonaparte izolátumok lásd irodalomjegyzék Bonaparte (1997), ^cRD=relative distance, viszonylagos távolság, az 53 tulajdonság eltérő eredményeinek átlaga a referencialista első találatához viszonyítva, ^dSpD= spektrumok közötti távolság, a referencia spektrum könyvtár első találatához képest (a 0 jelenti a teljes azonosságot), **üres cellák** = nem történt vizsgálat

13. táblázat Élelmszer eredetű izolátumok

Törzs szám	Törzs név	Eredet	Azonosítás			
			53 reakciós mikrotiter-lemezes teszt (RD) ^c	összetett szénhidrát teszt	16S rDNS analízis (homológia az első találattal / bázis)	FT-IR spektroszkópia klaszterszám/faj(SpD) ^d
G ^a 1435	B. longum536	Starter	<i>B. longum</i> (6)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (95%/600)	2 / <i>B. suis</i> (0,44)]
G1452	BioA3	Joghurt	<i>B. animalis</i> (3)		<i>B. animalis/lactis</i> (98%/700)	3d / <i>B. animalis</i> (0,04)
G1453	Bio3	Joghurt				3d / <i>B. animalis</i> (0,04)
G1454	Danone1	Joghurt	<i>B. animalis</i> (3)		<i>B. animalis/lactis</i> (98%/1000)	3b / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1455	Danone2	Joghurt				3b / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1456	Danone3	Joghurt				3b / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1458	AloesA3	Joghurt	<i>B. animalis</i> (3)		<i>B. animalis/lactis</i> (97%/700)	3d / <i>B. animalis</i> (0,07)
G1459	Aloes3	Joghurt				3d / <i>B. animalis</i> (0,02)
G1461	PBA1	Joghurt				3d / <i>B. animalis</i> (0,04)
G1462	PBA2	Joghurt				3d / <i>B. animalis</i> (0,02)
G1463	PBA4	Joghurt	<i>B. animalis</i> (3)		<i>B. lactis/animalis</i> (98%/700)	3d / <i>B. animalis</i> (0,03)
G1546	B320	Starter	<i>B. animalis</i> (0)		<i>B. lactis/animalis</i> (94%/700)	3c / <i>B. animalis</i> (0,03)
G1547	K630	Starter	<i>B. longum</i> (10)	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis/longum</i> (96%/1100)	2 / <i>B. breve</i> (0,49)
G1548	YM1	Starter	<i>B. lactis</i> (7)			3d / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1549	ABT	Starter	<i>B. lactis</i> (3)			3d / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1550	Bb-12	Starter	<i>B. animalis</i> (2)		<i>B. lactis/animalis</i> (96%/500)	3d / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1552	Nestle2	Tápszer	<i>B. animalis</i> (0)		<i>B. lactis/animalis</i> (98%/1000)	3c / <i>B. animalis</i> (0,02)
G1553	Onken	Joghurt				3c / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1554	Deller	Joghurt				3c / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1555	KHVW	Starter				3c / <i>B. animalis</i> (0,05)
G1747	Proculdrink	Joghurt			<i>B. lactis/animalis</i> (97%/900)	3c / <i>B. animalis</i> (0,03)
G1748	Lactopro+oliG	Joghurt				3c / <i>B. animalis</i> (0,00)
G1749	Kokos	Joghurt				3c / <i>B. animalis</i> (0,01)
G1750	ProculextraG	Joghurt				3c / <i>B. animalis</i> (0,03)
G1751	Lactopro+oliR	Joghurt				3c / <i>B. animalis</i> (0,00)
G1752	Proculextra	Joghurt				3c / <i>B. animalis</i> (0,08)
G1753	KYR	Joghurt	<i>B. animalis</i> (0)		<i>B. lactis/animalis</i> (98%/1000)	3c / <i>B. animalis</i> (0,03)
B ^c 11	Wiesby	Starter	<i>B. animalis</i> (3)			3a / <i>B. animalis</i> (0,15)
B15	FazelA	Tejipar	<i>B. animalis</i> (5)			3a / <i>B. animalis</i> (0,22)
B16	FazelB	Ferm.tej	<i>B. animalis</i> (2)			3d / <i>B. animalis</i> (0,02)
B17	Bio-Danone	Ferm.tej	<i>B. animalis</i> (2)			3d / <i>B. animalis</i> (0,03)
B22	Banature	Ferm.tej	<i>B. animalis</i> (2)			3b / <i>B. animalis</i> (0,26)
B23	Biogarde	Starter	<i>B. animalis</i> (3)			3d / <i>B. animalis</i> (0,02)
B39	Synbio	Starter	<i>B. animalis</i> (2)			3a / <i>B. animalis</i> (0,13)
B55	Roy	Starter	<i>B. animalis</i> (3)			4 / <i>B. animalis</i> (0,93)
B77	Visbyvac	Starter	<i>B. longum</i> (6)	<i>B. longum</i>		1 / <i>B. longum</i> (0,01)

Megjegyzéseket, és a rövidítések jelentését lásd az előző táblázatnál

4.3 Prebiotikus oligoszacharidok hasznosítási vizsgálatának eredményei

A hatékony prebiotikum kiválasztására kereskedelmi forgalomban lévő oligoszacharidok hasznosítását mind bifidobaktérium, mind enteropatogén törzsekkel megvizsgáltam, mivel olyan prebiotikumot kerestem, amely a bifidobaktériumok szaporodását szelektíven támogatja.

4.3.1 Bifidobaktériumokkal

A Raftiline, Raftilose és a Lactosucrose (LS) mintákat az összes vizsgált *Bifidobacterium* törzs hasznosította. Az izomalto-oligoszacharidok hasznosításában már különbség mutatkozott az egyes törzsek között. A *Bifidobacterium adolescentis*^T, *Bifidobacterium infantis*^T és *B. longum* (B6.1) izolátum nem volt képes kizárólagos

szénhidrátként hasznosítani az Isomalto500-t. Az Oligotime szirupot nem hasznosította a *B. bifidum* (B1.2) és *B. bifidum* (B7.5). Egyetlen xilo-oligoszacharid-ot sem hasznosított a *B. breve*^T, *B. bifidum* (B1.2), *B. bifidum* (B7.5) és *B. breve* (B9.11) valamint a Xylo-oligo95-ot a *B. longum* K630 nem hasznosította (**14. táblázat**).

14. táblázat Oligoszacharid hasznosítási vizsgálat bifidobaktériumokkal

Oligoszacharid	<i>B. adolescentis</i> ^T	<i>B. breve</i> ^T	<i>B. infantis</i> ^T	<i>B. longum</i> ^T	<i>B. bifidum</i> (B1.2)	<i>B. bifidum</i> (B7.1)	<i>B. bifidum</i> (B7.5)	<i>B. breve</i> (B9.10)	<i>B. breve</i> (B9.11)	<i>B. longum</i> (A1.2)	<i>B. longum</i> (B2.2)	<i>B. longum</i> (B6.1)	<i>B. longum</i> (A4.3)	<i>B. longum</i> (A4.4)	<i>B. longum</i> (A4.6)	<i>B. longum</i> (A4.8)	<i>B. lactis</i> B320	<i>B. lactis</i> ABT	<i>B. lactis</i> YM1	<i>B. longum</i> K630
Isomalto 500	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
OLIGOTIME	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OLIGOMT 500	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LS-44L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LS-55P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raftilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raftiline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylo-oligo70	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylo-oligo95	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

BIELECKA és munkatársai [2002] hasonló *in vitro* kísérletet végeztek oligofruktózok hasznosításának vizsgálatára. A legtöbb bifidobaktérium csak az alacsonyabb polimerizációs fokú oligoszacharidokat volt képes hasznosítani. A megvizsgált harminc *Bifidobacterium* törzs közül csak 18 szaporodását stimulálták a tesztelt oligoszacharidok.

4.3.2 Enteropatogénekkel

Az egyes oligoszacharidok hasznosítását enteropatogénekkel is megvizsgáltam, mivel célom olyan oligoszacharid kiválasztása volt, mely az enteropatogének szaporodását nem támogatja.

Az eredményekből kitűnik (**15. táblázat**), hogy az Oligotime szirup számos enteropatogén baktérium szaporodását nem támogatta, úgy mint: *Salmonella derby*, *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *E coli* 055:H6, *E coli*, *Proteus mirabilis* és *Yersinia enterocolitica*.

15. táblázat Oligoszacharid hasznosítási vizsgálat enteropatogénekkel

Oligoszacharid	10032 <i>Salmonella derby</i>	10051 <i>Salmonella cholerae-suis</i>	15001 <i>Salmonella typhi</i>	20001 <i>Shigella dysenteriae</i>	20015 <i>Shigella flexneri</i>	30213 <i>E coli 055H6</i>	35033 <i>E coli</i>	52047 <i>Klebsiella sp.</i>	61369 <i>Proteus mirabilis</i>	98001 <i>Yersinia enterocolitica</i>
Isomalto 500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OLIGOTIME	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
OLIGOMT 500	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
LS44L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LS55P	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Raftilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raftiline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Azt, hogy a frukto-oligoszacharidokat a bifidobaktériumok képesek hasznosítani számos szerző bizonyította [BUDDINGTON, 1996; GIBSON, 1999; BOUHNİK, *et al.*, 1998; SGHIR, *et al.*, 1998; RAO, 1999], de sokan kétségbe vonják a szelektív hatást.

Az izomalto-oligoszacharidok bifidobaktériumok növekedését támogató hatását *in vitro* és *in vivo* körülmények között is KOHMOTO és munkatársai bizonyították [1988]. 59 törzs (bifidobaktériumokat, és a humán vastagbél mikrobiota fontosabb képviselőit) növekedését vizsgálták (optikai denzitás alapján) *in vitro* 0,5 % izomalto-oligoszacharidokat tartalmazó táplevesben. A vizsgált *Bifidobacterium* fajok – a *B. bifidum* kivételével-, a bakteroideszek és az *Enterococcus faecalis* képesek voltak az izomalto-oligoszacharidokat egyedüli szénforrásként hasznosítani a többi baktérium (pl. a legtöbb *Clostridium*, *Lactobacillus*, *E. coli*, *Klebsiella*) nem. Hasonlóan az előzőekhez a bifidobaktériumok és bakteroideszek igen, míg a legtöbb bélbaktérium nem volt képes *in vitro* vizsgálatokban hasznosítani xilo-oligoszacharidokat és laktoszacharózt. [NAKAKUKI, 1993]. JASKARI és munkatársai [1998] xilánhidrolizátumok bifidobaktériumokkal való hasznosítását hasonlította össze raffinózzal és fruktoligomerekkel. A raffinóz és a fruktooligoszacharidok nagymértékben, a xilooligoszacharidok támogatták ugyan, de nem szignifikánsan a bifidobaktériumok szaporodását.

4.4 Bifidobaktériumok és az enteropatogén törzsek kölcsönhatása

A 224 vizsgálat közül 20 esetben tudtam kimutatni a bifidobaktérium törzsek gátló hatását az enteropatogének szaporodására. A vizsgált 12 törzs közül csak három izolátum és egy autentikus törzs, *B. longum*^T gátolta egyes enteropatogén baktériumok növekedését (16. táblázat).

16. táblázat *Bifidobacterium* törzsek antagonista hatása enteropatogénekre nézve

Bifidobaktérium törzsek	Enteropatogének													
	<i>Salmonella derby</i> 10032	<i>S. cholerae-suis</i> 10051	<i>S. typhi</i> 15001	<i>S typhi</i> 15003	<i>Shigella dysenteriae</i> 20001	<i>Shigella dysenteriae</i> 20002	<i>Shigella flexneri</i> 20015	<i>E. coli</i> 055H6 30213	<i>E. coli</i> 35033	<i>E. coli</i> 35034	<i>Klebsiella</i> sp. 52047	<i>Proteus mirabilis</i> 60007	<i>Proteus mirabilis</i> 61369	<i>Yersinia enterocolitica</i> 98001
<i>B.bifidum</i> (B1.2)	+		+	+			+		++	+		+		+
<i>B.bifidum</i> (B5.1)									++	++			++	
<i>B.pseudocatenulatum</i> (B4.1)		+	+	+			+						++	+
<i>B.longum</i> ^T		+											++	+

+gyenge gátlás, ++erős gátlás

^T: típustörzs

A vizsgált bifidobaktériumok közül egyik sem volt képes gátolni a *Shigella dysenteriae*-t és a *Klebsiella pneumoniae*-t. A *B. bifidum* (B1.2) gátolta a *Salmonella derby* 10032, *Salmonella typhi* 15001 és 15003, *Shigella flexneri* 20015, *Escherichia coli* 35033 és 35034, *Proteus mirabilis* 60007 és *Yersinia enterocolitica* 98001 szaporodását. A *B. pseudocatenulatum* (B4.1) törzs gátolta a *Salmonella cholerae-suis* 10051, *Salmonella typhi* 15001 és 15003, *Shigella flexneri* 20015, *Proteus mirabilis* 61369 és *Yersinia enterocolitica* 98001 szaporodását. A *B. bifidum* (B5.1) törzs gátolta az *E. coli* 35033 és 35034 és *Proteus mirabilis* 61369 törzs szaporodását. A *B. longum*^T gátolta a *Proteus mirabilis* 61369 *Salmonella cholerae-suis* 10051 és *Yersinia enterocolitica* 98001 szaporodását. A *Proteus mirabilis* és *Yersinia enterocolitica* törzsek voltak a legérzékenyebbek a bifidobaktériumok jelenlétére. Ezen eredményeket megerősítik GIBSON és WANG [1994a] adatai, melyek szerint a bifidobaktériumok különböző fermentációs rendszerekben (szakaszos fermentáció, kemosztát, szérumső vizsgálat, agarlemezes vizsgálat) gátolták *Clostridium perfringens* és *E. coli*

szaporodását. A bifidobaktériumok gátló hatásának legelfogadottabb oka az általuk termelt ecet- és tejsav pH csökkentő hatása. Az előbbi kutatók azonban pH=7-en pufferolt fermentációban is bizonyították a gátló hatást, emellett diffúziós kemosztátban is, ahol a baktériumsejteket szemi-permeábilis membránnal választották el a fermentlétől. Hasonló eredményeket kaptak BERNET és munkatársai [1993], akik kimutatták, hogy a Caco2 sejtvonalhoz jól tapadó bifidobaktériumok gátló hatással vannak *Salmonella typhimurium*, *E. coli* és *Yersinia pseudotuberculosis* tapadására. LEE és munkatársai [2003] 109 tejsavbaktérium és bifidobaktérium törzset vizsgáltak meg *Clostridium difficile*, *E. coli* O157:H7 és *Staphylococcus aureus* elleni gátló hatásuk szempontjából. Egyetlen törzs sem gátolta az *S. aureus* szaporodását, de négy olyan törzset találtak, amely mind a *C. difficile* mind az *E. coli* O157:H7 ellen hatásosnak bizonyult. FUJIWARA és munkatársai [1997] enterotoxikus *E. coli*-t gátló bifidobaktériumokat kerestek. Kimutatták, hogy egyes bifidobaktériumok gátolják ezen *E. coli*-k tapadását és hogy a tapadást gátló anyag egy fehérjeszerű molekula (100,000 molekulasúllyal és semleges izoelektromos ponttal), ezzel a megállapítással közelebb kerülhetünk a gátlás mechanizmusának megértéséhez.

4.5 Bifidobaktérium törzsek tapadása humán szövettenyészetekhez

A bélsejtekhez való tapadás a probiotikus baktériumok fontos kritériuma, hiszen ezzel biztosítható, hogy ne mosódjanak ki a szervezetből [REID, 1999]. A bélből származó sejtvonalakat széles körben alkalmazzák *in vitro* modellként a probiotikus törzsek tapadási képességének vizsgálatához [FORESTIER *et al.*, 2001; GOPAL *et al.*, 2001].

A *Bifidobacterium* törzsek tapadási képességét vizsgáltam különböző eredetű humán szövettenyészetekhez (HeLa, HT29 és Hep2), melynek eredményeit a **17. táblázat**ban foglaltam össze.

Nem tapasztaltam tapadást a következő törzsek esetében: *B. dentium* (A3.2), *B. bifidum* (B1.2), *B. dentium* (B2.1), *B. dentium* (B2.3), *B. pseudocatenulatum* (B4.1) és *B. longum* (B6.1). A *B. bifidum* (B3.2) törzs erős tapadást mutatott a HeLa szövethez. Szintén ehhez a szövethez közepes mértékű tapadást tapasztaltam a *B. bifidum* (B3.1), gyengét a *B. longum* (A1.2), *B. pseudocatenulatum* (B1.1), *B. longum* (B2.2), *B. longum*^T, *B. bifidum*^T és *B. infantis*^T törzsek esetében.

A HT29 szövettenyészethez való tapadás a következőképpen alakult: erős tapadás a *B. bifidum* (B3.2), gyenge a *B. longum* (A1.2), *B. pseudocatenulatum* (B1.1), *B. bifidum* (B5.1), *B. breve*^T és *B. infantis*^T esetében.

A Hep2 szövethez való tapadás eredményei a következők: erős tapadás a *B. bifidum* (B3.2), közepes mértékű a *B. longum* (A1.2), és gyenge a *B. pseudocatenulatum* (B1.1), *B. bifidum* (B5.1), *B. adolescentis*^T, *B. infantis*^T esetében.

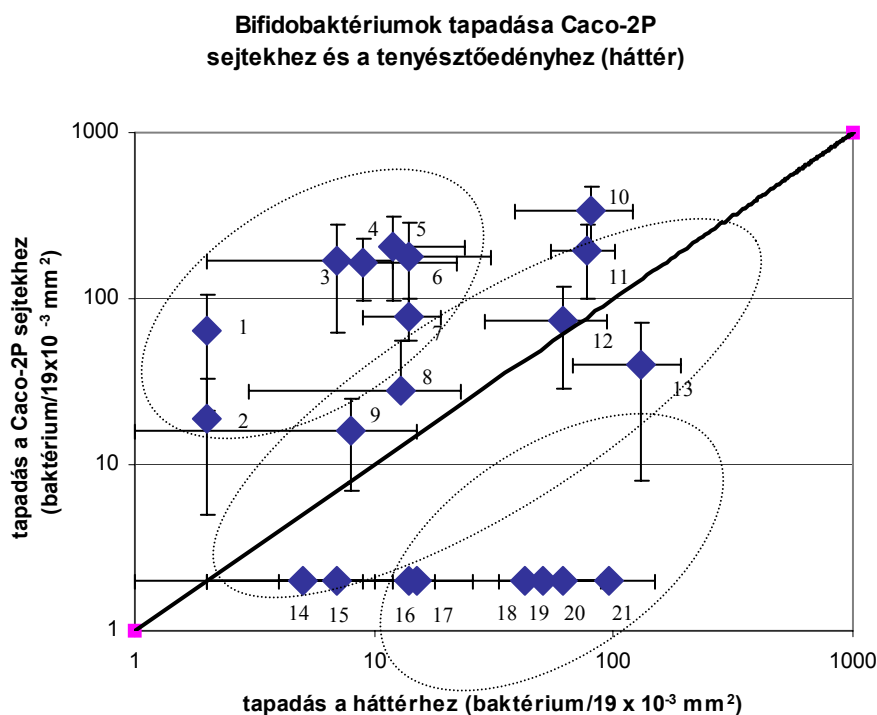
17. táblázat. *Bifidobacterium* törzsek tapadása humán szövettenyészetekhez

<i>Bifidobacterium</i> törzsek	HeLa szövettenyészet	HT29 szövettenyészet	Hep2 szövettenyészet
<i>B. bifidum</i> (B3.2)	+++	+++	+++
<i>B. bifidum</i> (B3.1)	++	-	-
<i>B. bifidum</i> (B5.1)	-	+	+
<i>B. dentium</i> (B2.1)	-	-	-
<i>B. dentium</i> (B2.3)	-	-	-
<i>B. dentium</i> (A3.2)	-	-	-
<i>B. longum</i> (B2.2)	+	-	-
<i>B. longum</i> (B6.1)	-	-	-
<i>B. longum</i> (A1.2)	+	+	++
<i>B. pseudocatenulatum</i> (B 1.1)	+	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> (B 4.1)	-	-	-
<i>B. adolescentis</i> ^T	-	-	+
<i>B. bifidum</i> ^T	+	-	-
<i>B. breve</i> ^T	-	+	-
<i>B. infantis</i> ^T	+	+	+
<i>B. longum</i> ^T	+	-	-

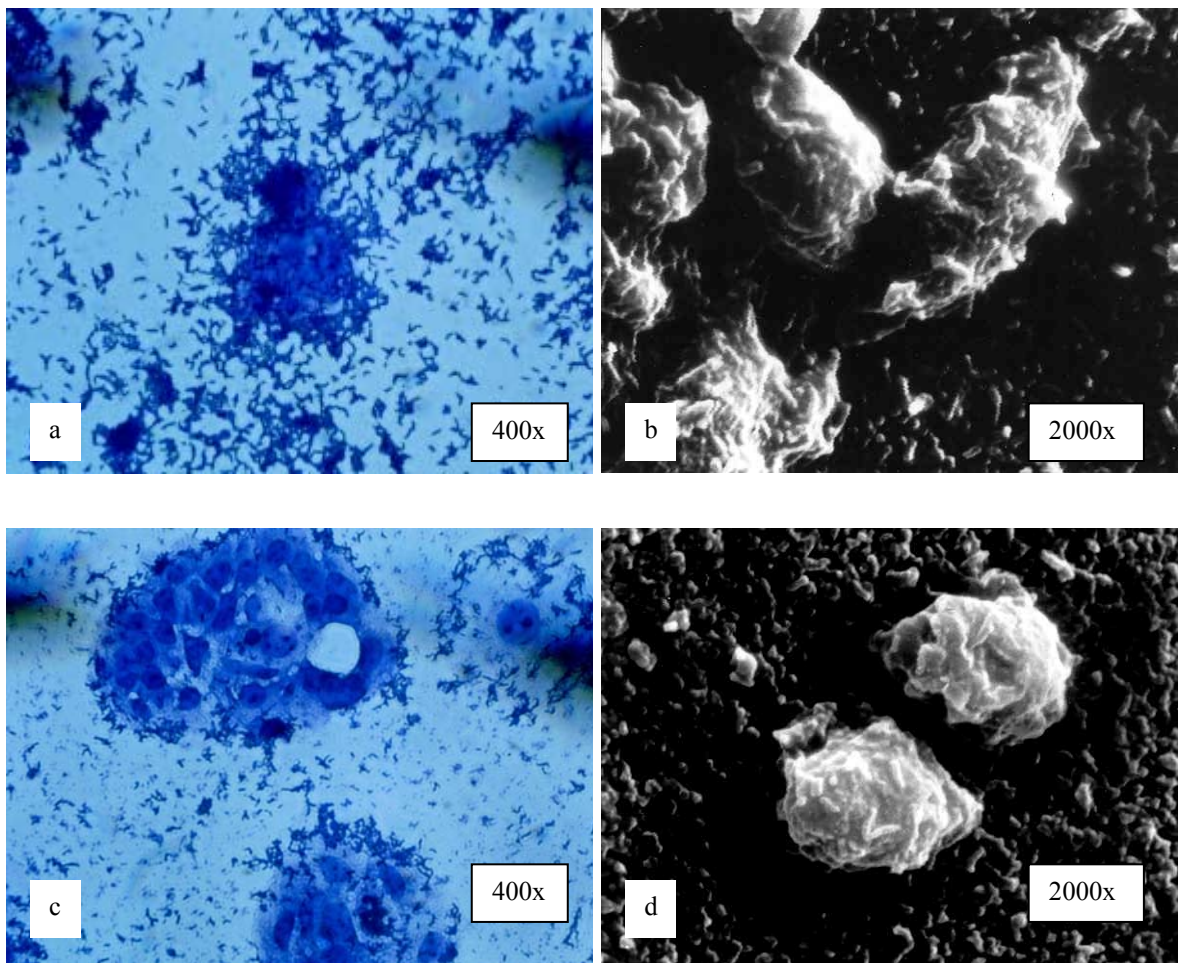
*enyhe tapadás, 2-3 baktérium/sejt, **közepes tapadás, 4-6 baktérium/sejt, ***erős tapadás, több mint 6 baktérium/sejt, - nincs tapadás

Öt típustörzs és 16 izolátum tapadását megvizsgáltam Caco-2P sejtvonalon is. Párhuzamos kísérletben elvégeztem butiráttal kezelt sejteken (differenciált) és üres tenyésztőedényben is a vizsgálatot. A butirátos kezelés nem okozott jelentős változást a tapadásban. Sajnos a legtöbb tapadni képes törzs közel azonos tapadást mutatott az üres tenyésztőedény aljához is, így a tapadást nem mondhatjuk specifikusnak. Az **10.ábra** a Caco-2P sejthez és a háttérhez tapadt baktériumok számát mutatja. A megtapadt baktériumokat néhol igen nehéz volt megszámolni, mert a baktériumsejtek csoportokat alkottak [TOUMOLA és SALMINEN, 1998] és ezért a számolási eredmények közötti szórás nagy lett. A **10.ábrán** a tapadási specifitás szerint három csoportot láthatunk. A törzsek egy csoportja jobban tapadt a sejthez, a másik csoport jobban tapadt a tenyésztőedényhez, a harmadik csoport tapadása a háttérhez és a tenyésztőedényhez

hasznos mértékű volt. A típus törzsek közül a *B. lactis*, *B. animalis* (feltehetően egy faj képviselői) közepes és a *B. bifidum* igen erős tapadást mutatott (11. ábra), míg a *B. longum* és *B. breve* nem voltak képesek tapadni. Erős tapadást egyetlen izolátum a *B. bifidum* (B3.2) mutatott (11. ábra). Középest a *B. bifidum* (B 1.2), *B. bifidum* (B 3.1), *B. bifidum* (B 5.1), törzsek, enyhén *B. bifidum* (B 7.1) a *B. longum* (B 2.2), *B. lactis* (Prodrink), *B. lactis* (Danone), *B. lactis* (Bb-12), törzsek mutattak. Nem volt képes tapadni a *B. longum* (K630), *B. longum* (A 4.9), *B. breve* (B 9.1), *B. breve* (B 10.2), *B. lactis* (KYR), *B. longum* (A 4.4). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a tapadás törzsfüggő tulajdonság, mint azt ahogy korábban más szerzők is leírták [JACOBSEN *et al.*, 1999]. A tapadás mértéket csak néhány kiválasztott Caco-2P sejten néztem, így ez a munka nem hasonlítható össze más azon kísérletekkel ahol a tenyésztőedény minden sejtjén megszámolták a tapadó baktériumokat.



1: *B. longum* K630, 2: *B. breve* B9.1, 3: *B. longum* B2.2, 4: *B. longum* A4.4, 5: *B. bifidum* B3.2, 6: *B. bifidum* B1.2, 7: *B. bifidum* B7.1, 8: *B. longum* B6.1, 9: *B. animalis*^T, 10: *B. bifidum*^T, 11: *B. bifidum* B3.1, 12: *B. lactis* KYR, 13: *B. lactis* Prodrink, 14: *B. longum* A4.6, 15: *B. longum*^T, 16: *B. longum* A4.4, 17: *B. breve*^T, 18: *B. lactis* Bb-12, 19: *B. lactis*^T, 20: *B. breve* B10.2, 21: *B. bifidum* B5.1



11. ábra *B. bifidum*^T (a-b) és *B. bifidum* (B3.2) (c-d) törzs tapadása Caco-2P sejtekhez

Fény és elektronmikroszkópos mikroszkópos felvétel

Számos szerző tanulmányozta bifidobaktériumok adheráló képességét *in vitro* körülmények között. BERNET és munkatársai [1993] 13 *Bifidobacterium* törzs tapadási képességét vizsgálták humán Caco-2 sejtenyészetben. A tapadást pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgálták. A baktériumok a Caco-2 sejtek csúcsi mikrovillusaihoz tapadtak, anélkül, hogy azokat károsították volna. Megállapították, hogy a bifidobaktériumok tapadásához nem szükséges kalcium, találtak azonban egy fehérjeszerű faktort, amely szerepet játszott a tapadásban, ezt a faktort a baktériumsejtben és a sejtenyészet felülúszójában is kimutatták. Ez a tapadási faktor fajspecifikusnak bizonyult.

PEREZ és munkatársai [1998] azt találták, hogy azok a törzsek, melyek agglutinálódó tulajdonsággal rendelkeznek jobban tapadnak a Caco-2 szövettenyészetekhez valamint, hogy a hidrofobicitás szükséges a tapadáshoz. Amikor

az elektrosztatikai töltés negatív a sejt felületén, a sejtek nagyobb mértékben mutatnak autoagglutinációt. Savas pH-n a sejtek könnyebben agglutinálódnak, tehát jobban tapadnak a humán szövethelyzethez.

DEL RE és mtsai [2000] Caco-2, HT29 és KATOIII (emberi gyomorrák) sejteken vizsgálták 13 *B. longum* törzs tapadását és szintén összefüggést találtak a tapadás és az autoaggregációs képesség, valamint a hidrofóbicitás között.

Az életkor jelentősen befolyásolja a probiotikus törzsek tapadását. Idős személyeknél tehát azzal magyarázzák a bifidobaktériumok csökkenő számát, hogy azok kevésbé képesek tapadásra a bél nyálkahártyájához, ezért egy faktor felelős. Kereskedelmi forgalomban starter kultúraként kapható *Bifidobacterium* törzseket vizsgált OUWEHAND és munkatársai [1999] az általuk preparált, különböző életkorú egyedek nyálkahártyáján. Eredményként kapták, hogy időseknél valóban kevésbé tapadnak ezek a törzsek.

A szervezet védekező mechanizmusa a beérkező idegen mikroorganizmus ellen - a gyomorsav, a perisztaltika és vastagbél mikrobiotáján kívül- a mucintermelés. A mucin egy glikoprotein, melyet az emésztőtraktus termel és mely fizikai védőgátként működve hat az invázió és kolonizáció ellen. FONTAINE és munkatársai [1994] hemagglutinációs tesztekkel bizonyították, hogy *B. bifidum* DSM20082 törzs képes a mucinhoz tapadni, így közvetve bizonyítható a bélnyálkahártya sejtekhez való tapadás is.

A fentiekben említett munkákból is látszik, hogy a különböző laboratóriumok, különböző vizsgálati módszerekkel igyekeznek bizonyítani a probiotikus baktériumok tapadási képességét. BLUM és munkatársai [1999] szerint szükség lenne egy standardizált mérési módszerre, mellyel a hatékony tapadás mérhető, így a probiotikus kritérium megállapítható. A FAIR programhoz tartozó PROBDemo projekt keretén belül működő PROBDemo ADHESION WORKSHOP célja volt konszenzus kialakítása a használt *in vitro* körülmények között. Megvizsgálták, milyen hatása van a tapadásra az alkalmazott puffer pH-jának és inkubációs időnek, és annak, hogy a baktérium mely növekedési fázisban van. Eltérő paraméterek között eltérő eredményeket kaptak, (pl. a savas puffer növeli a tapadást, a logaritmusos fázisban lévő baktériumok nem képesek tapadni). Tehát megállapították, hogy nem mindegy, hogy milyen paramétereket állítunk be egy tapadási vizsgálatnál. Bár a Caco-2 sejtvonalon történő *in vitro* vizsgálati módszert alkalmasnak találták a tapadási képesség vizsgálatára, ajánlják

a tapadás mechanizmusának molekuláris tanulmányozását és az *in situ* vizsgálati módszereket.

4.6 Bifidobaktériumok élettani hatása

4.6.1 In vivo állatetetési kísérletek eredményei

4.6.1.1 Egészséges egerek mikrobiotájának változása

A 25 külön nevelt hím egeret 5 csoportra osztottam, és a **18. táblázatban** bemutatott kísérleti tervnek megfelelően takarmányoztam azokat.

18. táblázat Egészséges egerek takarmányozási terve

Csoport	Száraztáp	Túró	Prebiotikum 7% (m/m) Oligotime Szirup	Probiotikum 10 ⁷ sejt/g <i>B. longum</i> szuszpenzió
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	+	+	-	+
5	+	+	+	+

Az egészséges egerekkel végzett etetési kísérlet négy hétig tartott. Ezalatt az egerek bélsár mikrobiotájának összetétele nem változott jelentősen. Tehát a probiotikumként elfogyasztott bifidobaktériumok nem borították fel a bélmikrobiota egyensúlyát. Pozitív változásként értékelhető viszont, hogy a pro- (4. csoport), pre- (3. csoport) és szinbiotikus (5. csoport) táplálékkal etetett egerek székletéből eltűntek a hemolizáló baktériumok. Ezek a baktériumok (pl. *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus*) virulencia markerek, amelyek fakultatív patogén baktériumok jelenlétére utalhatnak. A kísérlet során mind az öt csoport egyedeinek székletéből sikerült bifidobaktériumot izolálnom.

AMANN és munkatársai [1998] hasonló eredményeket kaptak egy humán kísérletben, amikor az önkéntesek 10¹⁰ bifidobaktérium sejtet vettek magukhoz 12 napon át. A vizsgálat időtartama alatt nem változott székletükben a bifidobaktériumok száma és a kilélegzett hidrogén mennyisége, ebből arra következtetett, hogy táplálkozással nehéz befolyásolni a vastagbél mikrobiota összetételét.

BIELECKA és munkatársai [2002] patkányoknál bifidobaktérium (>10⁹ élő sejt *B. longum* és *B. animalis*) és 5 % (w/w) oligofruktóz (Raftilose) táplálék kiegészítéseket alkalmazó 14 napos kísérleteket végeztek és vizsgálták a bélsárminták mikrobiotájának összetételét. Az oligofruktózos etetés 1,6 log tke/g bélsár mennyiséggel növelte a kontrollhoz képest a bifidobaktériumok számát. A *B. longum*-mal való etetés enyhe (0,6 log tke/g) sejtszámnövekedést okozott, míg a *B. animalis*-szal történő etetés nem

eredményezett változást a bifidobaktériumok számában. A szinbiotikus táplálék kiegészítés 1,4 log tke/g bifidobaktérium sejtszámnövekedést eredményezett. A többi vizsgált mikrobacsoportra nem volt hatással a pre-, pro- és szinbiotikummal történő etetés.

4.6.1.2 Antibiotikummal kezelt egerek mikrobiotájának változása

Ennél a vizsgálatnál az egerek bélmikrobiotáját az etetést megelőzően antibiotikus kezeléssel kiöltem. Erre a célra egy antibiotikum keveréket használtam, amely az alábbi összetételű volt:

Penicillin	9,615 NE testtömeg kilogrammra vonatkoztatva
Gentamycin	1,34 µg testtömeg kilogrammra vonatkoztatva
Primycin	0,25 µg testtömeg kilogrammra vonatkoztatva

Az antibiotikus kezelés kezdetétől számított 3. napon a bélsár mintákban baktériumok jelenlétét nem detektáltam és az 5. napon a bélsár uralkodó populációját az élesztők alkották. Ekkor a 12 egeret 4 csoportra osztottam. A 4 hetes etetési kísérletet a **19. táblázat** szerint hajtottam végre.

19. táblázat Antibiotikummal kezelt egerek takarmányozási terve

Csoport	Száraztáp	Túró	Prebiotikum - Oligotime 7% (m/m)	Probiotikum - <i>B. longum</i> 10 ⁷ sejt/g szuszpenzió
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	+
4	+	+	+	+

A vizsgálati periódus első hetének végére bélbaktériumokat csak a szinbiotikus táplálékkal etetett egerek székletében találtam. A második héten a szinbiotikus csoportot kivéve mindegyik csoportnál hemolizáló baktériumok jelentek meg. A harmadik hét végére még mindig jelen voltak a két kontroll csoportban a hemolizáló baktériumok, de a probiotikus csoportnál megjelentek a bélbaktériumok. A négyhetes etetési kísérlet végén megállapítottam, hogy a szinbiotikus élelmiszerrel táplált egerek bélmikrobiotája rekolonizálódott, tehát a szinbiotikummal történő táplálék kiegészítés alkalmasnak bizonyult a bélmikrobiota egészséges egyensúlyának helyreállítására.

4.6.2 *In vitro* modell kísérletek eredményei

A laboratóriumi *in vitro* kísérletekhez probiotikus termékeket állítottam elő és a transzfer idők figyelembe vételével olymódon és sorrendben változtattam a környezeti paramétereket, ahogyan az emésztés folyamán megjelennek.

4.6.2.1 Gyomor szimuláció

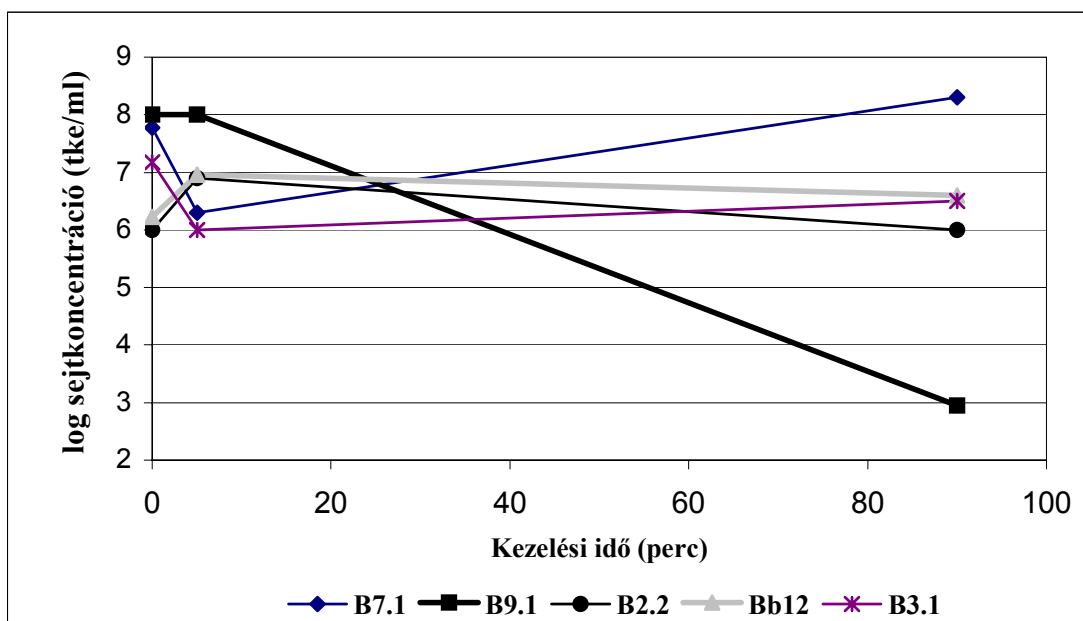
A *B. bifidum* (B7.1) és *B. breve* (B9.1) törzsekkel beoltott tejből készített probiotikus termék sűrű állagú lett. A *B. longum* (B2.2), *B. bifidum* (B3.1), *B. lactis* (Bb-12), *B. longum* (A4.3), *B. longum* (K630) törzsek esetén ivójoghurt típusú termékeket kaptam. A probiotikus joghurt termékek élő csíraszámának legalább 10^6 élő sejtet kell tartalmaznia grammonként, ezért a kezdeti csíraszámok kb. megfelelnek a szavatossági időn belüli joghurtokénak.

A gyomorszimuláción során a probiotikus termékekben az élősejtszámok valamint a kezdeti és a végső pH értékek a következőképpen alakultak (**20. táblázat, 12. ábra**). 4-6 nagyságrendű csökkenés figyelhető meg a *B. bifidum* B3.1 és a *B. breve* B9.1 jelzésű törzsek esetén. A *B. longum* B2.2, a *B. bifidum* B7.1 és a *B. lactis* Bb-12 jelzésű törzseknél a gyomortranzit modellezése után sem csökkent a sejtszám a kiindulási csíraszám alá. Nem véletlen, hogy ezek közt van a starter kultúrából izolált Bb-12 törzs is, de ígéretesnek látszik, hogy két humán eredetű izolátum is megfelelő ellenálló képességet mutatott az kis pH értékkel szemben.

20. táblázat A gyomor szimuláció során a sejtszám és a pH alakulása

Törzs jelzése	Kezdeti sejtkoncentráció (tke/ml)	pH	Savanyítási pH	5. perc sejtkoncentráció (tke/ml)	90. perc Sejtkoncentráció (tke/ml)	pH
B2.2	$1 \cdot 10^6$	4,9	3,0	$8 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	3,0
B3.1	$1,5 \cdot 10^7$	5,4	3,0	$1 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^3$	3,1
B7.1	$6 \cdot 10^7$	4,2	3,0	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^8$	3,3
B9.1	$1 \cdot 10^8$	4	3,0	$1 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^2$	3,0
Bb-12	$1,7 \cdot 10^6$	4,9	3,0	$9 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	3,2

A gyomortranzit alatti túlélést hasonló módszerrel vizsgálták BERRADA és munkatársai [1990]. Két bifidobaktériumot tartalmazó fermentált tejterméket vizsgáltak. A 90 percig tartó pH=3-on való inkubálás után a nagyobb 10^8 sejt/g koncentrációjú terméknel csak 10^7 sejt/g- ra esett vissza, a másik kisebb 10^6 sejt/g koncentrációjú terméknel több nagyságrendű csökkenést tapasztaltak és végső koncentráció 10^2 sejt/g értéknek adódott. Az *in vitro* vizsgálat eredményeit megerősítették *in vivo* humán etetési kísérlettel, ahol hasonló mértékű sejtszámcsökkenést tapasztaltak.



12. ábra *Bifidobacterium* törzsek élősejtszámának alakulása a gyomor szimuláció során

SULTANA és munkatársai [2000] *in vitro* szimulációs kísérletben kimutatták, hogy a probiotikus mikrokapszulázással megvédhetők az emésztőtraktusban uralkodó körülményektől.

4.6.2.2 A szájüregben, a gyomorban és a vékonybélben lejátszódó folyamatok szimulálása

A B2.2, B7.1 és Bb-12 törzsekkel joghurt típusú termékeket készítettem.

21. táblázat Tápcsatorna szimuláció során a sejtszám változása

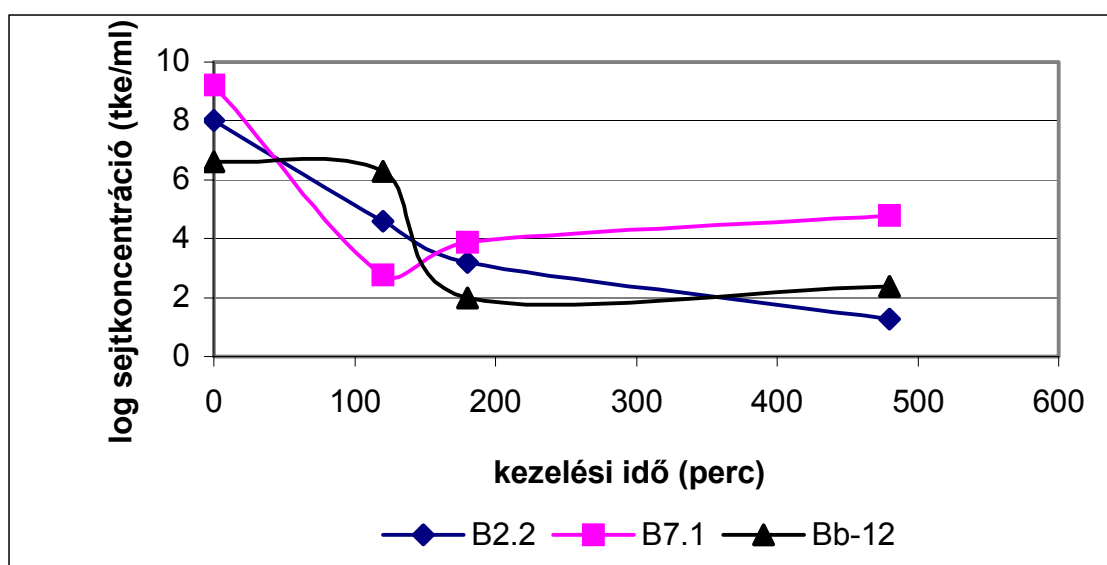
Starter törzs	Sejtkoncentráció (tke/ml)			
	kezdeti	120. perc	180. perc	480. perc
<i>B. longum</i> B2.2	$1 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^1$
<i>B. bifidum</i> B7.1	$1,6 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^2$	$7,3 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^4$
<i>B. lactis</i> Bb-12	$4 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$

In vitro körülmények között modellezve az emésztőcsatorna vastagbélig tartó szakaszát, olyan környezetet (pH, emésztőenzimek, anaerobitás, hőmérséklet) állítottam be, mint amilyen egy egészséges ember emésztőtraktusában előállhat. A vizsgálathoz a gyomor szimulációnál már kedvező eredményeket adó törzseket alkalmaztam. Mindhárom vizsgált törzs túlélte az emésztőtraktusban uralkodó sósav és az emésztőenzimek pusztító hatását (21. és 22. táblázat, 13. ábra). A Bb-12 és a B7.1 törzs

esetén jobb sósav- és epesavtűrés figyelhető meg, a B2.2 jelzésű törzs esetén viszont nagymértékű sejtszámcsökkenés tapasztalható.

22. táblázat A joghurt típusú minták pH változása a szimuláció során

Starter törzs	Termék pH	Nyállal kezdeti pH	40. perc	120. perc	180. perc	270. perc	480. perc
<i>B. longum</i> B2.2	4,28	4,4	1	1,2	0,5	6,6	6,7
<i>B. bifidum</i> B7.1	3,8	3,98	1,3	1,3	1	6,7	6,7
<i>B. lactis</i> Bb-12	5	5,4	1,4	1,3	1,4	6,5	6,65



13. ábra. Bifidobaktériumok túlélési görbéi a tápcsatorna modellezése során

CHARTERIS és munkatársai [1998b] egy *in vitro* módszert fejlesztettek ki potenciálisan probiotikus *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok a felső emésztőtraktus alatti tranzit toleranciájának meghatározására. A vizsgálatban epesavrezisztens törzseket és különböző védőközegek (tejfehérje, gasztrikus mucin) hatásait is tesztelték. A gyomorszakasz paraméterei: pH=2, pepszin (0,3 %), NaCl (0,5 %) a vékonybélszakaszé: pH=8, pankreatin USP (1 g/l), NaCl (5 g/l). A vizsgált törzsek savtűrőképessége és toleranciája a vékonybélnedvre eltérőnek mutatkozott, a stresszhatások ellen a tejfehérje védőhatást nyújtott.

GOPAL és munkatársai [1996] bifidobaktériumok epesav toleranciáját vizsgálva megállapították, hogy a törzsek különböző módon szaporodnak 0,3 % marhaepe jelenlétében.

IBRAHIM és BEZKOROVAINY [1993b]: bifidobaktériumok túlélését epesók jelenlétében vizsgálták. A túlélés mértéke elsődlegesen dóziszfüggő, de a törzsek érzékenysége is meghatározó.

LEE és HEO [2000] a bifidobaktériumok rögzítésével kívánták azok túlélési esélyeit javítani. Matematikai modell segítségével határozták meg azt az optimális alginát koncentrációt, gyöngyméretet és kezdeti csíraszámot, amelynél a legnagyobb mértékben túlélnek a rögzített baktériumok a gyomor- és epesav hatását. Megállapították, hogy az alginát koncentráció növelésével csökken a pusztulás; a kezdeti sejtszám nem befolyásolja a túlélést; a gyöngyméret növekedésével azonban csökken a pusztulás mértéke.

4.6.3 Funkcionális élelmiszer alkotók tesztelésének eredményei bélcsatorna szimulációs rendszerekben

Tekintettel arra, hogy a probiotikumok hatásai a vastagbélben jutnak érvényre, ezért a különböző funkcionális élelmiszerek fogyasztásának hatásait kívántam felbecsülni a TNO által kifejlesztett emésztőrendszert szimuláló berendezésekben.

4.6.3.1 TIM 1 modellben végzett vizsgálatok eredményei

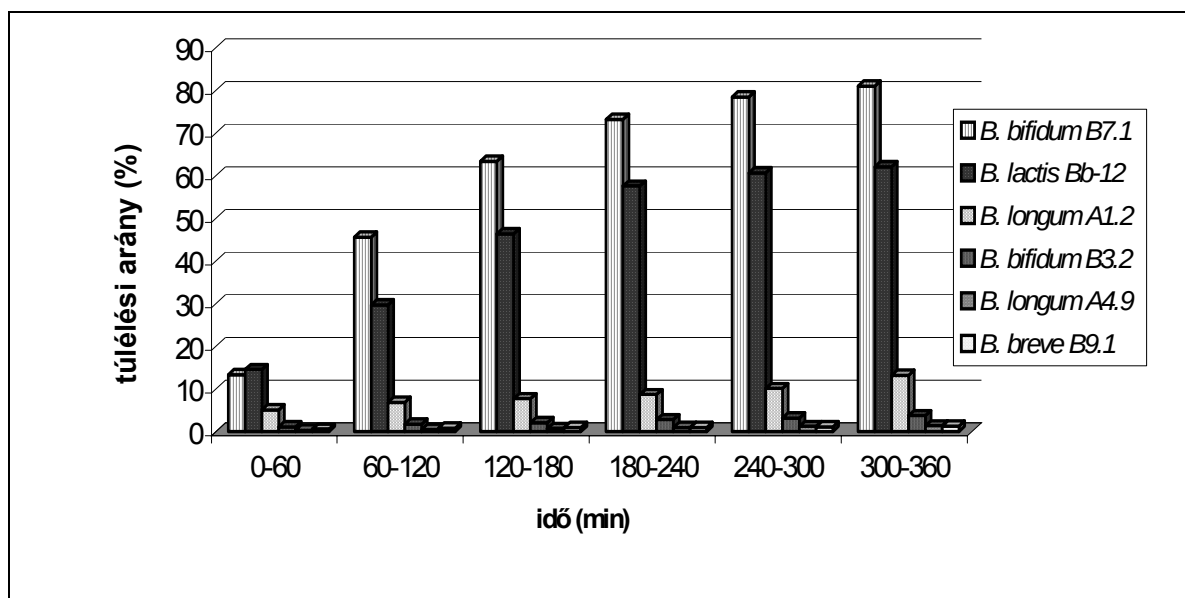
A TIM1 modell rendszer joghurt1.pro programja egy joghurtot fogyasztó egészséges felnőtt ember gyomor-, illetve vékonybélműködését szimulálja és alkalmas a bifidobaktériumok túlélésének vizsgálatára.

Hat *Bifidobacterium* törzs (B7.1, B3.2, A4.9, A1.2., B9.1, Bb-12) túlélését teszteltem. Az első öt törzzsel kétszer a *B. lactis* Bb-12-vel egyszer végeztem el a túlélési kísérletet. Élelmiszer mátrixként pasztörözött joghurtot használtam.

A túlélési kísérlet eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a hat vizsgált törzs közül kettő mutatott figyelemre méltó túlélést (**14. ábra**). A *B. bifidum* B7.1 izolátum 81 %-ban a *B. lactis* Bb-12 62 %-ban élte túl az emésztőrendszer felsőszakaszában uralkodó körülményeket. Pozitív eredményként értékelhető, hogy az egyik saját humán eredetű *B. bifidum* izolátum hasonlóan jó túlélési képességet mutatott, mint az ipari starterként alkalmazott *B. lactis* Bb-12 törzs.

Naponta kb. 2,5 l gyomornedv választódik ki az emberi szervezetben, amelynek pH-ja 2 és a sókoncentrációja 0,5 %. Emellett kb. 0,7 l hasnyálmirigynedv termelődik, amelynek pH-ja 8 és sókoncentrációja 0,5 %. Ezek a testnedvek pH és enzimatis gátat jelentenek a szervezetbe kerülő mikroorganizmusokra nézve. A fermentált tejtermékekben bejutatott bifidobaktériumok, azonban jó túlélőképességet mutatnak, ezt

bizonyította POCHART és munkatársainak [1992] egyik tanulmánya is, ahol a bejuttatott két *Bifidobacterium* törzs 23,5%-ban élte túl az ileum disztális szakaszát.



14. ábra Bifidobaktériumok túlélése a TIM1 modellben

4.6.3.2 Vastagbélstimulációs (TIM2) kísérletek eredményei

A kísérletsorozatban egy prebiotikus oligoszacharidot, négy *Bifidobacterium* izolátumot valamint az utolsó kísérletben ezek együttes hatását vizsgáltam. A modell beállított paraméterei szintén egy egészséges felnőtt ember vastagbélműködését szimulálták. A vizsgálat során követtem a bélmikrobiota összetételét, a rövid szénláncú zsírsavak, a tejsav és az ammónia koncentráció alakulását.

23. táblázat Kísérleti terv

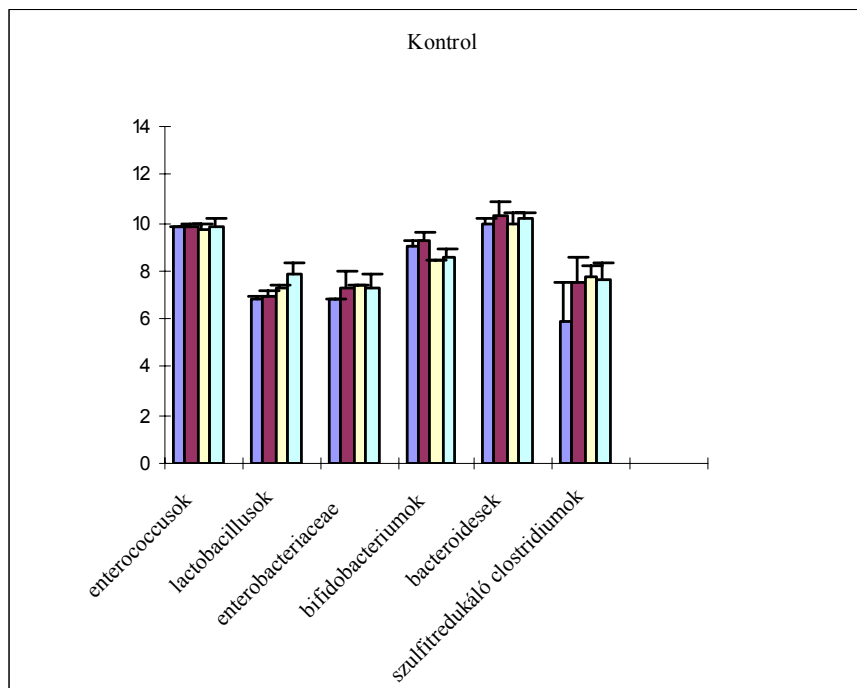
	Kísérlet jele		Prebiotikum 7g/nap	Probiotikum beoltás 10 ⁹ sejttel a 2.napon
1	Kontroll		-	-
2	Prebiotikus		Oligotime szirup	-
3	Probiotikus	<i>B. longum</i> A1.2	-	<i>B. longum</i> A1.2
4		<i>B. bifidum</i> B3.2	-	<i>B. bifidum</i> B3.2
5		<i>B. bifidum</i> B7.1	-	<i>B. bifidum</i> B7.1
6		<i>B. lactis</i> Bb-12	-	<i>B. lactis</i> Bb-12
7	Szinbiotikus		Oligotime szirup	<i>B. bifidum</i> B7.1

4.6.3.2.1 A bélmikrobiota összetétele

88 óra leteltével a kontrollhoz viszonyítva mind a hat kísérlet esetében kisebb volt az enterococcusok száma. (A szinbiotikus és a B7.1-es törzsszel végzett kísérletben a

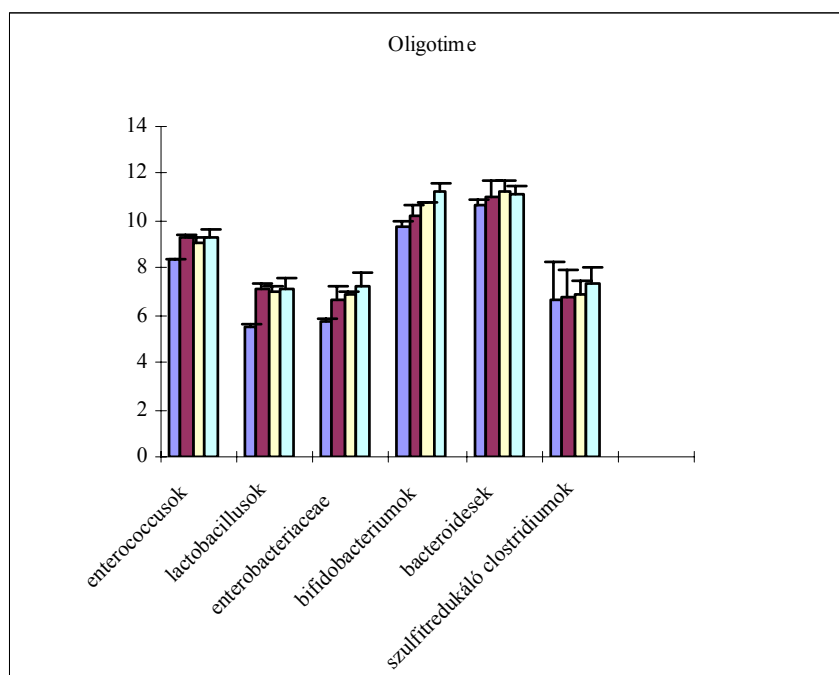
hat közül a legnagyobb mértékben: egy nagyságrendnyivel). A laktobacillusok száma szintén kisebb volt a hat kísérletben, mint a kontrollban. Az enterobacteriaceae-k száma közel azonos volt ill. kis mértékben nagyobb volt a kontrollhoz képest, míg a bakteroidesek nagyobb számban szaporodtak el. A bifidobaktériumok száma mind a hat kísérletben közel azonos volt és a kontrollhoz képest sem mutatott nagy eltérést bár a 40. órában szinte minden esetben megfigyelhetjük számuk megugrását, -ami a 16. órában történt beoltásuknak tudható be- de ez lassan visszaáll a kezdeti értékre. A szulfátredukáló clostridiumok szaporodása a Szinbiotikus, az Oligotime-mal végzett prebiotikus ill. a B7.1 nevű törzzsel végzett kísérletben a kontrollhoz képest kisebb mértékű volt.

Az Oligotime-os prebiotikus kísérletben az idő függvényében a többi kísérlettel ellentétben, -ahol számottevően nem változott- az idő függvényében nőtt a bifidobaktériumok, laktobacillusok, enterobacteriaceae és a bakteroidesek száma, ami azt jelentheti, hogy az Oligotime szirup nemcsak a bifidobaktériumok, hanem az egyéb bélben lévő baktériumok szaporodását is növelte. A szinbiotikus kísérletben ez a növekedés már enyhébb, sőt a laktobacillusok esetében nem is tapasztalható, de a bifidobaktériumok száma növekszik. Tehát a választott prebiotikum támogatta az alkalmazott probiotikus *Bifidobacterium* törzs szaporodását.



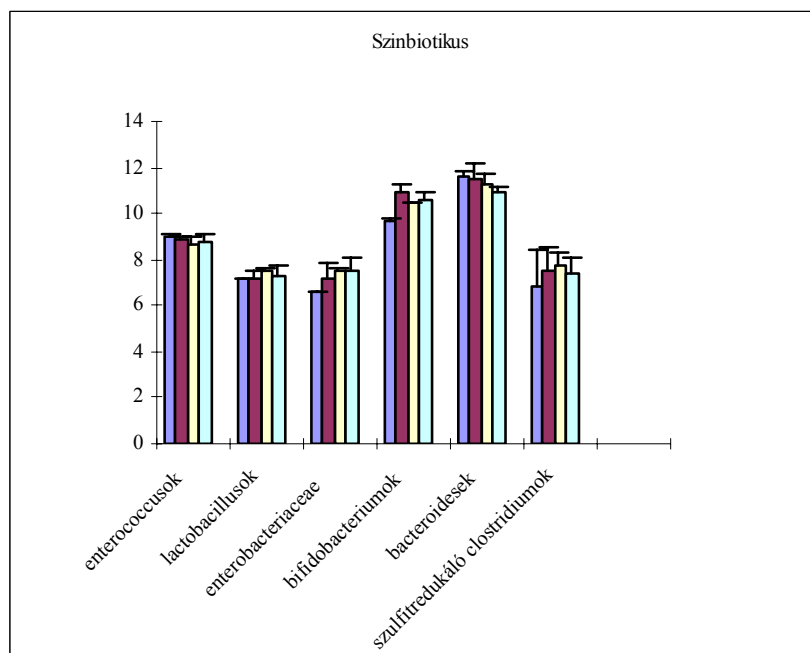
15. ábra Összes sejtkoncentráció meghatározásának illetve szelektív agarokon a jellemző nemzetségek és fajok kimutatásának eredményei a kontroll kísérletben

első oszlop: 16. óra, második oszlop: 40. óra, harmadik oszlop: 64. óra, negyedik oszlop: 88. óra



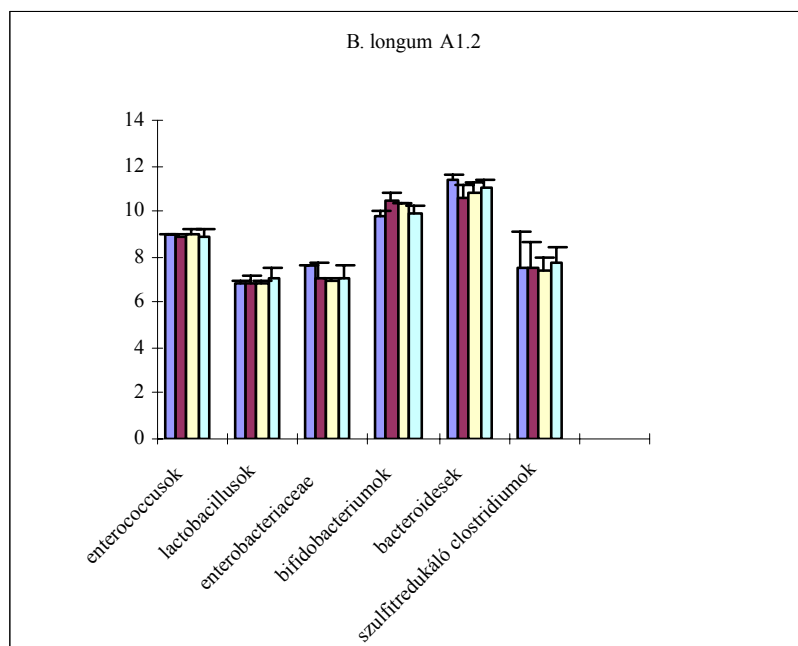
16. ábra Összes sejtkoncentráció meghatározásának illetve szelektív agarokon a jellemző nemzetségek és fajok kimutatásának eredményei az Oligotim-mal végzett kísérletben

első oszlop: 16. óra, második oszlop: 40. óra, harmadik oszlop: 64. óra, negyedik oszlop: 88. óra



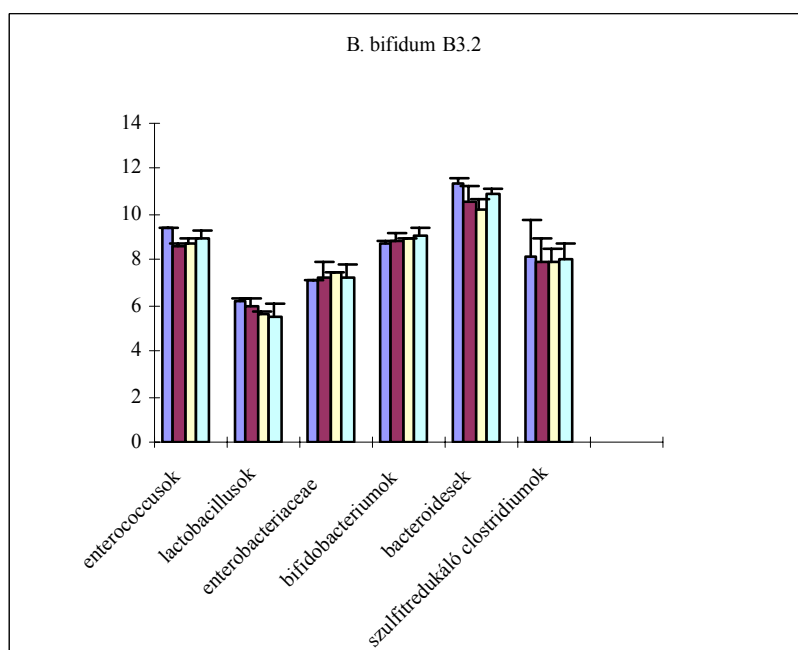
17. ábra Összes sejtkoncentráció meghatározásának illetve szelektív agarokon a jellemző nemzetségek és fajok kimutatásának eredményei a szinbiotikummal végzett kísérletben

első oszlop: 16. óra, második oszlop: 40. óra, harmadik oszlop: 64. óra, negyedik oszlop: 88. óra



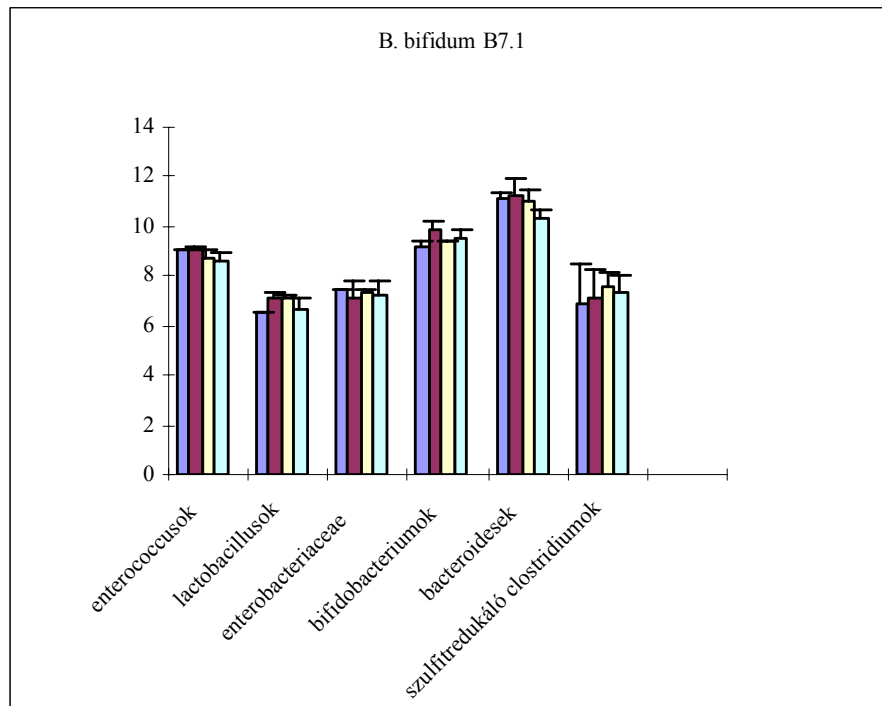
18. ábra Összes sejtkoncentráció meghatározásának illetve szelektív agarokon a jellemző nemzetségek és fajok kimutatásának eredményei az A1.2 jelű törzzsel végzett kísérletben

első oszlop: 16. óra, második oszlop: 40. óra, harmadik oszlop: 64. óra, negyedik oszlop: 88. óra



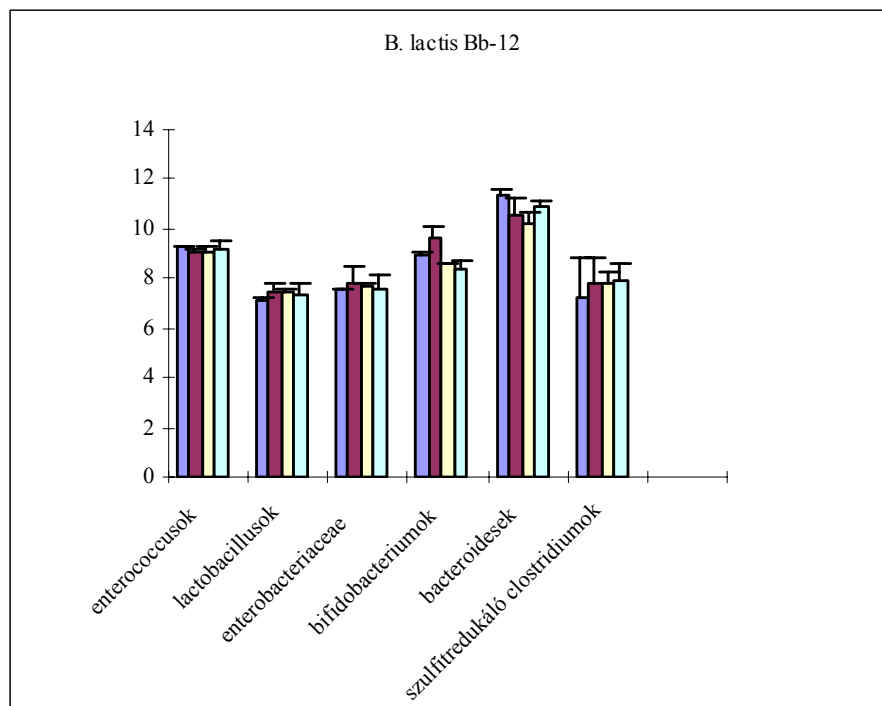
19. ábra Összes sejtkoncentráció meghatározásának illetve szelektív agarokon a jellemző nemzetségek és fajok kimutatásának eredményei a B3.2 jelű törzzsel végzett kísérletben

első oszlop: 16. óra, második oszlop: 40. óra, harmadik oszlop: 64. óra, negyedik oszlop: 88. óra



20. ábra Összes sejtkoncentráció meghatározásának illetve szelektív agarokon a jellemző nemzetségek és fajok kimutatásának eredményei a B7.1 jelű törzzsel végzett kísérletben

első oszlop: 16. óra, második oszlop: 40. óra, harmadik oszlop: 64. óra, negyedik oszlop: 88. óra



21. ábra Összes sejtkoncentráció meghatározásának illetve szelektív agarokon a jellemző nemzetségek és fajok kimutatásának eredményei a Bb12 jelű törzzsel végzett kísérletben

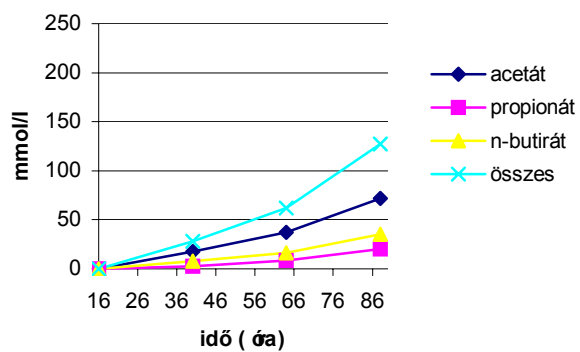
első oszlop: 16. óra, második oszlop: 40. óra, harmadik oszlop: 64. óra, negyedik oszlop: 88. óra

ALANDER és munkatársai [1999] hasonló eredményeket kaptak az általuk alkalmazott modellrendszerben a SHIME-ben (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), ahol öt probiotikus törzset vizsgáltak. A reaktor hat részből áll és mindegyik tartalmazza a rá jellemző mikrobiótát, emésztőnedveket és tápközeget. A rendszer számítógép vezérelt, anaerob, kevertetett és 37°C-ra termosztált. A kiértékelést sejtszámlálással (teljes anaerob, aerob sejtszám; enterococcusok, enterobacteriumok és laktobacillusok) végezték el. A kísérlet eredményeképpen azt kapták, hogy mind az öt probiotikus törzs esetében a bifidobaktériumok, laktobacillusok és enterokokkusok száma nőtt, az enterobaktériumok és klosztridiumok száma csökkent. OGATA és munkatársai [1997] egészséges embereket etettek egy hétig B.longumBB536 nevű probiotikummal. A napi 2×10^{10} élő sejt elfogyasztása változásokat okozott a bélsár mikrobiotájának összetételében. A bifidobaktériumok és laktobacillusok száma nőtt a *C. perfringens*-é és *Enterobacteriaceae* család tagjaié csökkent.

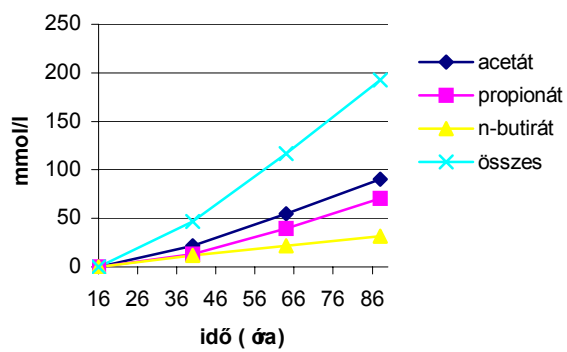
4.6.3.2.2 Rövid-szénláncú zsírsavak szintézise

A rövidszénláncú zsírsavak termelésének eredményei a következők szerint alakultak (**22.ábra**): Az összes termelt rövidszénláncú zsírsavat nézve (acetát+propionát+butirát) mind a hat kísérletben több keletkezett, mint a kontroll kísérletben. Ez pozitív eredmény, hiszen a béllumen pH-jának csökkenése az enteropatogének elszaporodását gátolja. Az acetáttermelés mind a hat kísérletben fokozottabbnak (1,5-3,5 szerez) bizonyult a kontrollhoz képest. Legtöbb a *B. bifidum* B7.1 az Oligotime és a Szinbiotikus kísérletekben volt. A propionáttermelés -a *B. bifidum* 3.2 törzset kivéve, ahol több mint kétszeres volt- kisebb mértékűnek bizonyult, itt kiemelném a prebiotikus kísérletet, ahol harmad akkora volt a propionáttermelés mint a kontroll kísérletben. Mind a hat kísérletben több butirát keletkezett (1,5-3szoros) mint a kontroll kísérletben, itt szintén a *B. bifidum* B.7.1, Oligotime és a Szinbiotikus kísérletekben keletkezett kiemelkedően több (2-3 szoros).

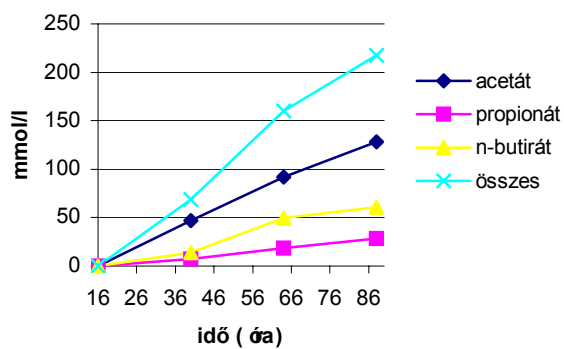
***B.longum* A1.2**



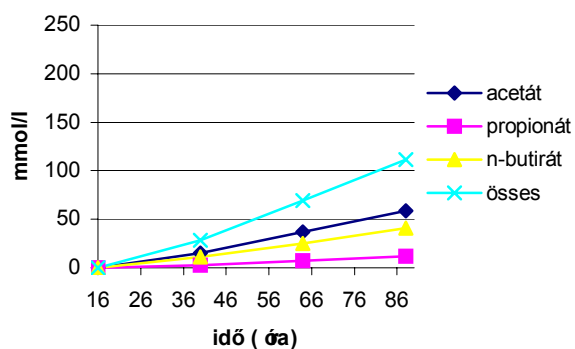
***B.bifidum* B3.2**



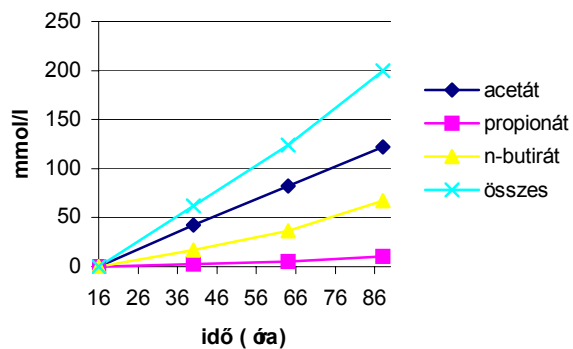
***B.bifidum* B7.1**



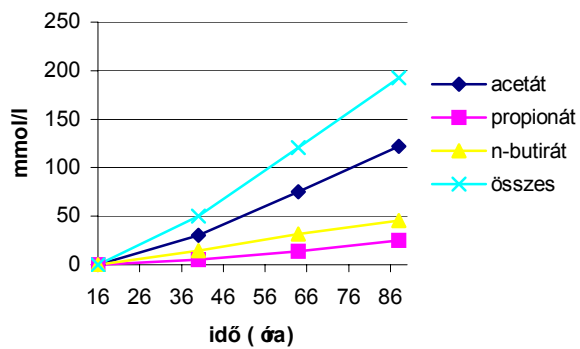
***B. lactis* Bb-12**

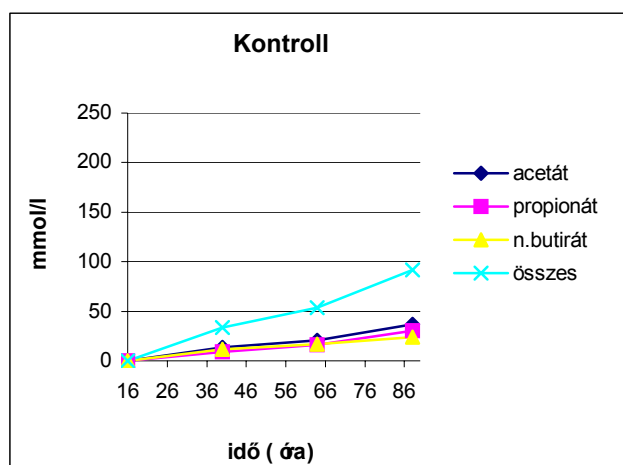


Oligotime



Szinbiotikus





22. ábra Rövidszénláncú zsírsavak termelődése a TIM2-ben

A vastagbélben (caecum és sigmabél szakaszok) a három legfontosabb rövid szénláncú zsírsav fermentációs hozama általában a következő arányban oszlik meg: 60 % acetát, 20 % propionát, 20 % butirát [CUMMINGS és BINGHAM, 1987]. A **24. táblázatban** a 88. órában mért rövid szénláncú zsírsavak koncentrációinak arányát mutatom be összehasonlítva egy irodalmi adattal.

24. táblázat A termelt rövidszénláncú zsírsavak moláris aránya a 88.órában

törzs	Acetát (%)	Propionát (%)	Butirát (%)
<i>B. longum</i> A1.2	56,6	15,9	27,5
<i>B. bifidum</i> B3.2	52,4	10,7	37,0
<i>B. bifidum</i> B7.1	59,0	13,2	27,9
<i>B. lactis</i> Bb-12	46,8	36,5	16,7
Oligotime	61,0	5,2	33,8
Szinbiotikus	64,3	12,1	23,6
Kontroll	52,6	25,0	22,4
ALANDER <i>et al.</i> ,1999	54,75	28,20	17,05

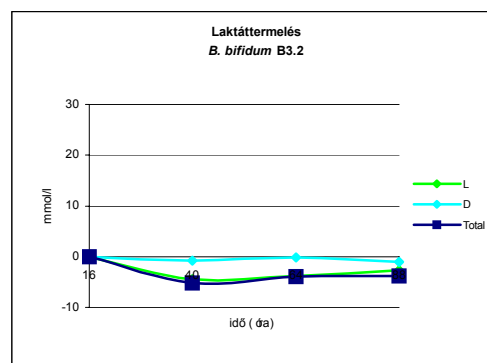
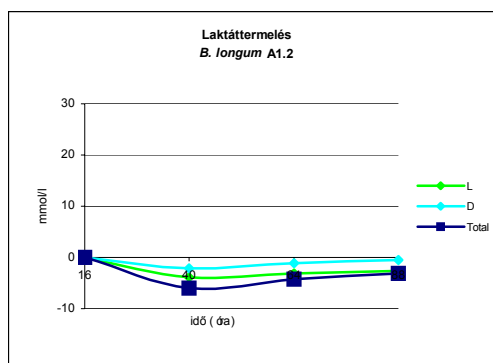
Kiugró eredményeket az Oligotime és a *B. lactis* Bb-12 törzzsel végzett kísérletnél figyelhetünk meg.

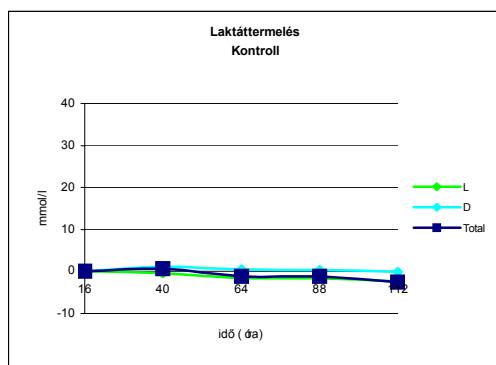
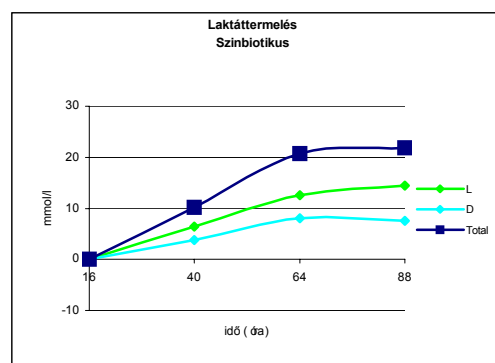
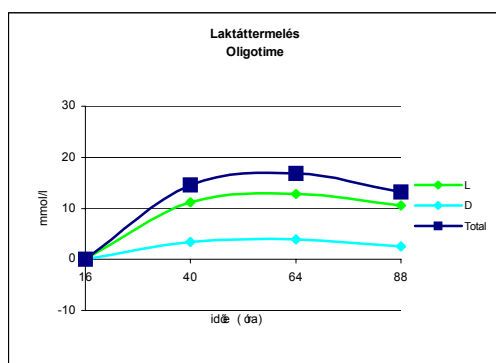
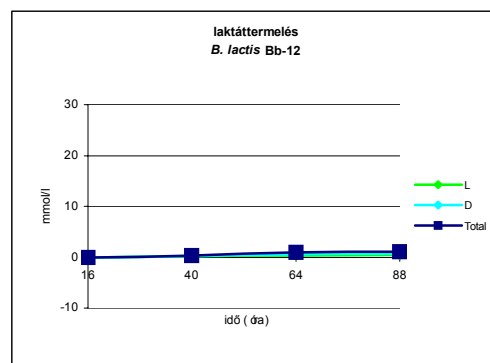
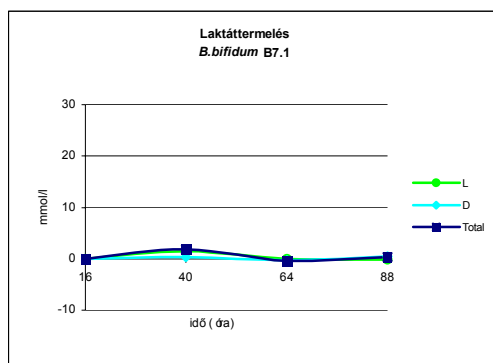
A rövidszénláncú zsírsavak a szénhidrátok anaerob fermentációja során keletkeznek a vastagbélben. Biológiai szerepük széleskörű: befolyásolják a vastagbél mikrobiotáját alkotó baktériumok szaporodását, csökkentik az alkalikus citotoxikus anyagok hasznosulásának lehetőségét, tápanyagforrássul szolgálnak a vastagbél falát alkotó sejtek, a kolonociták számára, továbbá a kolonociták osztódását reverzibilis és irreverzibilis módon gátolják. A butirát tápanyagul szolgál a bélhámsejteknek és jó

osztódási/differenciáló ágens. A butirát CO₂-ra és ketontestekre bomlik. A butirát visszaszorítja a glükózoxidációt és az oxigénfelvétel 80%-áért felelős. Befolyásolja a sejtnövekedést. Meghosszabbítja a rákos sejtek szaporodási idejét és csökkenti a növekedési rátát. Sok sejtenzimre befolyással van. A vírusindukálta sejtdifferenciálódást megfordítja. Fenntartja a normális kolonocita fenotípust, így csökkenti a rosszindulatú sejtek kialakulásának rizikóját. A butiráttermelés tehát nagyon fontos a bél nyálkahártya integritásának fejlesztésében. Emellett elernyeszti a megkeményedett artériákat, így nagyobb lesz a kolon-hepatikus portás vénás véráram. Stimulálja a bél elektrolit transzportját, így nagyobb az ion és folyadék felszívódás és megelőzi a hasmenést. Az acetát növeli a Ca, Mg felszívódást, és szintén elernyeszti a megkeményedett artériákat. A propionát növeli a vastagbél izom összehúzódását-elernyedését, így a székrekedés kiküszöbölésében jelentős. Szintén elernyeszti a megkeményedett artériákat és stimulálja a bél elektrolit transzportját [FLOCH, 1990; SCHEPPACH, 1994 ; SCHEPPACH *et al.*, 1995; SALMINEN *et al.*, 1998].

4.6.3.2.3 L ill. D laktát termelés

A laktáttermelést igen nehéz volt követni, hiszen a modellben lévő komplex mikrobiota nemcsak termeli a laktátot, hanem hasznosítja is. Azonban abban a két kísérletben, amelyben prebiotikummal etettük modellünket (Oligotime, Szinbiotikus), jelentős mértékben megnőtt a laktáttermelés (**22.ábra**). Továbbá nem elhanyagolható az az eredmény sem, hogy ebben a két kísérletben az emberi szervezet számára hasznosítható L-laktát aránya nagyobb volt, mint a D-laktáté.



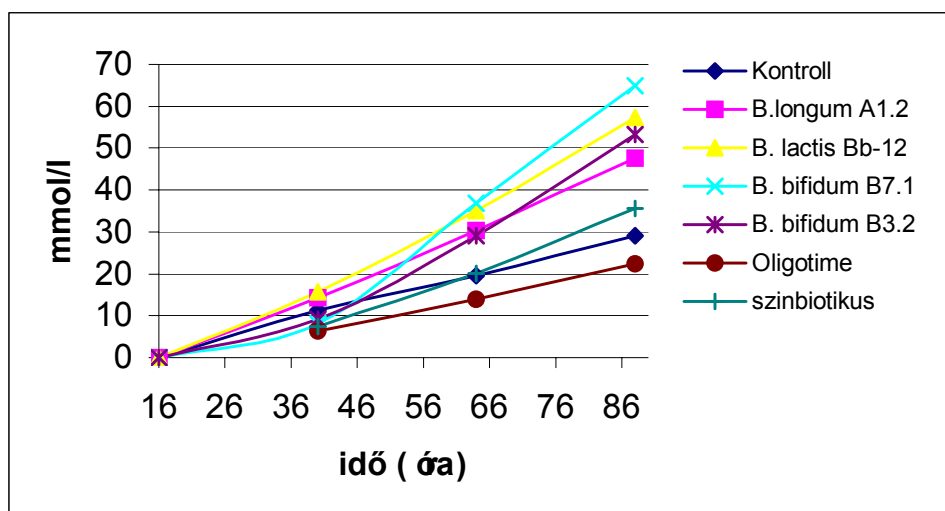


23. ábra Laktáttermelés a TIM2 modellben

4.6.3.2.4 Az ammónia koncentrációjának alakulása

A vastagbélben termelődő ammónia koncentrációjának mérése azért fontos, mert az ammónia hatással van a bélsejtek metabolizmusára és morfológiájára, valamint csökkenti a bélsejtek élettartamát úgy, hogy az egészséges sejtekre toxikusabb, mint a transzformáltakra, így rákkeltő ágensek jelenlétében növeli a genetikai sérülés valószínűségét. Egyes bélbetegségekben szenvedőknél igen nagy ammóniakoncentrációt (több mint 100mM) figyeltek meg.

Az ammóniatermelés mérésének eredményeképpen azt kaptam, hogy a kontrollhoz viszonyítva a probiotikummal való etetés növekedést, a prebiotikummal való etetés csökkenést okozott az ammóniakoncentrációban (24.ábra). Ennek okát szénhidrát- fehérje anyagcsere közötti összefüggésben kereshetjük. A fehérjebontásból származó ammónia egy részét a baktériumok hasznosítják, egy része a májba kerül, ahol ureává alakul, majd a vizeletbe kiválasztódik. Hogy mennyi ammóniát képesek felhasználni a baktériumok attól függ, hogy mennyi energia áll rendelkezésükre. Ez az energia főleg a szénhidrátokból származik, tehát a rendelkezésre álló fermentálható szénhidráttól függ a baktériumok nitrogénszükséglete, azaz ammónia-felhasználása. Az oligoszacharidok tehát mint azt a jelen kísérlet is bizonyítja (a legalacsonyabb ammóniatermelést az Oligotime és Szinbiotikus kísérletekben mértem) elősegítik a baktériumok szaporodását, ezáltal ammónia-felhasználását, így kevesebb kerül a májba ill. vérbe. Mivel a probiotikummal való etetés egyes baktériumcsoportok sejtszámát csökkentette és így kevesebb sejt volt képes anyagcseréjéhez ammóniát felhasználni, növekedett az ammóniatartalom. Célszerű tehát a probiotikumok táplálkozásba való bevitelével egyidejűleg nememészthető szénhidrátok fogyasztása is.



24.ábra Ammóniatermelés a TIM2-ben

A TIM 2 modellnek számos előnye van az *in vivo* állatokon vagy embereken végzett kísérletekkel szemben.

1. A modell számítógép által vezérelt így biztosítható a nagy reprodukálhatóság és az adatok folyamatos regisztrálása.
2. Mind átlagos mind extrém fiziológiai paraméterek beállíthatók

3. A költségek az állatkísérletek költségeinek 50%-át, az emberi kísérletekének 25%-át teszik ki.
4. Nem ütközik etikai akadályba, időt és költségkímélő, hogy nem kell engedélyt beszerezni az Etikai Bizottságoktól. Alkalmazásukkal toxikus, mutagén és radioaktív komponensekkel valamint patogénekkal végzett kísérleteket is végrehajthatunk.
5. Egy új termék kifejlesztésének korai stádiumában is alkalmazható, így rövidíthető a fejlesztési idő.
6. A mintavételt működés közben elvégezhetjük, nem kell leállítani a folyamatot. Egyidőben párhuzamos kísérleteket is végezhetünk.
7. A paramétereket (pH, tranzitidő) egymástól függetlenül változtathatjuk, így külön-külön megvizsgálhatjuk hatásukat [VENEMA *et al.*, 2000].

5 ÖSSZEFOGLALÁS

A funkcionális élelmiszerek piaca rohamosan nő, mára világszerte meghaladja a 33 milliárd USA Dollárt, ebből Európa 2 milliárdot képvisel. A 2 milliárdból 1,35 milliárdot a pro- és prebiotikus termékek tesznek ki, így joggal állíthatjuk, hogy a funkcionális élelmiszerek kutatási területének egyik kulcsszektora a bél egészsége. Az emberi vastagbél mikrobiotája rendkívül összetett. A több mint 500 faj között vannak olyan jótékony bélbaktériumok, melyek a szénhidrát és fehérje anyagcseréjük során különböző rövid láncú zsírsavakat termelnek, ezáltal csökkentik a vastagbél pH-ját kiszorítva a káros N-nitrozó vegyületeket és toxinokat termelő baktériumokat. Ezért igen figyelemreméltó az, hogy hogyan lehet befolyásolni a bélflóra összetételét az étrend megváltoztatásával. A cél az, hogy a bélben lévő bifidobaktériumok és laktobacillusok számát és aktivitását növeljük.

A probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok, melyek jótékonyan hatnak a szervezetre azáltal, hogy fenntartják a bélmikrobiota egészséges egyensúlyát, a prebiotikumok olyan nem emészthető élelmiszerösszetevők, melyek szelektíven támogatják a probiotikumok szaporodását. Ha a pro- és prebiotikumot együttesen alkalmazzuk szinbiotikus terméket állítunk elő. A probiotikus mikroorganizmusokkal szemben támasztott legfontosabb követelmények, hogy humán eredetűek legyenek, túléljék a felső béltraktuson való áthaladást, rövidszénláncú zsírsavakat termeljenek, így csökkentve a pH-t gátolják a patogének elszaporodását, valamint tapadjanak a humán bélhámsejtekhez.

Munkám során olyan humán forrásból történő bifidobaktériumok izolálásával és vizsgálatával kívántam foglalkozni, melyek megfelelnek a probiotikumok kritériumainak és ugyanakkor kiváló technofunkcionális tulajdonságot mutatnak.

Első lépésként módszereket fejlesztettem ki bifidobaktériumok faji szintű azonosítására. Az egyik módszer erjesztési képességen ill. argininbontáson, a másik Fourier Transzformációs Infravörös spektroszkópiás (FT-IR) mérésen alapul. Az erjesztési képességen ill. argininbontáson alapuló faji besorolásnál irodalmi adatok felhasználásával, valamint bifidobaktérium típustörzsek és izolátumok fermentációs tulajdonságait megvizsgálva adatbázist készítettem, melybe 65 referenciatörzs 54 tulajdonságát vettem fel, majd egy olyan szoftvert készítettem mellyel az ismeretlen izolátum azonos 54 tulajdonságának vizsgálati eredményei alapján megkapjuk, hogy az adatbázisban lévő törzsek közül melyikkel azonos ill. melyikhez hasonlít a legjobban és

ennek alapján megtörténhet az ismeretlen *Bifidobacterium* törzsek faji besorolása. A FT-IR spektroszkópiás mérésnél először meghatároztam azt a tápközeg összetételt, amely megfelelő mennyiségű biotmassza előállítását biztosította a vizsgálatok sikeres kivitelezéséhez, majd 99 különböző helyről származó *Bifidobacterium* törzs spektrumait felvéve létrehoztam egy bifidobaktérium spektrumkönyvtárat. A módszer validálása során a módszer jósága a legtöbb faj esetén 100 %-nak bizonyult, csupán a *B. infantis/longum* esetén volt 80 %-os, valamint a *B. pseudocatenulatum* fajhoz sorolható törzsek esetében a heterogenitás miatt bizonytalan a besorolás.

Bifidobacterium törzseket izoláltam humán bélsárból és élelmiszereredetű mintákból, az egyes törzseket molekuláris biológiai módszerrel és a fenti faji azonosítási technikákkal azonosítottam, és a 32 humán valamint 27 élelmiszereredetű *Bifidobacterium* törzsből törzsgyűjteményt hoztam létre. A 32 humán izolátum közül 9 törzs a *B. bifidum*, 6 törzs a *B. breve*, 4 törzs a *B. dentium*, 11 törzs a *B. infantis/longum* fajokhoz tartozik. Két törzs besorolása bizonytalan maradt, ezekről csak annyi nyert bizonyítást, hogy a *B. angulatum* csoportba tartoznak. A 27 élelmiszereredetű izolátum közül kettő a *B. infantis/longum* 25 törzs a *B. lactis/animalis* fajokhoz tartozik.

Megvizsgáltam az egyes törzsek oligoszacharid hasznosító képességét. Az oligoszacharidok közül az oligotime szirupot ítéltam a legmegfelelőbbnek, mivel ez a vizsgált enteropatogén törzsek szaporodását kevésbé támogatta, mint a többi vizsgált oligoszacharid.

Vizsgáltam a bifidobaktériumok és egyes enteropatogén törzsek közötti kölcsönhatást. Vizsgálataim szerint egyes izolátumok antagonista hatást gyakoroltak a vizsgált enteropatogén baktériumokra.

Az bélsejtekhez való tapadás a probiotikus baktériumok fontos kritériuma, hiszen ezzel biztosítható, hogy ne mosódjanak ki a szervezetből. Az egyes *Bifidobacterium* törzsek tapadóképességének meghatározását humán szövettenyészeteken végeztem. Megállapítottam, hogy a tapadási képesség törzsfüggő tulajdonság, és hogy egyes humán izolátumok jobban adherálnak a humán szövettenyészetekhez, mint a típustörzsek ill. az élelmiszereredetű törzsek.

Állattetési kísérleteket végeztem, melyekben egereket pro- pre ill. szinbiotikus élelmiszerrel etettem, és négy hétig vizsgáltam a bélár mikrobiotájának változását. Az első kísérletsorozatban egészséges egereket teszteltem a második kísérletsorozatban olyan egerek vettek részt, melyek mikrobiotáját előzetesen antibiotikummal kiöltem. A pro-, pre- és szinbiotikumok bevitelének hatására az egészséges egerek

bélmikrobiotájának összetételében nem történt jelentős változás, az antibiotikummal kezelt egerek bélmikrobiotájának egészséges egyensúlya helyreállt.

In vitro modellekben megvizsgáltam egyes izolátumok túlélőképességét. A túlélőképesség szintén törzsfüggő tulajdonság, eredményeim alapján ígéretes e téren a *B. bifidum* B7.1 törzs.

A fentiek alapján kiválasztott törzsek probiotikus tulajdonságait olyan *in vitro* modellben bizonyítottam, mely az emberi vastagbél működését szimulálja. A szimulált etetési kísérlet során vizsgáltam a mikrobiota összetételét valamint a rövid szénláncú zsírsavak, laktát és ammónia termelődését. Legjelentősebb eredményt a rövid szénláncú zsírsavak termelésében tapasztaltam. Az összes termelt rövidszénláncú zsírsavat nézve (acetát+propionát+butirát) mind a pro-, pre ill szinbiotikumok hatását tesztelő kísérletekben több keletkezett, mint a kontroll kísérletben. A rövidszénláncú zsírsavak a szénhidrátok anaerob fermentációja során keletkeznek a vastagbélben. Biológiai szerepük széleskörű: befolyásolják a vastagbél mikrobiotáját alkotó baktériumok szaporodását, csökkentik az alkalikus citotoxikus anyagok hasznosulásának lehetőségét, tápanyagforrássul szolgálnak a vastagbél falát alkotó sejtek, a kolonociták számára, továbbá a kolonociták osztódását reverzibilis és irreverzibilis módon gátolják.

Az eredmények hasznosítási és továbbfejlesztési lehetőségei

- A kidolgozott erjesztési tulajdonságokon és Fourier Transzformáció Infravörös spektroszkópiás mérésen alapuló faji besorolási módszerrel humán forrásból és élelmiszerből származó ismeretlen *Bifidobacterium* izolátum azonosítható.
- A Bifidobaktériumok FT-IR spektrumkönyvtárának bővítésével –különböző helyekről izolált törzsek spektrumainak az adatbázisba történő felvételével-az azonosítási módszer jósága növelhető.
- Az izolált probiotikus *Bifidobacterium* törzsekből -a kötelező engedélyek megszerzése után- tömegtenyésztéssel és tartósítással táplálékkiegészítőt, élelmiszeradalékot, vagy probiotikus ill. szinbiotikus élelmiszereket állíthatunk elő.
- Mikrokapszulázással az emésztőtraktusban való áthaladást kevésbé toleráló, de egyébként ígéretes probiotikus tulajdonságokkal (tapadási képesség, antagonist hatás enteropatogénekre, rövid szénláncú zsírsavak fokozott termelése) rendelkező törzsek megvédhetők.

6 SUMMARY

The market of functional foods is continuously growing, now it exceeds 33 billion USD on a world wide scale of which the share of Europe is about 2 billion dollars. Out of the 2 billion USD pre- and probiotic products represent 1.35 billion USD, thus it is safe to say that health of the intestinal tract is a key area within the research field of functional foods. The microbiota of the human colon is very complex. Among the more than 500 species there are such beneficial bacteria that produce different short chain fatty acids during their carbohydrate and protein metabolism, by which the pH of colon decreases and they outplace bacteria that produce toxins and harmful N-nitroso compounds. For this reason it deserves attention that how the change of diet influences the composition of intestinal flora. The goal is to increase the number and the activity of bifidobacteria and lactobacilli in the intestines.

Probiotics are living micro-organisms that exert beneficial effect on the body by keeping the healthy balance of the intestinal microbiota, while prebiotics are non-digestible food components that selectively support the growth of probiotics. If pre- and probiotics are used jointly synbiotic product is made. The most important requirements probiotic micro-organisms must meet are that they have to be of human origin, have to survive the passage through the upper intestinal tract, they should produce short chain fatty acids in order to reduce pH to prevent the growth of pathogens, and they have to adhere well to the intestinal epithelial cells.

In my work I wanted to isolate and study bifidobacteria of human origin that not only comply with the requirements of probiotics, but possess excellent technofunctional properties.

As a first step I elaborated methods for the species level identification. One of the methods is based on the examination of fermentation spectrum and breakdown of arginine, the other one is the application of the Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (FT-IR). In case of the first method I processed the data available in the literature, and I examined the fermentation abilities of isolated and type strains of bifidobacteria, and created a database. The database contains 54 different characteristics of 65 reference strains. Computer software was written that compared the same 54 characteristics of the unknown isolate with that of the strains included in the database, and it classified the unknown *Bifidobacterium* strain into the appropriate species. In case of the FT-IR spectroscopic method first I determined what medium composition

provides the required amount of biomass for the successful execution of the examination. Then I created a spectrum library by taking the spectrum of 99 *Bifidobacterium* strains originating from various places. Validation of the adequacy of the method showed 100% for most of the species except for *B. infantis/longum* it was 80%. Also, in case of *B. pseudocatenulatum* the classification was uncertain due to the heterogeneity of the strains belonging to this species.

I have isolated *Bifidobacterium* strains from human faeces and from food samples and I identified them with molecular biological methods, and with the two above mentioned methods. *Bifidobacterium* strain collection was created containing 32 strains of human origin and 27 strains of food origin. Nine strains out of the 32 isolates proved to be *B. bifidum*, 6 strains were *B. breve*, 4 strains were *B. dentium*, and 11 strains belonged to the *B. infantis/longum* species. Classification of two strains remained uncertain; they were only verified to belong to the *B. angulatum* group. Of the 27 strains of food origin 2 proved to belong to the *B. infantis/longum* species, and 25 to the *B. lactis/animalis* species.

I examined the oligosaccharide utilizing ability of each strain. The oligotime syrup was considered to be the most appropriate of the one, because it supported the growth of enteropathogenic strains to a lesser degree than the other investigated oligosaccharides. I investigated the interaction between bifidobacteria and enteropathogenic strains. According to my examinations certain isolates exert antagonistic effect on the investigated enteropathogenic bacteria.

One important criterion of probiotic strains is the adherence to the intestinal cells, because it ensures that they will not be washed out of the body. Determination of the adhering ability of the *Bifidobacterium* strains was performed on human cell cultures. I found that the adhering ability is a strain dependent characteristic and certain isolates of human origin adhered better to the human cell cultures than the type strains or the strains of food origin.

Animal feeding experiments were performed in which mice were fed with probiotic, prebiotic and synbiotic food, and change of the microbiota of faeces was followed for four weeks. In the first set of experiments healthy mice were tested, while in the second one mice whose microbiota was previously eliminated by antibiotics. Due to the feeding with probiotic, prebiotic and synbiotic foods composition of the intestinal flora of healthy mice did not change, but the healthy balance of the microbiota of antibiotic treated mice was recovered.

I investigated the surviving ability of some isolates in *in vitro* models. The surviving ability is a strain dependent characteristic, as well, and according to my results the *B. bifidum* B7.1 strain is very promising in this aspect.

The probiotic characteristics of the previously selected strains were verified in an *in vitro* model that simulates the functioning of the human colon. In the course of the simulated feeding experiment I examined the composition of the microbiota, and the synthesis of the short chain fatty acids (SCFA), lactate and ammonia. Most important result was experienced in the synthesis of short chain fatty acids. Considering all the produced SCFA (acetate + propionate + butyrate), more of them were synthesised during the investigation of the effect of prebiotics, probiotics and symbiotics than in the control experiments. Short chain fatty acids are synthesised in the anaerobic fermentation of carbohydrates in the colon. Their biological role is extensive: they influence the growth of bacteria that compose the microbiota of the colon; they decrease the possibility of the utilization of alkaline cytotoxic compounds; they serve as nutrient for the cells of the colon wall, the colonocytes, and they reversibly and irreversibly prevent the division of colonocytes.

Application of results and the possibility of further development

- It will be possible to identify unknown *Bifidobacterium* isolates of human and food origin with the elaborated classification methods based on fermentation abilities and the Fourier Transformation Infrared Spectroscopic measurement.
- It will be possible to improve the adequacy of identification by completing the database with the FT-IR spectrum of *Bifidobacteria* of different origin.
- It will be possible to produce dietary supplements, food additives, probiotic or symbiotic foods once the mass production and preservation of the isolated *Bifidobacterium* strains is elaborated, and the necessary authorizations are received.
- By micro-encapsulation it will be possible to protect those strains during the passage in the intestinal tract that do not tolerate it, but possess promising probiotic characteristics, i.e. adherence, antagonistic effect to enteropathogens and increased production of short chain fatty acids.

7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Módszert fejlesztettem ki a bifidobaktériumok faji besorolására erjesztési képesség ill. argininbontás alapján. Irodalmi adatok felhasználásával, valamint *Bifidobacterium* típustörzsek és izolátumok fermentációs tulajdonságait megvizsgálva adatbázist készítettem, melybe 65 referenciatörzs 54 tulajdonságát vettem fel. Az eredményeket felhasználva szoftvert készítettem, mellyel az ismeretlen izolátum azonos 54 tulajdonságának vizsgálati eredményei alapján megkapjuk, hogy az adatbázisban lévő törzsek közül melyikkel azonos ill. melyikhez hasonlít a legjobban, és ennek alapján megtörténhet az ismeretlen *Bifidobacterium* törzsek faji besorolása.
2. Eljárást dolgoztam ki bifidobaktériumok faji besorolására Fourier Transzformációs Infravörös (FT-IR) spektroszkópia alkalmazásával. Ezen belül meghatároztam azt a tápközeg összetételt, amely megfelelő mennyiségű biomassza előállítását biztosíthatta a vizsgálatok sikeres kivitelezéséhez. Az FT-IR spektroszkópiai módszer alkalmazásával 99 különböző helyről származó *Bifidobacterium* törzs spektrumait felvéve létrehoztam egy bifidobaktérium spektrumkönyvtárat. A módszer validálása során a módszer jósága a legtöbb faj esetén 100%-nak bizonyult és csupán a *B.infantis/longum* esetén volt 80%-os. A *B.pseudocatenulatum* fajhoz sorolható törzsek esetében a heterogenitás miatt bizonytalan maradt a besorolás.
3. *Bifidobacterium* törzseket izoláltam humán bélsárból és élelmiszereredetű mintákból. Az egyes törzseket molekuláris biológiai módszerrel és a fenti faji besorolási technikákkal azonosítottam, és a 32 humán valamint 27 élelmiszereredetű *Bifidobacterium* törzsből törzsgyűjteményt hoztam létre. A 32 humán izolátum közül 9 törzs a *B. bifidum*, 6 törzs a *B. breve*, 4 törzs a *B. dentium*, 11 törzs a *B. infantis/longum* fajokhoz tartozik. Két törzs besorolása bizonytalan maradt, ezekről csak annyi nyert bizonyítást, hogy a *B. angulatum* csoportba tartoznak. A 27 élelmiszereredetű izolátum közül kettő a *B. infantis/longum* 25 törzs a *B. lactis/animalis* fajokhoz tartozik.
4. Meghatároztam az egyes törzsek oligoszacharid hasznosító képességét, antagonistá hatásukat enteropatogénekre, szöveti adherenciájukat humán szövettenyészeteken valamint túlélő képességüket az emésztő rendszert modellező *in vitro* kísérletekben. Az oligoszacharidok közül az oligotime szirupot ítéltam a legmegfelelőbbnek, mivel ez a vizsgált enteropatogén törzsek szaporodását kevésbé támogatta, mint a többi vizsgált oligoszacharid. Vizsgálataim szerint egyes izolátumok antagonistá hatást

gyakoroltak a vizsgált enteropatogén baktériumokra. Megállapítottam, hogy egyes humán izolátumok jobban adherálnak a humán szövettenyészetekhez, mint a típustörzsek ill. az élelmiszereredetű törzsek. A túlélőképesség szintén törzsfüggő tulajdonság, eredményeim alapján ígéretes e téren a *B. bifidum* B7.1 törzs.

5. A B7.1, B3.2, A1.2 törzsek probiotikus tulajdonságait olyan *in vitro* modelleiben bizonyítottam, mely az emberi vastagbél működését szimulálja. A szimulált etetési kísérlet során vizsgáltam a mikrobiota összetételét valamint a rövid szénláncú zsírsavak, laktát és ammónia termelődését. Legjelentősebb eredményt a rövid szénláncú zsírsavak termelésében tapasztaltam.

8 FELHASZNÁLT IRODALOM

- AKIYAMA, H.-ENDO, T.-NAKAKITA, R.-MURATA, K.-YONEMOTO, Y.-OKAYAMA, K. (1992): Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria. *Biosci.Biotech.Biochem.***56**:355-356
- ALANDER, M.- De SMET, I.-NOLLET, L.-VERSTRAETE, W.- von WRIGHT, A.-MATTILA-SANDHOLM, T. (1999): The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *International Journal of Food Microbiology* **46**:71-79.
- AMANN, M.M.-KULLEN, J.-MARTINI, M.C.-BUSTA, F.F.-BRADY, L.J. (1998): Consumption of exogenous bifidobacteria does not alter fecal bifidobacteria and breath hydrogen excretion in humans. *J. Nutr.* **128**:996-1002
- ANDALOUSSI, S.A.-TALBAOUI, H.- MARCZAK, R.-BONALY, R. (1995): Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **43**:995-1000
- ARUNACHALAM, K.D. (1999): Role of Bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research* **19**:1559-1597
- BAHAKA, D.-NEUT, C.-KHATTABI, A.-MONGET, D.-GAVINI, F. (1993): Phenotypic and genomic analysis of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve* *Int.J.System.Bacteriol* **43**:565-573
- BARCENILLA, A.-PRYDE, S.E.-MARTIN, J.C.-DUNCAN, S.H.-STEWART, C. S.-HENDERSON, C.-FLINT, H.J. (2000): Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **66**:1654-1661
- BEATTIE, S.H.- HOLT, C.- HIRST, D. – WILLIAMS, A.G. (1998): Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**:201-206.
- BEERENS, H. (1990): An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* sp. *Letters in Applied Microbiology* **11**:155-157
- BENNO, Y.-ENDO, K.-MIZUTANI, T.-NAMBA, Y.-KOMORI, T.-MITSUOKA, T. (1989): Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl Environ Microbiol* **55**(5):1100-1105
- BERNET, F.M.-BRASSART, D.-NEESER, J.R.-SERVIN, A.L. (1993): Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogens-cell interaction. *Appl Environ Microbiol* **59**:4124-4128
- BERRADA, N.-LEMELAND, J.F.-LAROCHE, G.-THOUVENOT, P.-PIAIA, M. (1990): *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J.Dairy Sci.* **74**:409-413
- BEZKOROVAINY, A. (2001): Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl):399S-405S
- BIACS, P. (2000): Inulin és oligofruktóz a táplálkozásban Élelmezési Ipar LIV. Évf. **11** szám: 350-351
- BIAVATI, B.-MATTARELLI, P. (1991): *Bifidobacterium ruminatum* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *Int.J.Syst.Bacteriol.***41**:163-168
- BIAVATI, B.-MATTARELLI, P. -CROCIANI, F. (1992): Identification of bifidobacteria from fermented milk products. *Microbiologica.* **15**:7-13
- BIAVATI, B.-MATTARELLI, P.-CROCIANI, F. (1991b): *Bifidobacterium saeculare*: a new species isolated from feces of rabbit. *System.Appl.Microbiol.* **14**:389-392
- BIAVATI, B.-SCARDOVI, V.-MOORE, W.E.C. (1982): Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int.J.System.Bacteriol.***32**:358-373
- BIAVATI, B.-SGORBATI, B.-SCARDOVI, V. (1991a): The Genus *Bifidobacterium*. In Balows A., Truper G., Dworkin M., Harder, W., Schleifer K.H., eds, *The Prokaryotes*, 2nd edn, Springer-Verlag, New York pp.816-833
- BIAVATI, B.-VESCOVO, M.-TORRIANI, S.-BOTTAZZI, V. (2000): Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann Microbiol* **50**:117-131
- BIELECKA, M.-BIEDRZYCKA, E.-MAJKOWSKA, A. (2002): Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation in vivo effectiveness. *Food Research International* **35**:125-131
- BLANCHETTE, L.-ROY, D.-BELANGER, G.-GAUTHIER, F. (1995a): Production of Cottage Cheese Using Dressing Fermented by Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.***79**:8-15
- BLANCHETTE, L.-ROY, D.-BELANGER, G.-GAUTHIER, F. (1995b): Production of cultured cottage cheese dressing by bifidobacteria. *J. Dairy Sci.***78**:421-429
- BLUM, S.-RENIERO, R.-SCHIFFIRIN, E.J.-CRITTENDEN, R.-MATTILA-SANDHOLM, T.-OUWAHAND, A.C.-SALMINEN, S.-VON-WRIGHT, A.-SAARELA, M.-SAXELIN, M.-COLLINS, K.-

- MORELLI, L. (1999): Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science and Technology* **10**:405-410
- BONAPARTE, C. (1997). Selective Isolation and Taxonomic Position of *Bifidobacteria* Isolated from Commercial Fermented Dairy Products in Central Europe. Dissertation. Technical University Berlin 199p
- BOUHNİK, Y.-FLORIE, B.-D'AGAY-ABENSOUR, L.-POCHART, P.-GRAMET, G.-DURAND, M.-RAMBAUD, J.-C. (1997): Administration of Transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in health humans. *The Journal of Nutrition* **127**:444-448.
- BOUHNİK, Y.-VAHEDI, K.-ACHOUR, L.-ATTAR, A.-SALFATI, J.-POCHART, P.-MARTEAU, P.-FLOURIE, B.-BORNET, F.-RAMBAUD, J.C (1998): Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increase fecal bifidobacteria in healthy humans. *J. Nutr.* **129**:113-116
- BRIGIDI, P.-VITALI, B.-SWENNEN, E.-ALTOMARE, L.-ROSSI, M.-MATTEUZZI (2000): Specific detection of *Bifidobacterium* strains in a pharmaceutical probiotic product and in human feces by polymerase chain reaction. *System. Appl. Microbiol.* **23**:391-399
- BROWN, I.L.-WANG, X.-TOPPING, D.L.-PLAYNE, M.J.-CONWAY, P.L. (1998): High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. *Food Australia* **50**:603-609
- BUDDINGTON, R.K.-WILLAMS, C.H.-CHEN, S.C.-WITHERLY, S.A (1996): Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *Am J. Clin. Nutr.* **63**:709-716
- CAI, Y.M. - MATSUMOTO, M. -Y. BENNO. (2000): *Bifidobacterium lactis* Meile et al 1997 is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka 1969) Scardovi and Trovatelli 1974. *Microbiology and Immunology* **44**:815-820
- CASHMAN, K.D. (2002): Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Brit J Nutr Suppl.* **87**: S169-177
- CATALA, I.-BUTEL, M.J.-BENSAADA, M.-POPOT, F.-TESSEDRE, A.C.-RIMBAULT, A.-SZYLIT, O. (1999): Oligofructose contributes to the protective role of bifidobacteria in experimental necrotising enterocolitis in quails. *J. Med. Microbiol* **48**:89-94
- CHARTERIS, W.P.-KELLY, P.M.-MORELLI, L.-COLLINS, J.K. (1997): Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations, *International Journal of Food Microbiology* **35**:1-27
- CHARTERIS, W.-P., KELLY, P.-M., MORELLI, L., COLLINS, J.-K. (1998a): Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods, *International Journal of Dairy Technology*, **51**:123-135.
- CHARTERIS, W.-P., KELLY, P.-M., MORELLI, L., COLLINS, J.-K. (1998b): Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol* **84**:759-768
- CHARTERIS, W.-P., KELLY, P.-M., MORELLI, L., COLLINS, J.-K. (1998c): Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Lett Appl Microbiol* **26**:333-337
- CHEVALIER, P.-ROY, D.-WARD, P. (1990): Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Bacteriol* **68**:619-624
- CLAYTON, R.A.-SUTTON, G.-HINKLE, P.S.-BULT, C.-FIELDS, C. (1995): Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. j. Syst. Bacteriol.* **45**:595-599
- COLLINS, E.B.-HALL, B.J. (1983): Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. *J. dairy Sci* **67**:1376-1380
- CRITTENDEN, R.G.-PLAYNE, M.J. (1996): Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Sci and Technol* **7**:353-361
- CRITTENDEN, R.-LAITILA, A.-FORSSELL, P.-MÄTTÖ, J.-SAARELA, M.-MATTILA-SANDHOLM, T.-MYLLÄRINEN, P. (2001): Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Appl Environ Microbiol* **67** (8):3469-3475
- CROCIANI, F.-BIAVATI, B.-ALESSANDRIN, A.-CHIARINI, C.-SCARDOVI, V. (1996): *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., Two new species isolated from human dental caries. *Int. j. system. Bacteriol.* **46**:564-571
- CROCIANI, F.-ALESSANDRIN, A.-MUCCI, M.M.-BIAVATI, B. (1994): Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp, *Int. J. Food Microbiolgy*, **24**:199-211
- CUMMINGS, J.H.-BEATTY, E.R.-KINGMAN, S.M.-BINGHAM, S.A.-ENGLYST, H.N. (1996): Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *British Journal of Nutrition* **75**:733-747

- CUMMINGS, J.H.- BINGHAM, S.A. (1987): Dietary fibre, fermentation and large bowel cancer. *Cancer Surveys* Vol.6.No.4:601-621
- CUMMINGS, J.H.-MACFARLENE, G.T. (2002): Gastrointestinal effects of prebiotics. *Brit J Nutr Suppl.* **87**:S145-S151
- CUMMINGS, J.H.- MACFARLENE, G.T.- ENGLYST, H.N. (2001): Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl):415S-420S
- CURK, M.C.- PELADAN, F. – HUBERT, J.C. (1994): Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species, *FEMS Microbiol. Lett.* **123**:241-248.
- DAIGLE, A.-ROY, D.-BELANGER, G.-VUILLEMARD, J.C. (1999): Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *J.Dairy Sci.* **82**:1081-1091
- DAVE, R.I.-SHAH, N.P. (1997): Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy Journal* **7**:31-41
- DAVIDE, C.L. (1995): Probiotic and value-added dairy products for health and sickness. *The Philippine Agriculturist* **78**:31-42
- DE VRESE, M.-SCHREZENMEIR, J. (1998): Pro- und Präbiotika stand der Diskussion, *Ernährungs Umschau* (**45**), Sonderheft:79-89.
- DE VRESE, M.-STEGELMANN, A.-RICHTER, B.-FENSELAU, S.-LAUE, C.-SCHREZENMEIR, J. (2001): Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl):421S-429S
- DECHTER, T.H.-HOOVER, D.G. (1998): Survivability and β -galactosidase activity of bifidobacteria stored at low temperatures. *Food biotechnology* **12**:73-89
- DEGUCHI, Y.-MORISHITA, T.-MUTAI, M. (1985): Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of Bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem* **49**(1):13-19
- DEL-RE, B.-SGORBATI, B.-MIGLIOLI, M.-PALENZONA, D. (2000): Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl. Microbiol* **31**:438-442
- DELZENNE, N.M.-KOK, N. (2001): Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl):456S-458S
- DESJARDINS, M.L.-ROY, D.-GOULET, J. (1990): Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J.Dairy Sci.* **73**:299-307
- DINAKAR, P.-MISTRY, V.V (1994): Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **77**:2854-2864
- DJOUZI, Z. –ANDRIEUX, C.-PELEC, V.-SOMARRIBA, S.-POPOT, F.-PAUL, F.-MONSAN, P.-SZYLIT, O. (1995): Degradation and fermentation of α -gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: in vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats. *Journal of Applied Bacteriology* **79**:117-127
- DOLEYRES, Y. – PAQUIN, C. – LEROY, M. – LACROIX, C.(2002): *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free-and immobilized – cell cultures in MRS- whey permeate medium *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 168-173
- DONG, X.-XIN, Y.-JIAN, W.-LIU, X.-LING, D. (2000): *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**:119-125
- DUNNE, C.-O'MAHONY, L.-MURPHY, L.-THORNTON, G.-MORRISSEY, D.-O'HALLORAN, S.-FEENEY, M.-FLYNN, S.-FITZGERALD, G.-DALY, C.-KIELY, B.-O'SULLIVAN, G.C.-SHANAHAN, F.-COLLINS, J.K. (2001): In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl):386S-392S
- EL-SODA, M. (1992): The peptide hydrolase system of *Bifidobacterium* species. *Milchwissenschaft* **47**:87-90
- FACIUS, D.- FARTMANN, B. - HUBER, J. – NIKOLEIT, K.- SCHONDELMAIER, J. (1999): Sequencing Brochure. Instructions for DNA template preparation, primer design and sequencing with the LI-COR DNA Sequencer 400 and 4200 series, Version 4. MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Germany.
- FERGUSON, L.R.-TASMAN-JONES, C.-ENGLYST, H.-HARRIS, J.P. (2000): Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. *Nutrition and Cancer* **36**:230-237
- FLOCH, M.H. (1990): Soluble dietary fiber and short-chain fatty acids: An advance in understanding the human bacterial flora. *The American Journal of Gastroenterology.* **85**:1313-1314
- FONTAINE, I.F.-AISSI, E.A.-BOUQUELET, S.J.L. (1994): In vitro binding of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 to mucosal glycoproteins and hemagglutinating activity. *Current Microbiology* **28**:325-330
- FORESTIER, C.-DE CAMPS, C.-VATOUX, C.-JOLY, B. (2001): Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol* **152**:167-173

- FOX, G.E.-WISOTZKEY, J.D.-JURTSHUK, P. (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. System Bacteriol.* **42**:166-170
- FUJIWARA, S.-HASHIBA, H.-HIROTA, T.-FORSTNER, J.F. (1997): Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of *Bifidobacteria* which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglioside GM1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:506-512
- FULLER, R. (1989): Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**:365-368
- GAVINI, F.-POURCHER, A.M.-NEUT, C.-MONGET, D.-ROMOND, C.-OGER C.-IZARD, D. (1991): Phenotypic differentiation of *Bifidobacteria* of human and animal origins, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:548-557
- GAVINI, F.-VAN-ESBROECK, M.-TEUZEL, J.P.-FOURMENT, A.-GOOSSENS, H. (1996): Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the bifid-shunt in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe* **2**: 191-193
- GERMAN, B.-SCHIFFRIN, E.J.-RENIERO, R.-MOLLET, B.-PFEIFER, A.-NEESER, J.-R. (1999): The development of functional foods: lessons from the gut. *Tibtech* **17**:492-499
- GHODDUSI, H.B.-ROBINSON, R.K. (1997): The test of time. *Dairy-Industries-International*. **61**: 25-26, 28
- GIBSON, G.R. (1999): Dietary modulation of the human gut microflora using the probiotics oligofructose and inulin. *The Journal of Nutrition*. **129**:1438-1441
- GIBSON, G.R.-ROBERFROID, M.B. (1995): Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota. *J. Nutrition* **125**:1401-1412.
- GIBSON, G.R.-WANG, X. (1994a): Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **77**:412-420
- GIBSON, G.R.-WANG, X. (1994b): Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol* **11**:490-498.
- GOLDIN, B.R.-GORBACH, S.L. (1992): Probiotics for humans. In: *Probiotics, the scientific basis* (Fuller R ed). Chapman and Hall, London pp.355-376
- GOODRACE, R.-TIMMINS, E. M.-ROONEY, P. J.-ROWLAND, J. J.-KELL, D. B. (1996): Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks, *FEMS Microbiol. Lett.* **140**:233-239.
- GOPAL, A.-SHAH, N.P.-ROGINSKI, H. (1996): Bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft* **51**:619-623
- GOPAL, P.K.-PRASAD, J.-SMART, J.-GRILL, H.S. (2001): In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*
- GREENAWAY, L.-ANDREWS, D. (2000a): The new generation of prebiotics. *European Dairy Magazine* **4**:26-27
- GREENAWAY, L.-ANDREWS, D. (2000b): Culture-pro: The new generation prebiotic. *Functional foods*. 2000june:15-18.
- GRIFFIN, I.J.-DAVILA, P.M.-ABRAMS, S.A. (2002): Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. *Brit J Nutr Suppl.* **87**:S187-S191
- GRILL, J.P.-CROCIANI, J.-BALLONGUE, J. (1995): Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**:328-330
- HAAG, H.-GREMLICH, H. U.-BERGMANN, R.-SANGIER, J. J. (1996): Characterisation and identification of *actinomyces* by FT-IR spectroscopy, *J. Microbiol. Methods* **27**:157-163.
- HAVENAAR, R.-HUIS IN 'T VELD, M.J.H. (1992): Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease*. Vol 1 Amsterdam:Elsevier Applied Science publishers
- HEKMAT, S.-McMAHON, D.J. (1992): Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice Cream for Use as a Probiotic Food. *J. Dairy Sci* **75**: 1415-1422.
- HELLER, K.J. (2001): Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl): 374S-379S
- HELM, D.-LABISCHINSKI, H.-SCHALLEHN, G.-NAUMANN, D. (1991): Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy, *J. General Microbiol.* **137**:69-79.
- HILLIAM, M. (1998): The market for functional foods. *International Dairy Journal* **8**:349-353
- HOIER, E. (1992): Säure- und Gallentoleranz von *Lactobacillus acidophilus* und Bifidobakterien. *Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft* **26**:770-772
- HOLT, C.-HIRST, D.-SUTHERLAND, A.-MACDONALD, F.. (1995): Discrimination of Species in the Genus *Listeria* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Canonical Variate Analysis, *Appl Environ Microbiol* **61**:377-378.
- HOLZAPFEL, W.H.-HABERER, P.-SNEL, J.-SCHILLINGER, U.-HUIS IN 'T VELD, J.H.J. (1998): Overview of gut flora and probiotics. *Int. Journal of Food Microbiology* **41**:85-101

- HOLZAPFEL, W.H.-HABERER, P.-GEISEN, R.-BJÖRKROTH, J.-SCHILLUNGER, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 73(Suppl):365S-373S
- HOU, J. W. -YU, R. C.- CHOU, C. C.,(2000): Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International* **33**, 393-397
- HUGES, D.B.-HOOVER, D.G. (1991): Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technology* 1991 April:74-83
- HUGES, D.B.-HOOVER, D.G. (1993): Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *J. Dairy Sci* **78**:268-276
- HURREL, R.-F. (1990): Micronutrients of infant formula. **Nestlé Research Centre**, Nestec Ltd., Lausanne, Switzerland..
- IBRAHIM, S.A. (1994): Bovine milk kappa-casein trypsin digest is a growth promoting factor for *Bifidobacterium longum*. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **16**:69-72.
- IBRAHIM, S.A.- BEZKOROVAINY, A. (1993a): Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. *J Food Protect* **56** (8):713-715.
- IBRAHIM, S.A.- BEZKOROVAINY, A. (1993b): Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. *J Sci Food Agric* **62**:351-354
- IBRAHIM, S.A.-BEZKOROVAINY, A. (1994): Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. *J. Food Sci.* **59** (1):189-191.
- ISHIBASHI, N. – SHIMAMURA, S. (1993): *Bifidobacteria*: Research and Development in Japan, *Food Technology* **6**:126-135.
- ISHIBASHI, N.-YAMAZAKI, S. (2001): Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 73(Suppl):465S-470S
- ISOLAURI, E.-SÜTAS, Y.-KANKAANPÄÄ, P.-ARVILOMMI, H.-SALMINEN, S. (2001): Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73(Suppl):444S-450S
- IWANA, H.-MASUDA, H.-FUJISAWA, T.-SUZUKI, H.-MITSUOKA, T. (1993): Isolation and identification of *Bifidobacterium* spp. In commercial yogurts sold in Europe. *Bifidobacteria Microflora* **12**:39-45
- IWATA, M.-MORISHITA, T. (1989): The presence of plasmid in *Bifidobacterium breve* *Letters in Applied Microbiology* **9**:165-168
- JACOBSEN, C.N.-NIELSEN, V.R.-HAYFORD, A.E.-MOLLER-P.LMICHAELSEN, K.F.-PAERREGAARD, A.-SANDSTÖRM, B.-TVEDE, M.-JAJOBSEN, M. (1999): Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonisation of five selected strains in humans *Appl Environ Microbiol* **65**(11):4949-4956
- JANSSON, S.E.A.-EDSMAN, C.J.-GEDDE, U.W.-HEDENQVIST, M.S. (2001): Packaging material for fermented milk: effects of material crystallinity and polarity on food quality. *Packaging technology and science*. **15**:119-127
- JASKARI, J.-KONTULA, P.-SIITONEN, A.-JOUSIMIES-SOMER, H.-MATTILA-SANDHOLM, T.-POUTANEN, K. (1998): Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl. Microbiol Biotechnol* **49**:175-181
- JIAN, W.-DONG, X. (2001): New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1633-1638
- JIAN, W.-ZHU, L.-DONG, X. (2002): Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov, comb. nov, and *Parascardovia denticolens* gen. nov, comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:809-812
- JOUANY, J.P.(1982): Volatile fatty acids and alcohols determination in digestive contents, silage juice, bacterial culture and anaerobic fermenter contents, *Sci Aliments* **2**:131-144).
- KADO-OKA, Y.-FUJIWARA, S.-HIROTA, T. (1991): Effect of bifidobacteria cells on mitogenic response of splenocytes and several functions of phagocytes. *Milchwissenschaft* **46**:626-629
- KAMALY, M. K. (1997): Bifidobacteria fermentation of soybean milk. *Food Research International* **30**, 675-682
- KAUFMANN, P.-PFEFFERKORN, A.-TEUBER, M.-MEILE, L. (1997): Identification and Quantification of *Bifidobacterium* Species Isolated from Food with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes by Colony Hybridization and PCR, *Appl Environ Microbiol* **63**:1268-1273.
- KAUR, I.P.-CHOPRA, K.-SAINI, A. (2002): Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **15**:1-9
- KHALIL, ALI H.- MANSOUR E. H. (1998): Alginate Encapsulated Bifidobacteria Survival in Mayonnaise *Journal of Food Science* **4**: 702-705
- KITAHATA, S.-FUJITA, K. (1993): Xylsucrose, Isomaltosucrose and lactosucrose. In *Oligosaccharides, production, properties and application* (ed. Nakakuki, T.) Japanese Technology Reviews Gordon and Breach Science Publishers, Japan, pp158-174

- KLAVER, F.A.M.-van der MEER, R. (1993): The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol* **59**:1120-1124.
- KLAVER, F.A.M.-KINGMA, F.-BOLLE, A.C (1990): Groeirelaties tussen bifidobacterien en lactobacillen in melk. *VMT* **9**:13-16
- KNEIFEL, W. (1996): Starterkulturen für Milchprodukte- vom Sauerewecker zum Lebensretter? *Milchwirtschaftliche Berichte* **128/129**:93-99
- KOGA, Y.-SHIBATA, T.-O'BRIEN, R. (1993): Soybean Oligosaccharides In Oligosaccharides, production, properties and application (ed. Nakakuki, T.) Japanese Technology Reviews Gordon and Breach Science Publishers, Japan, pp.175-203
- KOHMOTO, T.-FUKUI, F.-TAKAKU, H.-MACHIDA, Y.-ARAI, M.MITSUOKA, T. (1988): Effect of isomaltooligosaccharides on human fecal flora. *Bifidobacterial Microflora* **7**:61-69
- KOK, R.G.-DE WAAL, A.-SCHUT, F.-WELLING, G.W.-WEENK, G.-HELLINGWERF, K.J. (1996): Specific Detection and Analysis of a Probiotic *Bifidobacterium* Strain in Infant Feces. *Appl Environ Microbiol* **62**:3668-3672
- KURMANN, J.-A. - RASIC, J.-Lj. (1988): Technology of Fermented Special Products, *Bulletin of the IDF* **227**:101-109.
- KÜMMERLE, M.,-SCHERER, S. -SEILER, H. (1998): Rapid and reliable identification of fermentative yeast by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Appl Environ Microbiol* **64**:2207-2214.
- LANGENDIJK, P.S.-SCHUT, F.-JANSEN, G.J.-RAANGS, G.C.-KAMPHUIS, G.R.-WILKINSON, M.H.F.-WELLING, G.W. (1995): Quantitative fluorescence in situ hybridisation of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* **61**:3069-3075
- LANKAPUTHRA, W.E.V.-SHAH, N.P. (1998): Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutation Research* **397**:169-182
- LAUER, E. (1990): *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *Int. J. System. Bacteriol* **40**:100-102
- LAUER, E. -KANDLER, O. (1983): DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of genus *Bifidobacterium*, *Syst. Appl. Microbiology* **4**:42-64
- LEBLOND BOURGET, N.-PHILIPPE, H.-MANGIN, I.-DECARIS, B. (1996): 16S rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence Analyses Reveal Inter- and Intraspecific *Bifidobacterium* Phylogeny, *Int. J. Sys. Bact.* **46**:102-111
- LEE, K.Y.-HEO, T.R. (2000): Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Appl Environ Microbiol* **66**(2): 869-873
- LEE, Y.K.-SALMINEN, S. (1995): The Coming of Age of Probiotics, *Trends in Food Science and Technology* **6**:241-245
- LEE, Y.-J.-YU, W.-K.-HEO, T.-R. (2003): Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *Int J. Antimicrob Ag* **21**:340-346
- LEFIER, D. -HIRST, D. - HOLT, C.- WILLIAMS, A.G. (1997): Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**:45-50
- LILLY, D.M.-STILLWELL R.H. (1965): Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organism. *Science* **147**:747-748
- LIM, K.S.-HUH, C.S.-BAEK, Y.J. (1993): Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J. Dairy Sci* **76**:2168-2174
- LIN, S.F.- SCHRAFT, H.- GRIFFITHS, M.W. (1998): Identifications of *Bacillus cereus* by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *J Food Protect* **61**:921-923.
- LOO, V.V.-CUMMINGS, J.-DELZENNE, N.-ENGLYST, H.-FRANCK, A.-HOPKINS, M.-KOK, N.-MACFARLANE, G.-NEWTON, D.-QUIGLEY, M.-ROBERFROID, M.-van VLIET, T.-van den HEUVEL, E. (1999): Functional food properties of non digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition* **81**:121-132
- LYNCH, P.A.-GILPIN, B.J.-SINTON, L.W.-SAVILL, M.G. (2002): The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *Journal of Applied Microbiology* **92**:526-533
- MACEDO, M. G. - CHAMPAGNE, C. P. - VUILLEMARD, J. C. - LACROIX, C. (1999): Establishment of bacteriophages in an immobilized cells system used for continuous inoculation of lactococci *Int. Dairy Journal* **9**: 437-445
- MANGIN, I.-BOURGET, N.-BOUHNICK, Y.-BISETTI, N.-SIMONETJ, M.-DECARIS, B. (1994): Identification of *Bifidobacterium* Strains by rRNA Gene Restriction Patterns. *Appl Environ Microbiol* **60**:1451-1458.

- MANGIN,I.-BOUHNICK,Y.-BISETTI,N.-DECARIS,B. (1999): Molecular monitoring of human intestinal *Bifidobacterium* strain diversity. Res. Microbiol. **150**:343-350.
- MARTEAU, P.-MINEKUS, M.-HAVENAAR, R.-HUIS IN'T VELD, J.H.J. (1997): Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile. J. Dairy Sci **80**: 1031-1037.
- MARTEAU, P.-POCHART, P.-FLOURIE, B.-PELLIER, P.-SANTOS, L.-DESJEUX, J.F.-RAMBAUD, J.C. (1990): Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora. Am J. Clin Nutr **52**:685-688
- MARTEAU,P.-DE VRESE,M.-CELLIER,C.J.-SCHREZENMEIER,J. (2001): Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am J Clin Nutr **73**(Suppl):430S-436S
- MATSUKI, T.-WATANABE, K.-TANAKA, R.-FUFUDA, M.-OYAIZU, H. (1998b): Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. Appl Environ Microbiol **65**:4506-4512
- MATSUKI, T.-WATANABE, K.-TANAKA, R.-OYAIZU, H. (1998a): Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species-species and group-specific primers, FEMS Microbiology Letters **167**:113-121.
- MATSUMOTO,K.-KOBAYASHI,Y.-UEYAMA,S.-WATANABE,T.-TANAKA,R.-KAN,T.-KURODA,A.-SUMIHARA,Y. (1993): Galaktooligosaccharides In Oligosaccharides, production, properties and application (ed. Nakakuki, T.) Japanese Technology Reviews Gordon and Breach Science Publishers, Japan, pp.90-106
- MATTARELLI,P.-BRANDI,G.-MODESTO,M.-BIAVATI,B. (2002): Discrepancy between declared and recovered bifidobacteria in a human probiotic. Ann Microbiol **52**:283-286
- MATTEUZZI, D.-CROCIANI,F.-ZANI,G.-TROVATELLI,L.D. (1971): *Bifidobacterium suis* n.sp.: a new species of the genus Bifidobacterium isolated from pig feces. Z-Allg.Mikrobiol.**11**: 387-395
- MATTILA-SANDHOLM,T. (1999): The PROBDEMO project: Demonstration of the nutritional functionality of probiotic foods. Trends in Food Science and Technology **10**:385-386
- MATTILA-SANDHOLM,T.-BLUM,S.-COLLINS,J.K.-CRITTENDEN,R.-DE-VOS,W.-DUNNE,C.-FONDEN,R.-GRENOV,G.-ISOLAURI,E.-KIELY,B.-MARTEAU,P.-MORELLI,L.-OUWEHAND.,A.-RENIERO,R.-SAARELA,M.-SALMINEN,S.-SAXELIN,M.-SCHRIFFRIN,E.-SHANAHAN,F.-VAUGHAN,E.-VON-WRIGHT,A. (1999): Probiotics: towards demonstrating efficacy. Trends in Food Science and Technology **10**:393-399
- MATTILA-SANDHOLM,T.-MYLLARINEN,P.-CRITTENDEN,R.-MOGENSEN,G.-FONDÉN,R.-SAARELA,M. (2002): Technological challenges for future probiotics foods. International Dairy Journal **12**:173-182
- McCARTNEY, A.L.-WENZHI,W.-TANNOCK,G.W. (1996): Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. Appl Environ Microbiol **62**:4608-4613
- MEILE, L.-LUDWIG, W.-RUEGER, U.-GUT, C-KAUFMANN, P.-DASEN, G-WENGER, S.-TEUBER, M. (1997): *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. System Appl. Microbiol **20**:57-64
- MIKKELSEN,L.L.-BENDIXEN,C.-JAKOBSEN,M.-JENSEN,B.B. (2003): Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. Appl Environ Microbiol **69**:654-658
- MINEKUS, M.-MARTEAU, P. HAVENAAR, R.- HUIS IN'T VELD, J.H.J. (1995): A multicompartamental dynamic computer controlled model simulating the stomach and small intestine. ATLA **23**:197-209
- MINEKUS,M.-SMEETS-PEETERS,M.-BERNAILER,A.-MAROL-BONNIN,S.-HAVENAAR,R.-MARTEAU,P.-ALRIC,M.-FONTY,G.-HUIS IN'T VELD,J.H.J. (1999): A computer controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. Applied Microbiol Biotechnol **53**:108-114
- MITSUOKA, T. (1969): Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobacterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. Zbl. Bakt. I. Orig. A **210**:52-64
- MODLER,H.W. (1994): Bifidogenic factors sources, metabolism and application. Int Dairy J. **??**: 383-407
- MOLIN, G. (2001): Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lacobacillus plantarum* 2999v. Am J Clin Nutr **73**(Suppl):380S-385S
- MOORE, W.E.C.-MOORE, L.H. (1995): Intestinal floras of population that have a high risk of colon cancer. Appl Environ Microbiol **61**:3202-3207
- MUNOA, F.J.-PARES,R. (1988): Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. Appl Environ Microbiol **54**:1715-1718
- MURAD, H.A.-ZEINAB-SADEK, I.-FATHY, F.A. (1998): Production of bifidus kariesh cheese. Deutsche Lebensmittel Rundschau **94**:409-412

- MURTI, T.W.-BOUILLANNE, C.-LANDON, M.-DESMAZEAUD, M.J. (1992): Bacterial growth and volatile compounds in yoghurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* sp. *J Food Sci* **58**:153-157
- NAKAJIMA, Y.-NISHIO, K. (1993): Isomaltulose In Oligosaccharides, production, properties and application (ed. Nakakuki, T.) Japanese Technology Reviews Gordon and Breach Science Publishers, Japan, pp.107-117
- NAKAKUKI, T. (1993): Oligosaccharides, production, properties and application (ed. Nakakuki, T.) Japanese Technology Reviews Gordon and Breach Science Publishers, Japan, 235p
- NAUMANN, D.-HELM, D.-SCHULTZ, C. (1994): Characterisation and identification of micro-organisms by FT-IR spectroscopy and FT-IR microscopy. In *Bacterial Diversity and Systematics*: 67-85. Ed. F.G. Priest et al. Plenum Press, New York.
- O'BRIEN, J.-CRITTENDEN, R.-OUWAHAND, A.C.-SALMINEN, S. (1999): Safety evaluation of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* **10**:418-424
- O'SULLIVAN, D.J. (2001): Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J. Agric. Food chem.* **49**:1751-1760
- O'SULLIVAN, D.J.-KULLEN, M.J. (1998): Tracking of probiotic *Bifidobacteria* in the intestine. *Int. Dairy Journal* **8**:513-525
- OBERREUTER, H.-SEILER, H.-SCHERER, S. (2001): Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transformed infrared (FT-IR) spectroscopy. *Int J. Syst Evol Microbiol* **52**:91-100
- ORBAN, J.I. (2000): Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **40**:221-224
- ORLA-JENSEN, S. (1924): La classification des bacteries lactiques. *Lait* **4**:468-474
- OUWEHAND, A.C.-GRASTEN, S.-NIEMI, P.-MYKKANEN, H.-SALMINEN, P. (2000): Wheat or rye supplemented diets do not affect faecal mucus concentration or the adhesion of probiotic microorganisms to faecal mucus. *Leet Appl Microbiol* **31**:30-33
- OUWEHAND, A.C.-ISOLAURI, E.-KIRJAVAINEN, P.V.-SALMINEN, P. (1999): Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol Lett.* **172**:61-64
- OUWEHAND, A.C.-SALMINEN, S.J. (1998): The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal* **8**:749-758
- PARKER, R.B. (1974): Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* **29**:4-8
- PEREIRA, D.I.A.-GIBSON, G.R. (2002): Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **68**(9):4689-4693
- PEREZ, P.F.-MINNAARD, Y.-DISALVO, E.A.-de ANTONI, G.L. (1998): Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ Microbiol* **64**:21-26
- PESTKA, J.J.-HA, C.-L.-WARNER, R.W.-LEE, J.H. USTUNOL, Z. (2001): Effects of ingestion of yoghurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse. *J Food Protect* **64**:392-395
- PETSCHOW, B.W.-TALBOTT, R.D. (1990): Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. *J Clinical Microbiol* **28**:287-292
- PICKETT, M.J.-GREENWOOD, J.M.-HARWEY, S.M. (1981): *Gardnerella vaginalis*. *Prokaryotes* 918-920
- POCH, M.-BEZKOROVAINY, A. (1988): Growth-enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.* **71**:3214-3221
- POCHART, P.-MARTEAU, P.-BOUHNICK, Y.-GODEREL, I.-BOURLIOUX, P.-RAMBAUD, J.C. (1992): Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr* **55**:78-80
- PRZYREMBEL, H. (2001): Consideration of possible legislation within existing regulatory frameworks. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl):471S-475S
- RAO, A.V. (1999): Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *The Journal of Nutrition* **129**:144-145
- REID, G. (1999): The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* **65**(9):3763-3766
- RESNICK, I.G.-LEVIN, M.A. (1981b): Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Appl. Environ Microbiol* **42**: 433-438
- REUTER, G. (1963): Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings und Erwachsenen-stuhl. *Zbl.Bakt.I.Origt. A* **191** 486-507
- REUTER, G.-KLEIN, G.-GOLDBERG, M. (2002): Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Research International* **35**:117-124
- ROBERFROID, M.B. (1993): Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **33**(2):103-148

- ROBERFROID, M.B. (1999b): Caloric value of inulin and oligofructose. *The Journal of Nutrition*. **129**:1436-1437
- ROBERFROID, M.B.-GIBSON, G.R.(2002): Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Brit J Nutr Suppl*.**87**:S139-143
- ROBERFROID, M.B. (2001): Prebiotics: preferential substrates for specific germs. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl): 406S-409S
- ROBERTS, C.M.-FETT, W.F.-OSMAN, S.F.-WIJEY, C.-O'CONNOR, J.V.-HOOVER, D.G. (1995): Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *J. Appl. Bacteriol* **78**:463-468
- ROBINSON, R.-K. (1989): Special yoghurts the potential health benefits. *Dairy Industries International* **1989**, **54** (7):23-25.
- ROSSI, M.-BRIGIDI, P.-GONZALEZ VARA Y RODRIGUEZ, A.-MATTEUZZI, D. (1996): Characterisation of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector. *Res. Microbiol* **147**:133-143
- ROY, D.-WARD, P. (1990): Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Bacteriol* **69**:739-749
- ROY, D.-WARD, P. (1992): Rapid detection of *Bifidobacterium dentium* by enzymatic hydrolysis of β -glucuronide substrates. *Journal of Food Protection* **55**:291-295
- RUAS-MADIEDO, P.-HUGENHOLTZ, J.-ZOON, P. (2002): An overview of the functionality of exopolisaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **12**: 163-171
- SAARELA, M.-LAEHTENMAEKI, L.-CRITTENDEN, R.-SALMINEN, S.-MATTILA-SANHOLM, T. (2002): Gut bacteria and health foods-the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* **78**:99-117
- SALJI, J. (1992). Acidophilus milk products: foods with a third dimension, *Food Science and Technology Today*. **6**:142-147.
- SALMINEN, S. (1996): Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutr News Lett* **5**:16-18
- SALMINEN, S.-BOULEY, C.-BOUTRON-ROUAULT, M.-C.-CUMMINGS, J.H.-FRANCK, A.-GIBSON, G.R.-ISOLAURI, E.-MOREAU, M.-C., ROBERFROID, M.-ROWLAND, I. (1998): Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*. **80**:147-171.
- SATOKARI, R.M.-VAUGHAN, E.E.-AKKERMANS, A.D.L.-SAARELA, M.- DE VOS, W. (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(2): 504-513
- SAXELIN, M.-GRENOV, B.-SVENSSON, U.-FONDÉN, R.-RENIERO, R.-MATTILA-SANDHOLM, T. (1999): The technology of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. **10**:387-392
- SCALABRINI, P.- ROSSI, M.- SPETTOLI, P.- MATTEUZZI, D. (1998): Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 213-219
- SCARDOVI, V.-CASALICCIO, F.-VINCENZI, N. (1979a): Multiple electrophoretic forms of transaldolase and 6-phosphogluconic dehydrogenase and their relationships to the taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Int J. Syst. Bacteriol* **29**:312-327
- SCARDOVI, V.-CROCIANI, F. (1974): *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: Three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships, *Int J. System Bacteriol* **24**: 6-20
- SCARDOVI, V.-TROVATELLI, L.D. (1969): New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*
- SCARDOVI, V.-TROVATELLI, L.D.-ZANI, G.-CROCIANI, F. -MATTEUZZI, D. (1971): Deoxyribonucleic acid homology relationship among species of the genus *Bifidobacterium*, *Int. J. Syst. Bacteriol*. **21**:276-294.
- SCARDOVI, V.-TROVATELLI, L.D.-BIAVATI, B.-ZANI, G. (1979b): *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: Four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships, *Int J. System Bacteriol* **29**:291-311
- SCARDOVI, V.-TROVATELLI, L.D. (1974): *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the minimum and subtle groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **24**: 21-28
- SCARDOVI, V. (1981): The Genus *Bifidobacterium*. **The Prokaryotes** Vol 2 eds. Starr MP, Stolp H et.al., Springer-Verlag, New York:1951-1961.
- SCARDOVI, V.-ZANI, G. (1974): *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large, acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *Int. J. Syst. Bacteriol* **24**:29-34
- SCARPIGNATO, C.-RAMPAL, P. (1995): Prevention and treatment of traveler's diarrhea: A clinical pharmacological approach. *Chemotherapy* **41**:48-81

- SCHAAFSMA, G. (1996): State of art concerning probiotic strains in milk products IDF Nutr News Lett **5**:23-24
- SCHEPPACH, W. (1994): Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. Gut. 1994 Supplement 1:S35-S38.
- SCHEPPACH, W. –BARTRAM, H.P.-RICHTER, F. (1995). Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer . European Journal of cancer **31A** (7/8):1077-1080
- SCHLEIFER, K.H.-LUDWIG, W. (1995): Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. System Appl. Microbiol **18**:461-467
- SCHOLZ-AHRENS, K.E.-SCHAAFSMA, G.-VAN DEN HUVEL, E.GHM.-SCHREZENMEIER, J. (2001): Effects of prebiotics on mineral metabolism. Am J Clin Nutr **73**(Suppl):459S-464S
- SCHOLZ-AHRENS, K.E.-SCHREZENMEIER, J. (2002): Inulin, oligofructose and mineral metabolism-experimental data and mechanism. Brit J Nutr Suppl.**87**:S179-S186
- SCHREZENMEIER, J.-DE VRESE, M. (2001): Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching definition. Am J Clin Nutr **73**(Suppl):361S-364S
- SGHIR, A.-CHOW, J.M.-MACKIE, R.I. (1998): Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate. Journal of Applied Microbiology. **85**:769-777.
- SGORBATI, B. –SCARDOVI, V.-LEBLANC, D. J. (1982): Plasmids in the Genus Bifidobacteria. Journal of General Microbiology **128**:2121-2131
- SHEU, T. Y.- MARSHALL, R. T. (1993): Microentrapment of Lactobacilli in Calcium Alginate Gels Journal of Food science **3**: 557-561
- SHIMAMURA, S.-ABE, F.-ISHIBASHI, N.-MIYAKAWA, H.-YAESHIMA, T.-ARAYA, T.-TOMITA, M. (1992): Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. J. Dairy Sci **75**:3296-3306
- SIMMERING, R.-BLAUT, M. (2001): Pro- and prebiotics-tasty guardian angels? Appl. Microbiol Biotechnol **55**:19-28
- SIMON, G.R.-GORBACH, S.L. (1984): Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology.**86**:174-193
- SPERTI, G.S. (1971): Probiotics. West Point, Avi publishing Co.
- STACKEBRANDT, E.-GOEBEL, B. M. (1994): Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:846-849.
- STANTON, C.-GARDINER, G.-LYNCH, P.B.-COLLINS, J.K.-FITZGERALD, G.-ROSS, R.P. (1998): Probiotic cheese. Int. Dairy Journal **8**:491-496
- SULTANA, K.- GODWARD, G.- REYNOLDA, N.- ARUMUGASWAMY, R.- PEIRIS, P.- KAILASAPATHY, K. (2000): Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt Int. Food Microbiology **62**: 47-55
- SUN, W.-GRIFFITHS, M.W. (2000): Survival of bifidobacteria in yoghurt and simulated gastric juice following immobilisation in gellan-xanthan beads. Int. J. Food Microbiol. **61**:17-25
- TAKAHASHI, T.-OKA, T.-IWANA, H.-KUWATA, T.-YAMAMOTO, Y. (1993): Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. Biosci Biotech Biochem **57**:1557-1560
- TANNOCK, G.W. (1998): Studies of the intestinal Microflora: A prerequisite for the development of probiotics. Int. Dairy Journal **8**: 527-533
- TANNOCK, G.W. (1999): Identification of lactobacilli and bifidobacteria. Curr Issues Mol. Biol **1**:53-64
- TEMMERMAN, R. – POT, B. – HUYS, G. – SWINGS, J. (2002): Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products International Journal of Food Microbiology **81**: 1-10
- TERAGUCHI, S.-UEHARA, M.-OGASA, K.-MITSUOKA, T. (1978): Enumeration of bifidobacteria in dairy products. Jap J Bacteriol **33**:753-761
- TOMOMATSU, H. (1994): Health effects of Oligosaccharides. Food Technology **48**:61-65.
- TUOMOLA, E.-CRITTENDEN, R.-PLAYNE, M.-ISOLAURIE, E.-SALMINEN, S. (2001): Quality assurance criteria for probiotic bacteria. Am J Clin Nutr **73**(Suppl):393S-398S
- TUOMOLA, E.M.-SALMINEN, S.J. (1998): Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2P cell cultures. Int J Food Microbiol **41**:45-51
- URGELL, M.R.-ORLEANS, A.S. (2001): Oligosaccharides: application in infant food. Early human development **65** Suppl S43-S52
- VAUGHAN, E.E.-HEILIG, H.G.H.J.-ZOETENDAL, E.G.-SATOKARI, R.-COLLINS, J.K.- AKKERMANS, A.D.L.-DE-VOS, W.M. (1999): Molecular approaches to study probiotic bacteria. Trends in Food Science and Technology **10**:400-404
- VÁZQUEZ, M.J.-ALONSO, J.L.-DOMÍNGUEZ, H.-PARAJÓ, J.C. (2000): Xilooligosaccharides: manufacture and application. Trends in Food Science and Technology **11**:387-393

- VENEMA, K.-VAN-NUENEN, M.-SMEETS-PEETERS, M.-MINEKUS, M.-HAVENAAR, R. (2000): TNO'S *in vitro* large intestinal model: an excellent screening tool for functional food and pharmaceutical research. *Nutrition* **24**:558-564
- VENTURA, M.-ELLI, M.-RENIERO, R.-ZINK, R. (2001a): Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology* **36**:113-121
- VENTURA, M.-RENIERO, R.-ZINK, R. (2001b): Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Appl Environ Microbiol* **67**(6):2760-2765
- VINDEROLA, C.G.-COSTA, G.A.-REGENHARDT, S.-REINHEIMER, J.A. (2002): Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid bacteria. *Int. Dairy Journal* (article in press)
- VON STETTEN, F.,-K. P. FRANCIS, LECHNER, S.-NEUHAUS, K., SCHERER, S. (1998): Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA. *J. Microbiol. Methods* **34**:99-106.
- WANG, X.-GIBSON, G.R. (1993): Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by growing in the human large intestine. *J. Appl. Microbiol.* **75**, p: 373-380.
- WATABE, J.-BENNO, Y.-MITSUOKA, T. (1983): *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov. : a new species isolated from the ceca of chickens. *Int. J. System Bacteriol.* **33**:127132
- WOLLOWSKI, I.-RECHKEMMER, G.-POOL-ZOBEL, B.L. (2001): Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* **73**(Suppl): 451S-455S
- YAESHIMA, T.-FUJISAVA, T.-MITSUOKA, T. (1991): Differential characteristics of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium animalis*. *System Appl Microbiol* **14**:169-172
- YAESHIMA, T.-TAKAHASHI, S.-MATSUMOTO, N.-ISHIBASHI, N.-HAYASAWA, H.-IINO, H. (1997): Effect of yogurt containing *Bifidobacterium longum* BB536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency: A comparison with standard yogurt. *Bioscience Microflora* **16**:73-77
- YAESHIMA, T.-FUJISAVA, T.-MITSUOKA, T. (1992b): *Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* comb. nov. and *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* comb. nov. *System Appl Microbiol* **15**:380-385
- YAMAMOTO, T.-MOROTOMI, M.-TANAKA, R. (1992): Species-Specific Oligonucleotide Probes for Five *Bifidobacterium* Species Detected in Human Intestinal Microflora, *Appl Environ Microbiol* **58**:4076-4079
- YAMAZAKI, S.-MACHII, K.-TSUYUKI, S.-MOMOSE, H.-KAWASHIMA, T.-UEDA, K. (1985): Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunology* **56**:43-50
- YASUI, H.-OHWAKI, M. (1991): Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J. Dairy Sci* **74**:1187-1195
- YATAKE, T. (1993): Anomalous linked oligosaccharides In *Oligosaccharides, production, properties and application* (ed. Nakakuki, T.) Japanese Technology Reviews Gordon and Breach Science Publishers, Japan, pp.79-90
- ZIEMER, C.J.-GIBSON, G.R. (1998): An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy Journal* **8**:473-479

9 MELLÉKLETEK

9.1 Probiotikus táplálékkiegészítőkből izolált törzsek

termék	gyártó	címkén feltüntetett probiotikus törzsek	termékből izolált törzsek
40 + Acidophilus	Solgar Laboratories (Hollandia)	<i>Lb.Acidophilus</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.longum</i>	<i>P.acidilactici</i> , <i>Lb.Planarum</i> , <i>B.lactis</i>
ABCdophilus power	Solgar Laboratories (Hollandia)	<i>B.bifidum</i> , <i>B.infantis</i> , <i>S.thermophilus</i>	-
Acidophilus bifidus	Blackmores (UK)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i>	-
Acidophilus Plus	Quest Vitamins (UK)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.rhamnosus</i> , <i>Lb.bifidum</i> ^b	<i>Lb.paracasei ssp. paracasei</i>
Acidophilus plus bifidus	Kudos Vitamins and Herbals (UK)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.longum</i> , <i>B.infantis</i> , <i>B.casei</i> ^b	-
Aciforce	Biohorma (Hollandia)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.lactis</i> , <i>E.faecium</i> , <i>B.bifidum</i>	<i>E.faecium</i> , <i>Lc.lactis ssp. lactis</i>
Bacilac	THT (Belgium)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.rhamnosus</i>	-
Beneflora	ORTIS (Belgium)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.casei</i> , <i>B.longum</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>S.thermophilus</i>	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.longum</i> , <i>S.thermophilus</i>
Bifidus complex	Biover (Belgium)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>E.faecium</i>
Diedam	Almond Laboratorios (Spanyolország)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.casei</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>B.infantis</i> , <i>S.thermophilus</i>	-
Milk Free Acidophilus	Holland and Barrett (UK)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>B.bifidum</i>	-
Multi-billion dophilus	Solgar Laboratories (Hollandia)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>S.thermophilus</i>	<i>P.acidilactici</i>
Novaflora	Pharmafood (Belgium)	<i>Lb.rhamnosus</i> , <i>Lb.lactis</i> , <i>E.faecium</i> , <i>Bifidobacterium</i>	<i>E.faecium</i>
Proflora	Chefaro (Belgium)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>S.thermophilus</i>	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.lactis</i> , <i>S.thermophilus</i>
Psyllium actif	Biover (Belgium)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i>	<i>E.faecium</i>
Vivaflora	Laboratoires Super Diet (Franciaország)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.bifidum</i> ^b	-
B'A fruits	B'A (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>S.thermophilus</i>
B'A vanille	B'A (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>S.thermophilus</i>
Benecol	McNeil Consumer Nutritionals (UK)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>S.thermophilus</i>
Bio abricot	Danone (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i> , élő joghurt kultúra	<i>Lb.lactis</i>
BIO framboise	Danone (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i> , élő joghurt kultúra	<i>S.thermophilus</i> , <i>Lb.lactis ssp. lactis</i>
Biogarde halfvol Naturel	Strothmann (Németország)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>S.thermophilus</i>
Biogarde plus (naturel)	Almhof (Hollandia)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.casei</i> , <i>Bifidobacterium</i>	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>S.thermophilus</i>
Biomild Drink	Mona (Hollandia)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.longum</i> , <i>S.thermophilus</i>	<i>Lb.johnsonii</i> , <i>S.thermophilus</i> , <i>Lb.lactis</i>
Bio Snac'	Danone (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i> , élő joghurt kultúra	<i>Lb.lactis</i>
Fitness Quark	Onken (Németország)	<i>Lb.acidophilus</i> OCA5, <i>Bifidobacterium</i> OCB111	<i>Lb.johnsonii</i> , <i>S.thermophilus</i>
Joghurt Mild Gartenfrucht	Bremerland (Németország)	<i>Lb.acidophilus</i> LA55, <i>Bifidobacterium</i> CB111	<i>Lb.johnsonii</i> , <i>Lb.lactis</i> , <i>S.thermophilus</i>
Natumild	Natuur Hoeve (Hollandia)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.bifidus</i> , <i>S.thermophilus</i>	<i>S.thermophilus</i>
Procult Drink	Alois Müller (Németország)	<i>B.longum</i> BB536, élő joghurtkultúra	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>S.thermophilus</i>
Vifit Drink	Mona (Hollandia)	<i>Lb.casei</i> GG, <i>Lb.acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i>	<i>Lb.rhamnosus</i> , <i>Lb. acidophilus</i>
Weight Watchers Bifidus	Senoble (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>S.thermophilus</i>
Kinderyoghurt mild	J. Bauer KG (Németország)	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.bifidus</i> ^b	<i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.johnsonii</i> , <i>S.thermophilus</i>

TEMERMANN *et al.* [2002] nyomán

9.2 Probiotikus tejtermékekből izolált törzsek

termék	gyártó	címkén feltüntetett probiotikus törzsek	termékből izolált törzsek
Actimel	Danone (Franciaország)	<i>Lb. casei immunitas</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>
Actimel Orange	Danone (Franciaország)	<i>Lb. casei immunitas</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>
Almighurt	Almighurt (Németország)	élő joghurtkultúra	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
B'A fruits	B'A (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>S. thermophilus</i>
B'A vanille	B'A (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>S. thermophilus</i>
Benecol	McNeil Consumer Nutritionals (UK)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i>
BI'AC	TMA (Németország)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>
BIO abricot	Danone (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>
BIO framboise	Danone (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>
Biogarde halfvol Naturel	Strothmann (Németország)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>S. thermophilus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Biogarde plus (naturel)	Almhof (Hollandia)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Biomild Drink	Mona (Hollandia)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> , <i>S. thermophilus</i>	<i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>
Bio Snac'	Danone (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>
Fitness Quark	Onken (Németország)	<i>Lb. acidophilus</i> OCA5, <i>Bifidobacterium</i> OCB111	<i>Lb. johnsonii</i> , <i>S. thermophilus</i>
Fysiq	Mona (Hollandia)	<i>Lb. acidophilus</i> Gilliland, élő joghurtkultúra	<i>Lb. crispatus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Gefilus	Valio (Finnország)	<i>Lb. GG</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lb. rhamnosus</i>
Joghurt mild Gartenfrucht	Bremerland (Németország)	<i>Lb. acidophilus</i> LA55, <i>Bifidobacterium</i> CB111	<i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>
Kinderyoghurt mild	J.Bauer KG (Németország)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. bifidus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>S. thermophilus</i>
Lactus Nature	Careefour (Franciaország)	<i>Lb. casei spp. rhamnosus</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lb. rhamnosus</i>
Lc1	Nestle (Németország)	<i>Lb. johnsonii</i> , élő joghurtkultúra	<i>Lb. johnsonii</i> , <i>S. thermophilus</i>
Naturmild	Natuur Hoeve (Hollandia)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. Bifidus</i> , <i>S. thermophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>
Procult Drink	Alois Müller (Németország)	<i>B. longum</i> BB536, élő joghurtkultúra	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Vifit Drink	Mona (Hollandia)	<i>Lb. casei</i> GG, <i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. acidophilus</i>
Weight Watchers Bifidus	Senoble (Franciaország)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>S. thermophilus</i>
Yakult	Yakult (Hollandia)	<i>Lb. casei</i> Shirota	<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>

TEMERMANN *et al.* nyomán [2002]

9.3 Probiotikus és szinbiotikus termékek

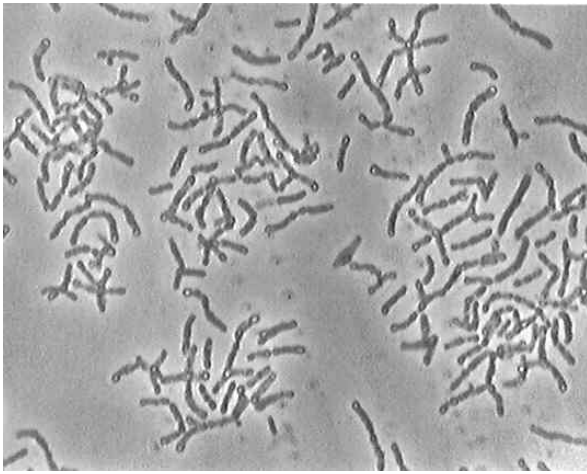
TERMÉK NEVE (GYÁRTÓ)	TÖRZSEK	PREBIOTIKUMOK
LC1 (Nestle)	<i>L. acidophilus</i> La1	
Yakult (Yakult)	<i>L. casei</i> Shirota	
Actimel (Gervais Danone)	<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i>	
Gefilac, Vifit (Valio, Campina Melkunie)	<i>L. rhamnosus</i> GG	
Bifidus yoghurt (Morinaga Milk Industry)	<i>B. longum</i> BB536	
Biomilk (Coberco)	BA	Inulin
Fyos (Nutricia)	<i>L. casei</i>	Frukto-oligoszacharid
Gaio (MD Food plc)	<i>E. faecium</i> K77D, <i>L. salivarius</i>	
Fysiq (Campina Melkunie)	<i>L. acidophilus</i> La1, <i>L. salivarius</i>	
ProBiotic (Bauer)	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bifidus</i> typ LA7	Frukto-oligoszacharid
Biotic (N+G)	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i> BB121	Frukto-oligoszacharid
Procult (Müller)	Joghurtkultúra, <i>B. longum</i> BB536	
Diat Joghurt (Ehrmann)	<i>L. acidophilus</i>	
Bioghurt Bechner (Onken)	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	
Acidofil drink (Dukat)	<i>L. acidophilus</i>	
Ab Kultura (Dukat)	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	
A-B Yoghurt	Joghurtkultúra, <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	
BA-live	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	
BA-nature	Joghurtkultúra, <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	
Bifighurt	<i>B. longum</i>	
Bioghurt	<i>L. acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Cultura	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	
Real Active	Joghurtkultúra, <i>B. longum</i>	
Acidophilus milk	<i>L. acidophilus</i>	
Biogarde (SKW)	<i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	
Acidophilus-yeast milk	<i>L. acidophilus</i> , <i>Saccharomyces fragilis</i> , <i>S. cerevisiae</i>	
Acidophilus buttermilk	<i>L. acidophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. lactis</i> <i>subsp. cremoris</i> , <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>	
Jogobella (Zott)	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	
Joghurt plussz (Veszprémetej)	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	
Túró Rudi (Szabolcstej)	Probiotikus tejsavbaktérium kultúra	Oligoszacharid

9.4 Az oligoszacharidok 12 csoportja

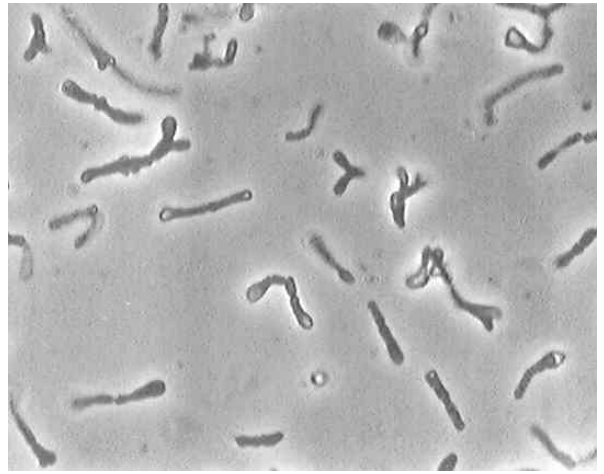
Oligoszacharid csoport	Becsült termelés 1995-ben (t)	Fő gyártók	Márkanév
1. Galakto-oligoszacharidok	15000	Yakult Honsha (Japán) Nissin Sugar Manufacturing Company (Japán) Snow Brand Milk Products (Japán) Borculo Whey Products (Hollandia)	Oligomate Cup-oligo P7L TOS-syrup
2. Laktulóz	20000	Morinaga Milk Industry Co. (Japán) Solvay (Németország) Milei GmbH (Németország) Canlac Corporation (Kanada) Laevosun (Ausztria) Inalco SPA (Olaszország)	MLS/P/C
3. Laktoszkuróz	1600	Ensuiko Sugar Refining Co. (Japán) Hayashibara Shoji Inc. (Japán)	Nyuka-origo Newka-oligo
4. Fruktó-oligoszacharidok	12000	Meiji Seika Kaisha (Japán) Beghin.Meiji Industries (Franciaország) Golden Technologies (USA) Cheil Foods and Chemicals (Korea) ORAFTI (Belgium) Cosucra (Belgium)	Meioligo Actilight NutraFlora Oligo-sugar Raftilose és Raftilin Fibruline
5. Palatinóz (izomaltulóz) oligoszacharidok	5000	Mitsui Sugar Co. (Japán)	ICP/O, IOS
6. Glükózil-szacharóz (páros cukor)	4000	Hayashibara Shoji Inc. (Japán)	Coupling Sugar
7. Malto-oligoszacharidok	10000	Nihon Shokuhin Kako (Japán) Hayashibara Shoji Inc. (Japán)	Fuji-oligo Tetrap
8. Izomalto-oligoszacharidok	11000	Showa Sangyo (Japán) Hayashibara Shoji Inc. (Japán) Nihon Shokuhin Kako (Japán)	Isomalto-900 Panorup Biotose és Panorich
9. Ciklodextrinek	4000	Nihon Shokuhin Kako (Japán) Ensuiko Sugar Refining Co. (Japán) Asahi Kasei Kogyo Co. (Japán)	Celdex Dexy Pearl
10. Gentio-oligoszacharidok	400	Nihon Shokuhin Kako (Japán)	Gentose
11. Szójaoligoszacharidok	2000	The Calpis Food Industry Co. (Japán)	Soya-oligo
12. Xilo-oligoszacharidok	300	Suntory Ltd. (Japán)	Xylo-oligo

CRITTENDEN és PLAYNE [1996] nyomán

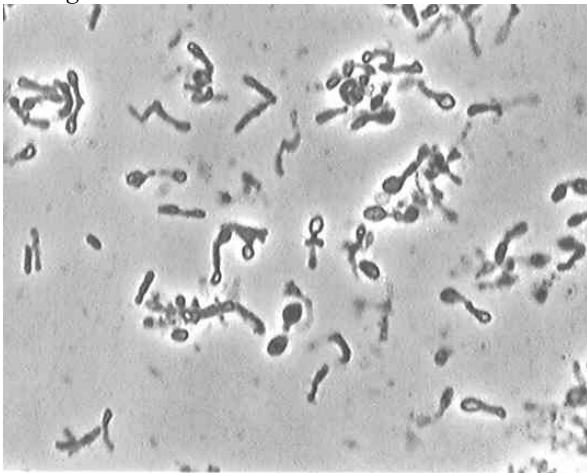
9.5 *Bifidobaktériumok fénymikroszkópos morfológiája*



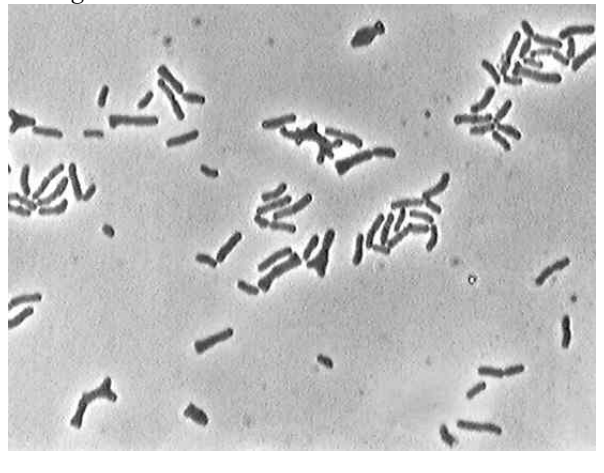
B. longum A1.2



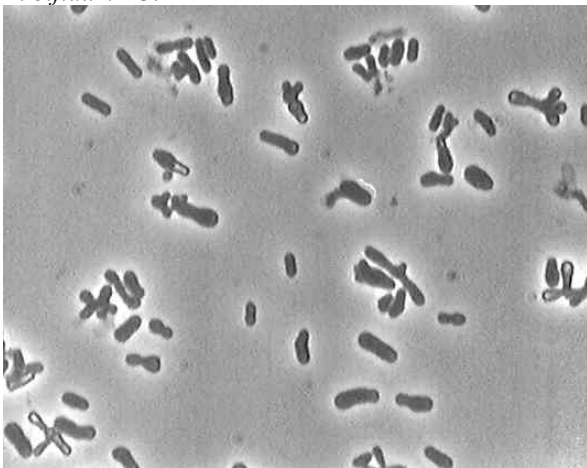
B. longum A4.3



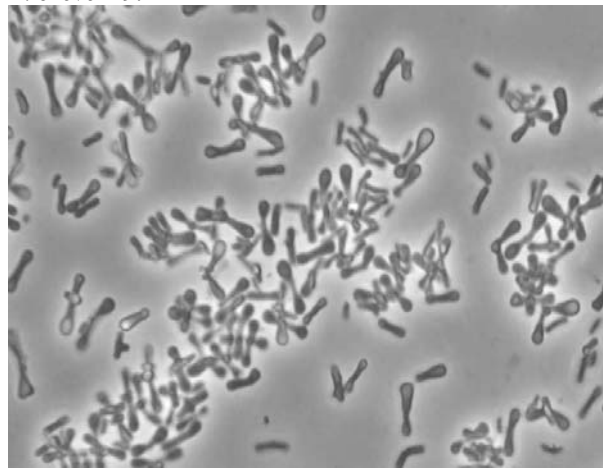
B. bifidum B3.2



B. breve B9.1



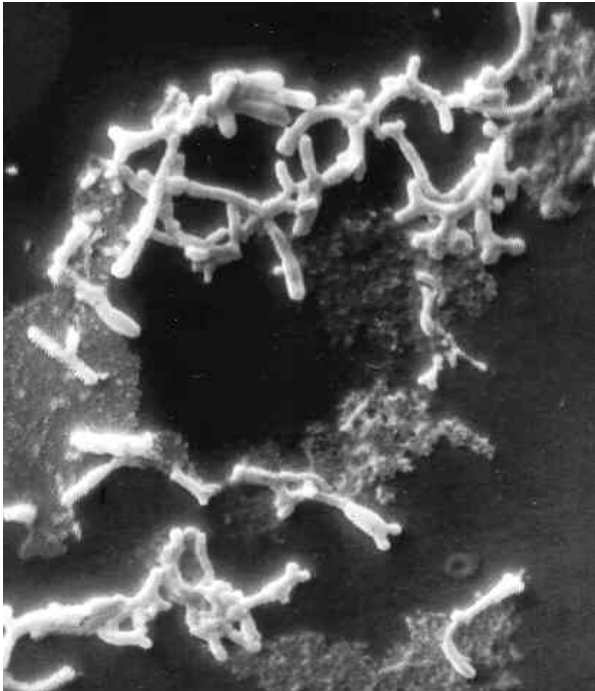
B. lactis Nestle



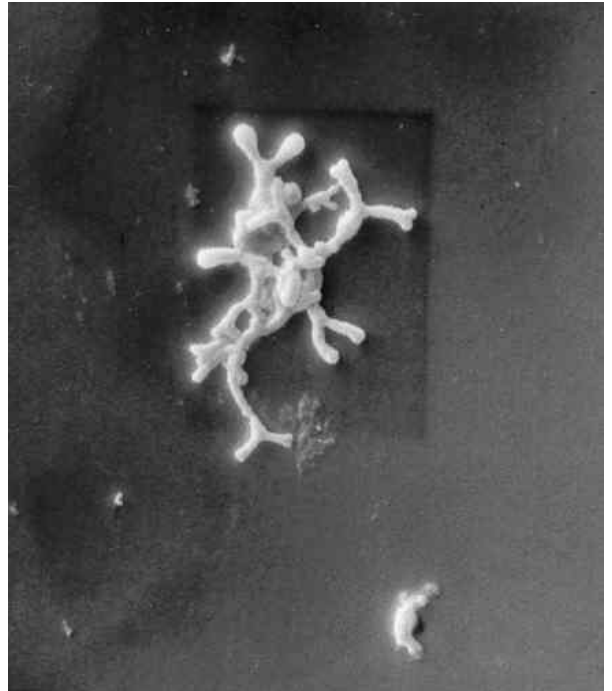
B. bifidum B7.1

Bifidobaktériumok fénymikroszkópos morfológiája, 1000x nagyítás

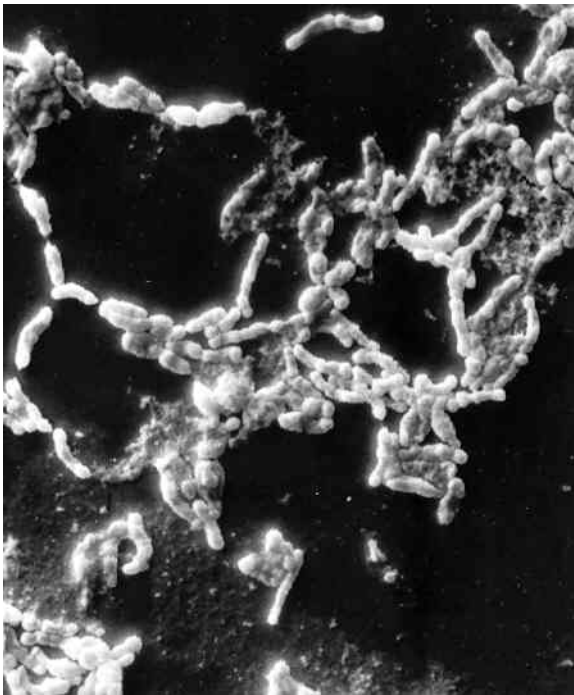
9.6 *Bifidobaktériumok elektronmikroszkópos morfológiája*



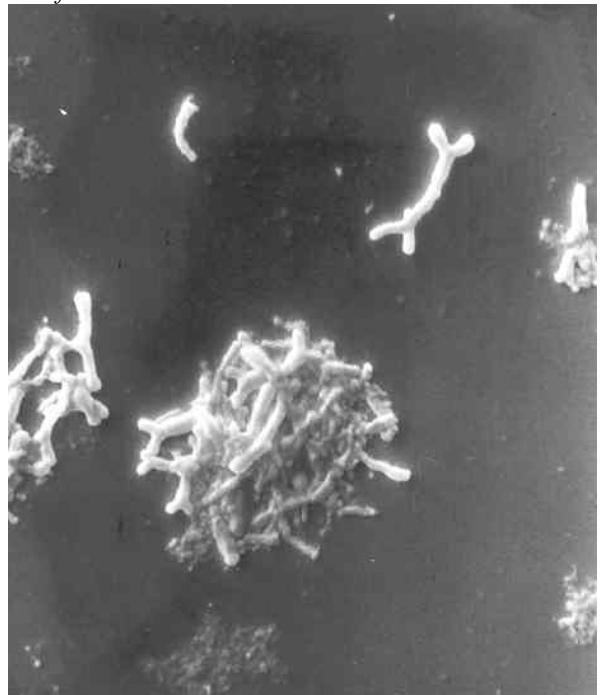
B. dentium A3.2



B. bifidum B3.2



B. pseudocatenulatum B4.1



B. bifidum B5.1

Bifidobacterium fajok elektronmikroszkópos felvételei, 2500x nagyítás

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton köszönöm **prof dr. Hoschke Ágoston** tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette kutatásaim elvégzését, valamint mindig kedves segítőkézségével támogatta kutatómunkámat.

Különösen hálás vagyok **Rezsényé dr. Szabó Juditnak**, hogy önzetlen segítségével, sokszor „minket fiatalokat” is megszégyenítő munkabíráásával, kitartásával, példamutató szorgalmával, türelmével mellettem állt és bízott bennem.

Köszönöm a **Sőr- és Szeszípari Tanszék dolgozóinak** a kellemes légkört, ahol jól lehetett dolgozni.

Különös köszönet **Bujna Erikának**, hogy segített átjutni a kezdeti nehézségeken, **Farkas Gabriellának**, aki hosszú évekig eltűrt szobatársának és **Dr. Nguyen Duc Quangnak**,

Hálás vagyok hallgatóimnak (a „bifidós lányok”-nak: **Tibol Ágnes, Balogh Teréz, Hajnal Csilla, Jákob Éva, Kondás Bea, Mészáros Izabell, Dücső Lilla**), hogy lelkesedéssel kapcsolódtak be a munkába, eredményeik ebben a dolgozatban is bemutatásra kerültek.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Bognár Csabának**, és az **OEK munkatársainak**, akik kezdetben megtanítottak az anaerob szaporítás rejtelseire és lehetővé tették a székletből való izolálást az enterogénekkel való munkát.

Köszönet **Dr. Gálfi Péter** egyetemi magántanárnak a Caco sejtvonalhoz való tapadás vizsgálatában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom **Scherer professzornak, Seiler doktornak** és a **freisingi FML Mikrobiológiai Intézet dolgozóinak** a Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiás, a 16S rDNS analízis vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

Köszönet **Koen Venema doktornak**, hogy megvalósította egyik álmom, dolgozhattam a bélrendszert szimuláló TIM modelleken.

Köszönetet szeretnék mondani **Szlávecz Ákos** okleveles villamosmérnöknek, hogy segített megírni az erjesztési vizsgálatok alapján történő azonosítás szoftverjét.

Köszönöm **barátaimnak** különösen a **Vakondok** csapatának, hogy a kezdetektől biztattak és kedves érdeklődéseikkel a sokszor számukra bizarrnak tűnő munka (székletből való izolálás) iránt, fenntartották lelkesedésemet.

Köszönöm **Szüleimnek** a szigorú, de szeretetteljes nevelést (én is így szeretném nevelni a kislányomat) és a biztos háttér nyújtását, melyre tudom mindig számíthatok.

Köszönöm **Páromnak, Kerekes Zoltánnak**, hogy mindig mellettem állt, biztatott és megértő volt a kétszer fél éves külföldi kutatómunka és a sokszor éjszakába vagy hétvégebe nyúló kísérletek iránt.

Köszönöm **Kislányomnak**, hogy olyan jó kisbaba volt, hogy be tudtam fejezni a dolgozatom megírását.