

**BUDAPESTI KÖZGAZDASÁGTUDOMÁNYI ÉS
ÁLLAMIGAZGATÁSI EGYETEM**

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

Doktori értekezés tézisei

MAYER ÁGNES

BUDAPEST

2004

1. A munka előzményei és célkitűzései

Az utóbbi évtizedekben 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. Tudományos bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy nemcsak az energia- és tápanyagbevitelnek van betegségmegelőző szerepe, hanem a táplálék más alkotórészeinek is. Azokat az élelmiszereket, melyeket ilyen pozitív élettanihatással rendelkező alkotórészeket tartalmaznak, illetve egészítenek ki, funkcionális élelmiszereknek 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 pro- és prebiotikus termékek tesznek ki, ez azt jelenti, 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 az étrend megváltoztatásával hogyan lehet befolyásolni a bélflóra összetételét. A cél az, hogy a bélben élő bifidobaktériumok és laktobacillusok számát és aktivitását növeljük.

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

valamint tapadjanak a humán bélhámsejtekhez. Ez mutatja, hogy egy probiotikus törzs ipari alkalmazásba vételét rendkívül sok kutatási, fejlesztési 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.

Kutatómunkám főbb célkitűzései

- 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 enteropatogénekkal
- Bifidobaktériumok fiziológiai tulajdonságainak jellemzése
 - Antagonista hatás enteropatogénekre
 - Tapadás humán szövettenyészethez
- Bifidobaktériumok élettani hatásának vizsgálata állatetetés kísérletekben
- Túlélési képesség vizsgálata az emésztőtraktust szimuláló kísérletekben
- Vastagbélben kifejtett hatások vizsgálata *in vitro* modell kísérletekben

2. Anyagok és módszerek

A kísérletben alkalmazott *Bifidobacterium* és enteropatogén törzsek különböző gyűjteményekből származtak.

A felhasznált vegyszerek a Sigma, Merck, Reanal, Oxoid, BBL cégektől kerültek beszerzésre.

Az anaerob tenyésztést Anaerob Jar+GasPak system-ben (Oxoid) ill. anaerob munkahelyen (Bugbox, Ruskin Technology) végeztem.

A *Bifidobacterium* törzseket NNLP, GL és DP bifidobakérium szelektív táptalajokon izoláltam.

Az izolátumokat fruktóz-6-foszfát-foszfoketoláz teszttel, erjesztési tulajdonságon alapuló mikrotiterlemezes módszerrel, Fourier Transzformációs Infravörös Spektroszkópiával és 16S rDNS analízissel azonosítottam.

A prebiotikumok hasznosítási vizsgálatánál frukto-oligoszacharidokat (Raftiline, Raftilose), laktoszukrózokat, izomalto-oligoszacharidokat (Oligotime, OligoMT, Izomalto500) és xilo-oligoszacharidokat teszteltem.

Az enteropatogénekre gyakorolt antagonista hatást *in vitro* lemezöntéses módszerrel vizsgáltam meg.

A kitapadást HeLa, HT29, Hep2 és Caco-2P sejtvonalakon vizsgáltam.

Az állatetelési kísérleteket egészséges ill. antibiotikummal kezelt egerekkel végeztem, az egyes csoportokat pro, pre és szinbiotikus élelmiszerrel etettem 4 hétig, majd vizsgáltam a bélsár mikrobiota összetételében bekövetkezett változásokat.

Az emésztőtraktuson való áthaladás során tanúsított túlélési képességet és a vastagbélben kifejtett hatásokat a hollandiai TNO Intézetében a TIM modelleken végeztem, melyek olyan *in vitro* laboratóriumi modell rendszerek melyek az emésztőrendszert szimulálják.

3. Az eredmények összefoglalása

Módszereket fejlesztettem ki bifidobaktériumok faji szintű azonosítására. Az egyik erjesztési képességét ill. argininbontását figyelembevéve, a másikat Fourier Transzformációs Infravörös spektrum (FT-IR) analízise alapján dolgoztam ki. Az erjesztési képességen ill. argininbontáson alapuló faji besorolásnál irodalmi adatok felhasználásával, valamint bifidobaktérium típus törzsek 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 biomassza 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 élelmiszer mintákból. Az egyes törzseket molekuláris biológiai módszerrel és a fenti faji azonosítási technikákkal azonosítottam, és a 32 humán valamint 27 élelmiszer eredetű *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 volt, ezekről csak azt tudtam megállapítani, hogy a *B. angulatum* csoportba tartoznak. A 27 élelmiszer eredetű izolátum közül kettő a *B. infantis/longum*, 25 törzs a *B. lactis/animalis* fajokhoz tartozik.

Megvizsgálva az egyes törzsek oligoszacharid hasznosító képességét megállapítottam, hogy az összes prebiotikumként forgalmazott oligoszacharidot, mint egyedüli szénforrást hasznosítani tudták a bifidobaktérium törzsek. Élelmiszeripari hasznosításra az oligotime szirupot ítéltem a legmegfelelőbb prebiotikumnak, mivel ez a vizsgált enteropatogén törzsek szaporodását kevésbé támogatta, mint a többi vizsgált oligoszacharid.

A bifidobaktériumok és egyes enteropatogén törzsek közötti kölcsönhatást vizsgálva néhány esetben az egyes bifidobaktériumok antagonistát hatást gyakoroltak az enteropatogén baktériumokra.

A bélsejtekhez való tapadás a probiotikus baktériumok fontos kritériuma, hiszen ezzel biztosítható, hogy ne mosódjanak ki a szervezetből. Az egyes *Bifidobacterium* törzsek tapadóképeségének 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.

Állatetelési kísérleteket végeztem, melyekben egereket pro- pre ill. szinbiotikus táplálék kiegészítést kaptak, és négy hétig vizsgáltam a bélsár 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 kísérlet során követtem a mikrobiota összetételét valamint a rövid szénláncú zsírsavak, laktát és ammónia termelődését. Legjelentősebb hatást a rövid szénláncú zsírsavak termelésében tapasztaltam. Az összes termelt rövidszénláncú zsírsavra vonatkozóan (acetát+propionát+butirát) mind a pro-, pre ill. szinbiotikumok hatását tesztelő kísérletekben több keletkezett, mint a kontroll vizsgálatban. 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.

4. Az eredmények továbbfejlesztési és hasznosítási lehetőségei

- A kidolgozott erjesztési tulajdonságokon és Fourier Transzformáció Infravörös spektroszkópiás mérésen alapuló faji besorolási módszerrel humán forrásból és élelmiszerből származó ismeretlen *Bifidobacterium* izolátumok azonosíthatók.
- A Bifidobaktériumok FT-IR spektrumkönyvtárának bővítésével –különböző helyekről izolált törzsek spektrumainak az adatbázisba történő felvételével- az azonosítási módszer jósága növelhető.
- Az izolált probiotikus *Bifidobacterium* törzsek segítségével -a kötelező engedélyek megszerzése után- táplálékkiegészítő, élelmiszeradalék, vagy probiotikus ill. szinbiotikus élelmiszerek előállíthatási technológiák dolgozhatók ki.
- Mikrokapszulázással az emésztőtraktusban való áthaladást kevésbé toleráló, de egyébként ígéretes probiotikus tulajdonságokkal (tapadási képesség, antagonistá hatás enteropatogénekre, rövid szénláncú zsírsavak fokozott termelése) rendelkező törzsek megvédhetők és probiotikus technológiákban hasznosíthatók.

5. Új tudományos eredmények

1. Módszert fejlesztettem ki a bifidobaktériumok faji besorolására erjesztési képesség ill. argininbontás alapján. Irodalmi adatok felhasználásával, valamint *Bifidobacterium* típus törzsek és izolátumok erjesztési 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 mutat azonosságot 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 élelmiszer eredetű mintákból. Az egyes törzseket molekuláris biológiai módszerrel és a fenti faji besorolási technikákkal azonosítottam, és a 32 humán, valamint 27 élelmiszer eredetű *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 élelmiszer eredetű 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 ítélem a legmegfelelőbbnek, mivel ez a vizsgált enteropatogén törzsek szaporodását kevésbé támogatta, mint a többi

vizsgált oligoszacharid. Vizsgálataim szerint egyes izolátumok antagonista hatást gyakoroltak a vizsgált enteropatogén baktériumokra. Megállapítottam, hogy egyes humán izolátumok jobban adherálnak a humán szövetnyészetekhez, mint a típustörzsek ill. az élelmiszer eredetű 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* modell rendszerben bizonyítottam, mely az emberi vastagbél működését szimulálja. Ezekben a kísérletekben vizsgáltam a mikrobiota összetételét valamint a rövid szénláncú zsírsavak, laktát és ammónia termelődését. Legkedvezőbb változást a rövid szénláncú zsírsavak termelésében tapasztaltam.

6. Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. **Á. Mayer**, J. Rezessy-Szabó, Cs. Bognár - Á. Hoschke (2003): Research for creation functional foods with bifidobacteria. *Acta Alimentaria*. **32**: (1):27-39
2. **Á. Mayer**, H. Seiler- S. Scherer (2003): Isolation of Bifidobacteria from Food and Human Faeces and Rapid Identification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Annals of Microbiology*. **53** (3): 299-313

Kutatási jelentések

1. Hoschke Á., Rezessy-Szabó J., Bujna E., **Mayer, Á.**, Bognár, Cs., Barna, Zs. (2000): Production and Evaluation of Functional Food Ingredients in Improving the Nutritional Quality of Food and Human Health. Final Report of IC-CT 96-1000.

Konferencia kiadványokban megjelent teljes terjedelmű közlemények

1. **Mayer Á.**: Bifidobaktériumok jelentősége az egészségmegőrzésben (1998), MÉTE TDK
2. **Mayer, Á.**, Rezessyné Szabó J., Bognár, Cs., Bujna, E., Hoschke Á. (1999): Isolation and Some Biological Properties of Human Intestinal Bifidobacteria. *Food Microbiology and Food Safety into the next Millennium, Proceedings of the 17th International Committee on Food Microbiology and Hygiene, Veldhoven, The Netherlands, 1999*, pp.843-848.
3. **Mayer, Á.**, Schuster-Gajzágó I., Rezessy-Szabó J., Hoschke Á. (1999): Fermentation of Pea Flour by Bifidobacteria to Prepare Functional Food, *Functional Foods- A new challenge for the food chemists Proceedings of the Euro Food Chem. X, Budapest, Hungary 1999*, pp. 607-611.
4. Rezessy-Szabó J., **Mayer Á.**, Hoschke Á. (2003): Isolation, characterisation, cultivation of bifidobacteria and their implications in food technology. *Flair Flow Workshop abstracts Functional Foods, probiotics:22-27*

Tudományos konferencián elhangzott előadások

1. **Mayer Á.**: Bifidobaktériumok jelentősége az egészségmegőrzésben OTDK, Gyöngyös, (1999)
2. **Mayer, Á.**, Rezessyné Szabó J., Bognár Cs., Bujna E, Hoschke Á. (2000): Funkcionális élelmiszer előállítását megalapozó kutatások. Lippay János-Vas Károly Nemzetközi Tud. Ülésszak Budapest
3. **Mayer, Á.**, Rezssyné Szabó J., Bognár Cs., Bujna E, Hoschke Á. (2000): A probiotikus *Bifidobaktériumok* és szaporodásukat elősegítő prebiotikumok szerepe az egészségmegőrzésben, MMT Nagygyűlés, Keszthely
4. **Mayer, Á.**, Rezessy-Szabó J., Hoschke Á. (2001): Research for creation functional foods with bifidobacteria isolated from human source. Yearly gathering: *Microbiology of the GI-tract, Bilthoven, The Netherlands*

5. Rezessyné Szabó, J., **Mayer, Á.**, Bognár, Cs., Hoschke Á. (2001): Probiotikumok és szerepük a vastagbélbetegségek megelőzésében. Enterális flóra: élettantól a kórokig. Magyar Gasztroenterológusok Társaság Colon Szekciójának Ülése, Miskolc

Tudományos konferencián bemutatott posztterek

1. **Mayer, Á.**, Bujna, E., Bognár, Cs., Rezessyné Szabó J. (1998): *Bifidobacterium* fajok morfológiai, biokémiai jellemzése és az egészségmegőrzésben betöltött szerepük. MMT Nagygyűlés, Miskolc

2. **Mayer, Á.**, Bujna, E., Bognár, Cs., Rezessyné Szabó J. (1998): Funkcionális élelmiszerek kialakításának lehetőségei Lippay János-Vas Károly Nemzetközi Tud. Ülésszak, Budapest

3. **Mayer, Á.**, Seiler, H., Scherer, S. (2000): *Bifidobacteriumok* azonosítása Fourier Transzformációs (FTIR) Spektroszkóppal Lippay János-Vas Károly Nemzetközi Tud. Ülésszak Budapest

4. **Mayer, Á.** -Venema, K. (2002): Survival and mode of action of bifidobacteria from human origin in TNO's in vitro gastrointestinal tract models. Croatian, Hungarian and Slovenian Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology, Opatija, Croatia

5. **Mayer, Á.**, Rezessy-Szabó J., Kondás B., Hoschke Á. (2003): *Bifidobacterium bifidum* B7.1 isolated from human origin is a promising probiotic strain. 1st FEMS Congress of the European Microbiologists, Ljubljana, Slovenia

6. **Mayer, Á.**, Dücső, L., Mészáros, I., Rezessy-Szabó, J., Hoschke, Á. (2003): Mass Propagation and Immobilization of *Bifidobacteria*. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary

7. **Mayer, Á.**, Mészáros, I., Dücső, L., Rezessyné Szabó, J., Hoschke, Á. (2003): Probiotikus bifidobaktériumok formulázása és tartósítása. Lippay János –Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest

8. Kun, Sz., Rezessy-Szabó, J.M., **Mayer, Á.**, Nguyen, D.Q., Hoschke, Á. (2004): Cultivation of Probiotic *Bifidobacterium* Strains in Synthetic and Natural Media. "nd Central European Congress of Food, Budapest, Hungary