



Élelmiszertudományi Kar

LAKTOBACILLUSZOK VIZSGÁLATA TOVÁBBFEJLESZTETT KOLORIMETRIÁS MÓDSZERREL

Hegyí Ferenc

Doktori értekezés

Készült a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Biológiai Osztályán

Jogutódja: Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ
Élelmiszertudományi Kutatóintézet
Biológiai Osztály

Budapest

2014

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Felföldi József, PhD**

Egyetemi tanár

Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,

Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: **Dr. Halász Anna, DSc**

Tudományos tanácsadó

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2014. június 03-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS

Tagjai

Takács Krisztina, PhD

Kukolya József, PhD

Rezessyné Szabó Judit, PhD

Beczner Judit, CSc

Belák Ágnes, PhD

Opponensek

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD

Varga László, PhD

Titkár

Takács Krisztina, PhD

1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
2.1. Tejsavbaktériumok általános jellemzése	10
2.1.1. <i>Lactobacillus</i> -ok	12
2.1.2. Probiotikumok	14
2.1.3. Tejsavbaktériumok anyagcséréje.....	17
2.1.4. Tejsavbaktériumok antimikrobás metabolitjai	18
2.1.4.1. Szerves savak.....	18
2.1.4.2. Etanol.....	19
2.1.4.3. Hidrogén-peroxid	19
2.1.4.4. Széndioxid	19
2.1.4.5. Diacetil	20
2.1.4.6. Kis molekulatömegű antimikrobás vegyületek	20
2.1.4.7. Bakteriocinek.....	20
2.1.4.8. Megtapadás gátlás.....	23
2.2. Mikrobiológiai vizsgálati módszerek	23
2.2.1. A mintaelőkészítés és -kezelés fejlődése.....	24
2.2.2. Az összes élő sejtszám meghatározás módszereinek fejlődése	25
2.2.3. Tenyésztésen alapuló módszerek.....	27
2.2.4. Mikrobaszám becslés közvetett módszerei	28
2.2.4.1. Indirekt kémiai módszerek	29
2.2.4.2. Indirekt fizikai módszerek	30
2.2.4.3. Immunológiai módszerek	30
2.2.4.4. Molekuláris biológiai módszerek	31
2.2.4.5. Bioszenzorok	33
2.3. Tetrazólium sók és formazán kristályok alkalmazása élősejtszám meghatározásra	34
2.3.1. Történelmi áttekintés	34
2.3.2. 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) kolorimetriás módszer.....	36
2.4. Fehérje elválasztási és tisztítási módszerek.....	38
3. CÉLKITŰZÉSEK	39
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	40
4.1. Vizsgált <i>Lactobacillus</i> törzsek.....	40
4.2. Alkalmazott táptalajok és összetételük.....	41
4.3.1. Turbiditás mérésen alapuló módszer	43
4.3.2. Telepszámlálós módszer	43
4.3.3. Agardiffúziós módszer (Lyuk-teszt).....	44
4.3.4. MTT kolorimetriás módszer.....	44
4.3.5. PCR technika	45
4.3.5.1. DNS izolálás.....	45
4.3.5.2. A DNS izoláláshoz szükséges oldatok és reagensek	45
4.3.5.3. Módosított Wizard módszer	45
4.3.5.4. Az izolált DNS tisztaságának meghatározása	46
4.3.5.5. Polimeráz láncreakció	47
4.3.5.6. A laktobacillusok szelektív kimutatására, valamint a plantaricin gént tartalmazó törzsek megkülönböztetésére felhasznált primerek.....	47
4.3.5.7. A polimeráz láncreakció reagensei.....	47

4.3.5.8. A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált reakcióelegy összetétele	48
4.3.5.9. A laktobacillusok szelektív kimutatására, és a plantaricin-gént tartalmazó törzsek azonosítására alkalmas PCR reakció paraméterei	48
4.3.5.10. Gélelektroforézis	49
4.3.6. Gélkromatográfia	50
4.3.6.1. Szűrőoszlop készítése	50
4.3.6.2. A vizsgálat menete	51
4.3.7. Fehérjék elválasztása és kimutatása SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE)	51
5. EREDMÉNYEK	53
5.1. MTT kolorimetriás módszer adaptálása és alkalmazása	53
5.1.1. A táptalaj redukáló hatása	54
5.1.2. Az inkubációs idő és az MTT koncentráció kiválasztása <i>Lactobacillus</i> -ok dehidrogenáz enzimaktivitásának méréséhez	55
5.1.3. A legkedvezőbb sejtkoncentráció meghatározása	56
5.1.4. MTT módszer alkalmazása mikrotiter lemezen	56
5.1.5. MTT redukáló képesség vizsgálata különböző törzsek esetében	58
5.1.6. A táptalaj hatása az enzimaktivitásra	59
5.1.7. A pH hatásának vizsgálata	62
5.1.8. Élő és holt sejtek enzimaktivitásának vizsgálata	63
5.1.9. Céklalében szaporított tejsavbaktériumok enzimaktivitásának, sejtszámának és a zöldséglé színváltozásának vizsgálata	65
5.1.10. Bakteriocin (nizin) érzékenység vizsgálata	68
5.1.11. Agardiffúziós módszer	68
5.1.12. Turbiditás mérésen alapuló módszer	70
5.1.13. MTT kolorimetriás módszer	72
5.2. Az MTT módszer teljesítményjellemzőinek meghatározása	73
5.2.1. Szelektivitás	74
5.2.2. Linearitás	74
5.2.3. Érzékenység	76
5.2.4. Kimutatási határ	77
5.2.5. Meghatározási határ	77
5.2.6. Méréstartomány	78
5.2.7. Pontosság	78
5.3. PCR eredmények	79
5.3.1. A DNS izolálás eredményei	79
5.3.2. A PCR optimálás eredményei	80
5.3.3. <i>Lactobacillus</i> -ok azonosítása PCR technikával	82
5.3.4. Plantaricin-gén jelenlétének vizsgálata <i>Lactobacillus</i> törzsekben PCR technikával ..	84
5.4. Gélkromatográfia eredményei	85
5.5. Fehérje kimutatás eredménye	89
5.6. A detektált fehérje gátló hatásának igazolása	90
5.7. Új tudományos eredmények	91
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	92
7. ÖSSZEFOGLALÁS	93
8. SUMMARY	96
9. MELLÉKLETEK	99

M1. IRODALOMJEGYZÉK	99
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	112

1. BEVEZETÉS

Nem túlzás kijelenteni, hogy az utóbbi 30 év alatt szinte forradalom játszódott le a mikrobiológiában. Jóllehet ez még kevésbé ismert, még kevésbé értékelt, következményei mégis új távlatokat és lehetőségeket nyitnak az orvostudományban, a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban is. Az új, elsősorban molekuláris biológiai módszerek és eljárások feltárták, hogy a földi életformák túlnyomó része a mikrodimenziókban teljeseedik ki. A vírusok, baktériumok, gombák, algák, protozoonok sokfélesége messze felülmúlja a makroorganizmusok, a növény- és állatvilág mégoly gazdag és sokkal jobban ismert változatosságát.

Az új, még felfedezésre, megismerésre váró mikroorganizmusokban a genetikai sokoldalúság és anyagszere-képesség gazdag tárháza rejlik. Ennek feltárása messzeható következményekkel fog járni, és kihat a gyakorlati élet számos területére, mint amilyenek a mezőgazdasági termelés fokozása, az élelmiszerek megőrzése, azok biztonságának és minőségének javítása, új, hatékony gyógyszerek előállítása, a hulladékok újrahasznosítása, a környezetkárosító szennyeződések ártalmatlanítása.

Nagy általánosságban azt mondhatjuk, hogy az élelmiszerekben és alapanyagokban lévő mikroorganizmusok elszaporodva rontják a termék minőségét, romlást okoznak, de számos esetben hozzájárulhatnak a termék jellegéhez, sőt javítják annak eltarthatóságát, élvezeti értékét és a fogyasztó egészségére is jótékony hatást fejtenek ki. Az élelmiszer mikrobiológiai vizsgálatok kiterjednek az alapanyagok, a feldolgozási vonal és végtermékek vizsgálatára, de az élelmiszerlánc szemlélet érvényesítése szükségessé teszi a környezet mikrobiológiai állapotának vizsgálatát, valamint a szállítás és forgalmazás során végbemenő mikrobiológiai változások monitorozását is a fogyasztók számára biztonságos és megfelelő élelmiszerek előállítása érdekében.

Számos ma is használt mikrobiológiai vizsgálati módszer több mint száz éve alakult ki. Világszerte a vizsgálatok millióit végzik évente ezekkel a hagyományos tenyésztési módszerekkel annak ellenére, hogy idő- munka- és anyagigényesek, illetve az eredmény gyakran csak több napos vizsgálatssorozat után értékelhető (DEÁK, 2006a; DEÁK, 2006b). Emiatt a hagyományos tenyésztési élősejt számlálási módszerek nem alkalmasak arra, hogy a proaktív és megelőző jellegű, korszerű minőségsszabályozás igényeinek megfelelően gyors, hatékony beavatkozást lehetővé tevő módon jussunk a mikrobiológiai eredményekhez. A módszerek korszerűsítésének mozgatórugója, hogy az élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága világszerte növekvő gondot jelent, s alkalmazkodni kell a vizsgálati módszerekkel is a változó élelmiszertermelési, feldolgozási és forgalmazási viszonyokhoz. Fontos lehet még a

különböző okokból károsodott, szaporodásra képtelen, de mégis élő mikroorganizmusok megbízható kimutatása. Mindezek a megváltozott igények azt követelik meg, hogy gyorsabban, több mintából, kevesebb élő munkával, olcsóbban és mégis informatívabban jussunk eredményekhez. Ezeknek az igényeknek a kielégítésére a mikrobiológia számos társtudomány és szakterület eszköztárát hívhatja segítségül, mint például az analitikai kémiát, a fizikai kémiát vagy az enzimológiát, az immun-biokémiát, a biotechnológiát, sőt a molekulárbiológia és génszabvány eredményeit is, mind pedig a szenzor- és műszerfejlesztést, valamint az elektronika és számítástechnika eszköztárát, amelyek segítségével a korszerű mikrobiológiai módszerek képesek a mikroba-biomassza szelektív kimutatására, a mikrobaszaporodás, illetve anyagcsere-termékeik meghatározására (FARKAS, 1998).

A műszeres módszerek érzékenysége, vagyis a kimutatható sejtkoncentráció alsó határa sajnos még jelentősen elmarad a klasszikus tenyésztési eljárásokétól, illetve azok érzékenységének növelése általában a vizsgálatok időigényének a növekedését vonja maga után. A további fejlesztésekben nagy hangsúlyt fektetnek a gyorsmódszerek érzékenységének növelésére és specifikusságának fokozására, valamint az élő, de nem tenyészthető („VNC = *viable but non culturable*”) sejtek kimutathatóságára.

A tejsavbaktériumok és köztük a *Lactobacillus*-ok évezredek óta közeli kapcsolatban állnak az emberrel, amely nem annyira meglepő, mivel ezek a mikroorganizmusok a környezetünkben számos helyen megtalálhatóak, mint például a növények felszínén, a talajban és még az emberi béltraktusnak is szerves részét képezik, amelyek így nagymértékben hozzájárulnak az egészséges immunrendszer fenntartásához és az emésztési folyamatokat is segítik. A *Lactobacillus*-ok jótékony hatásukat az anyagcseréjük során termelt elsődleges és másodlagos anyagcsere-termékeik segítségével fejtik ki. Már időszámításunk előtti korszakokban kihasználta az ember ezeket az előnyös tulajdonságokat, zöldség, hús és tej fermentációjára is, így hosszabította meg az élelmiszereik eltarthatóságát. Az élelmiszerek eltarthatóságának meghosszabításán túl, élvezeti értéküket és emészthetőségüket is nagymértékben növelik e mikroorganizmusok.

Mindezen áldásos tevékenységükön felül, a napi rendszerességgel megfelelő mennyiségben fogyasztott, laktobacillust tartalmazó, úgynevezett probiotikus élelmiszerek bizonyítottan javítják az immunrendszerünk működését, illetve számos betegség kialakulásának kockázatát csökkentik.

„Nincs a baktériumoknak még egy olyan csoportja, amely az emberrel olyan sokoldalú viszonyban állna, mint a tejsavbaktériumok. Ezért fontos és szükséges őket jobban megismerni” (DEÁK, 2005).

Ezért munkám céljául azt tűztem ki, hogy a *Lactobacillus* nemzetség tagjaiból molekuláris biológiai módszer segítségével szelektálok bakteriocin termelő törzseket, illetve a bakteriocin gátló aktivitásának mérésére kidolgozok egy dehidrogenáz enzimaktivitás mérésen alapuló kolorimetriás gyorsmódszert, amely a mikroorganizmusok élősejtszámának gyors kimutatását is lehetővé teszi.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Tejsavbaktériumok általános jellemzése

A „tejsavbaktériumok” név nem rendszertani kategória, hanem közös anyagszere és élettani sajátosságokkal rendelkező baktériumcsoportok gyűjtőneve. Az ide tartozó baktériumok általánosan Gram-pozitívak, a Firmicutes osztályába az endospórás bacillusok és klosztridiumok társaságába tartoznak, nem spóráképző, pálca vagy gömb alakú organizmusok, amelyek szénhidrátokat és magasabb rendű alkoholokat erjesztenek, főként tejsavvá. Már Pasteur ideje óta ismert baktériumok, amelyek fontos szerepet játszanak az élelmiszerek fermentációjában, ártalmatlan, sőt hasznos lakói az emberi és állati szervezetnek, kis részük azonban kórokozó (KANDLER, 1983; DEÁK, 2005; SLOVER, 2008). Ezen heterotróf baktériumok közé tartozó mikroorganizmusok közös jellemzője, hogy kizárólag tejsavas erjedéssel történő energianyerésre képesek. Az oxigénhez való viszonyuk különleges. Mint obligát erjesztők, valójában anaerobok, de elviselik az oxigén jelenlétét is, tehát aerob körülmények között is erjesztenek, szaporodnak, ezért aerotoleráns anaeroboknak, olykor helytelenül fakultatív aeroboknak vagy mikroaerofileknek nevezik őket. Aerob oxidációra azonban képtelenek, mivel légzési enzimszisztémájuk nem teljes. Erre utal kataláz-negatív mivoltuk (DEÁK, 2005).

Az újabb, molekuláris filogenetikai osztályozás alapján a tejsavbaktériumok nemzetségeibe tartozó több fajról is megállapították, hogy a korábbi osztályozási szempontok alapján besorolt helyük megkérdőjelezhető. Így a korábban létrehozott nemzetségekből újak keletkeztek, illetve a már meglévők kibővültek új fajokkal. Ilyenek a *Carnobacterium* (korábban atípusos *Lactobacillus* fajok), az *Enterococcus*, *Lactococcus* és *Vagococcus* (korábban *Streptococcus*), az *Oenococcus* (korábban *Leuconostoc*) a *Tetragenococcus* (korábban *Pediococcus*) és a *Weissella* (korábban *Leuconostoc* és *Lactobacillus*), illetve új nemzetségeket is leírtak, mint például az *Abiotrophia*, *Helcococcus*, *Desemzia* (DEÁK, 1979; AXELSSON, 1998; DEÁK, 2005).

A tejsavbaktériumok hagyományos osztályozásánál a közös alaktani és élettani bélyegeket vették figyelembe. Ez nagyrészt a morfológián, a glükóz fermentációjának módján, a különböző hőmérsékleten való szaporodásukon, a termelt tejsav konfigurációján, a magas só koncentráció melletti szaporodási képességén, illetve savas és lúgos környezet toleranciáján alapszik (ORLA-JENSEN, 1919; AXELSSON, 1998; DEÁK, 2005), amely később kibővült a sejtfal összetétel jellegzetességeivel is. Azonban a tejsavbaktériumok taxonómiájában a drámai változást a molekuláris genetikai vizsgálatok eredményezték, mint

például a DNS összetételében szereplő guanin és citozin mol %-tartalmának a meghatározása, a DNS:DNS hibridizáció, illetve a riboszómális RNS (rRNS) szerkezetének és szekvenciájának a tanulmányozása (STILES & HOLZAPFEL, 1997).

A *Bifidobacterium*ok a tejsavbaktériumokkal közeli rokonságot mutatnak, velük gyakran közös élőhelyen fordulnak elő, mégis a köztük lévő filogenetikai távolság miatt más rendszertani csoportba sorolhatóak. A tejsavbaktériumok rendszerezésének áttekintését mutatja be az 1. táblázat.

1. táblázat: A tejsavbaktériumok rendszerezésének áttekintése a családok és nemzetségek szintjén, a baktériumok rendszertani kézikönyvének 2001-es kiadása szerint. Zárójelben a nemzetségekhez tartozó fajok száma (DEÁK, 2005)

1. <i>Lactobacillaceae</i> <i>Lactobacillus</i> (80) <i>Pediococcus</i> (6)	3. <i>Carnobacteriaceae</i> <i>Carnobacterium</i> (8) <i>Agitococcus</i> (1) <i>Alloicoccus</i> (1) <i>Desemzia</i> (1) <i>Dolosigranulum</i> (1) <i>Trichococcus</i> (3)	5. <i>Leuconostocaceae</i> <i>Leuconostoc</i> (10) <i>Oenococcus</i> (1) <i>Weisella</i> (9)
2. <i>Aerococcaceae</i> <i>Aerococcus</i> (5) <i>Abiotrophia</i> (1) <i>Dolosicoccus</i> (1) <i>Granulicatella</i> (3) <i>Helicococcus</i> (1) <i>Alloicoccus</i> (1) <i>Eremococcus</i> (1) <i>Faclamina</i> (5) <i>Globicatella</i> (2) <i>Ignavigranum</i> (1)	4. <i>Enterococcaceae</i> <i>Enterococcus</i> (30) <i>Mellisococcus</i> (1) <i>Tetragenococcus</i> (2) <i>Vagococcus</i> (5)	6. <i>Streptococcaceae</i> <i>Streptococcus</i> (60) <i>Lactococcus</i> (5)

A molekuláris szempontok szerint alkotott nemzetségeket csak részben jellemzik közös alaktani és élettani bélyegek, amelyeket a tejsavbaktériumok osztályozásánál hagyományosan figyelembe vettek (SCHLEIFER & LUDWIG, 1995).

2. táblázat: Tejsavbaktérium nemzetségekre jellemző alaki és élettani tulajdonságok (AXELSSON, 1998; DEÁK, 2005)

Nemzetség	Alak	CO ₂ képzés	Tejsav típus	Szaporodás					
				10°C	45°C	6,5%NaCl	18%NaCl	pH4,4	pH9,6
<i>Lactobacillus</i>	pálca	+/-	D,L, DL	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-
<i>Carnobacterium</i>	pálca	-	L	+	-	+/-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	kokkusz	-	L	+	+	+	-	+	+
<i>Lactococcus Vagococcus</i>	kokkusz	-	L	+	-	-	-	+/-	-
<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	kokkusz	+	D	+	-	+/-	-	+/-	-
<i>Pediococcus</i>	tetrád	-	L,DL	+/-	+/-	+/-	-	+	-
<i>Streptococcus</i>	láncc	-	L	-	+/-	-	-	-	-
<i>Tetragenococcus</i>	tetrád	-	L	+	-	+	+	-	+
<i>Weisella</i>	kokkusz, pálca	+	D,DL	+	-	+/-	-	+/-	-

A tejsavbaktériumok legnagyobb fajszaú és leginkább vizsgált nemzetsége a *Lactobacillus*-oké (DEÁK, 1979; DEÁK, 2005). Ahogyan azt a 2. táblázat mutatja az ide tartozó baktériumok pálca alakúak, hetero- és homofermentatív erjesztés módozatai is jellemzőek rájuk, illetve az optikai forgatóképesség szerinti mindkét típusú tejsavat külön, illetve egyszerre is (D, L, DL) képezhetnek (KANDLER, 1983). A szaporodási körülmények szempontjából akár a 10 °C és 45 °C hőmérséklet is megfelel számukra, a 6,5 % NaCl koncentrációt is képesek lehetnek elviselni, illetve számos fajuk akár a 4 alatti pH értéken is szaporodik.

2.1.1. *Lactobacillus*-ok

A tejsavbaktériumok legfajgazdagabb nemzetségeként, mint nem spóráképző, Gram-pozitív, pálca alakú, heterogén csoportját tartják számon. A *Lactobacillus*-ok klasszikus felosztása az erjesztési módjuk szerint történt. Ezek alapján lehetnek obligát homofermentatívok, obligát heterofermentatívok, illetve fakultatív heterofermentatívok (STILES & HOLZAPFEL, 1997). Az első esetben az erjedés biokémiai útja a glikolízis, amely során csak tejsav kéletkezik, míg a második erjesztési mód esetén a glükózból a 6-foszfoglükonsav-foszfoketoláz úton (a sejtekből hiányzik a glikolízis kulcsenzime) szén-dioxid és egyéb termékek is képződnek a tejsav mellett. A harmadik típusú erjesztés során a hexózok erjesztése glikolízissel, a pentózoké viszont a másik úton történik; glükózból nem, de glükonsavból gázt képeznek (DEÁK, 2005). Erjesztési módjuk szerint számos az első két csoportba tartozó, illetve néhány a második csoportba tartozó *Lactobacillus* törzset használnak fermentált élelmiszerekben,

azonban a harmadik, fakultatív heterofermentatív csoportba tartozó *Lactobacillus*-ok közül számos élelmiszerromlással is kapcsolatba hozható (AXELSSON, 1998).

A *Lactobacillus* nemzetség fermentációs tulajdonságokon alapuló fő csoportjait, és néhány ide tartozó fajt a 3. táblázatban mutatom be. Kiemeltem az általam későbbiekben vizsgált törzsek fajait.

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

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

A *Lactobacillus* nemzetség heterogén mivolta a DNS-ük G+C mol% összetételében is megmutatkozik. Az általánosan elfogadott, egy nemzetségbe sorolható törzsek G+C mol% összetétele közötti különbség nem haladhatja meg a 10 %-ot, azonban a *Lactobacillus*-ok esetében ez akár a duplája is lehet, mivel DNS-ükben a G+C összetétel 33-55 mol% között mozog (SCHLEIFER & LUDWIG, 1995). Ebből adódóan a molekuláris bélyegek alapján 8 filogenetikai csoportot is megkülönböztetnek, amelyeket egy-egy jellemző fajról neveztek el (DEÁK, 2005; STILES & HOLZAPFEL, 1997). A filogenetikai csoportokat és azok az erjesztési módoszataihoz tartozó fajok számát a 4. táblázatban mutatom be.

4. táblázat: *Lactobacillus* fajok filogenetikai csoportjai és erjesztési módozatai (DEÁK, 2005)

Filogenetikai csoport	Jelentősebb fajok	Erjedési mód szerinti fajok		
		Homofermentatív	Fakultatív	Heterofermentatív
<i>Lb. bruchneri</i>	<i>fructivorans, hilgardii, lindneri</i>	0	1	11
<i>Lb. casei</i>	<i>rhamnosus, sharpea, paracasei</i>	3	4	0
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>acidophilus, crispatus, helveticus</i>	14	5	0
<i>Lb. plantarum</i>	<i>alimentarius, farciminis, pentosus</i>	1	7	2
<i>Lb. reuteri</i>	<i>fermentum, vaginalis</i>	0	0	12
<i>Lb. sakei</i>	<i>curvatus, graminis</i>	0	4	0
<i>Lb. salivarius</i>	<i>mali, murinus, agilis</i>	7	5	0
<i>Lb. coryniformis</i>	<i>brevis, bif fermentans</i>	0	3	1

A tejsavbaktériumoknak és köztük a *Lactobacillus* törzseknek számos olyan képviselőjét tartják számon, amelyek az élelmiszerekben az élvezeti értékek és eltarthatóság növelésén túl bizonyítottan jótékony hatással vannak a fogyasztók egészségére.

2.1.2. Probiotikumok

A probiotikus kifejezést, ami annyit tesz, hogy az „életért”, az 1960-as években Lilly és Stillwell alkotta meg (SENOK et al., 2005). A probiotikumok definíció szerint élő mikroorganizmusok (élesztőgombák vagy baktériumok), amelyek megfelelő mennyiségben történő fogyasztása jótékonyan hat a gazdaszervezet egészségére (FAO/WHO, 2002). A napi rendszerességgel, megfelelő mennyiségben (minimum 10^9 sejt/nap, ez a mennyiség 1 deciliter probiotikus ital fogyasztásával érhető el amennyiben az 10^7 sejt/ml koncentrációban tartalmaz probiotikus baktériumot) fogyasztott probiotikus mikroorganizmusok számos egészségre gyakorolt pozitív hatást fejtenek ki (LUCKOW & DELAHUNTY, 2004). Ezek a bizonyítottan előnyös hatások széleskörűek lehetnek, mint például a laktóz intolerancia tüneteinek enyhítése, a vércholeszterin csökkentése, az immunrendszer stimulálása, az allergiás tünetek csökkentése, a gasztrointesztinális fertőzések megelőzése, illetve kezelése, valamint a vastagbélrák kockázatának csökkentése és az atópiás dermatitisz megelőzése (AVONTS et al., 2004; KUSHARYATI et al., 2011; NUALKAEKUL & CHARALAMPOPOULOS,

2011). Probiotikumként széleskörűen a Gram-pozitív baktériumok két fő nemzetségét, a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetség tagjait alkalmazzák, azonban az *Escherichia*, *Enterococcus* és *Saccharomyces* nemzetségekbe sorolható fajokat is forgalomba hoznak probiotikumként (HOLZAPFEL et al., 2001; ROLFE, 2000). A jelenlegi kutatási eredmények azt mutatják, hogy a probiotikus hatások törzs-specifikusak, tehát ha egy törzs előnyös hatásokat mutat, akkor sem feltételezhető, hogy egy másik törzs is hasonló tulajdonsággal bír, annak ellenére, hogy azonos fajhoz tartoznak (SENOK et al., 2005). Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) valamint az Egészségügyi Világszervezet (WHO) iránymutatásai alapján az élelmiszerekben alkalmazott probiotikus mikroorganizmusoknak képesnek kell lenniük túlélni az emésztőcsatornán történő áthaladást, azaz ellenállónak kell lennie a gyomornedvekkel, illetve az epesavval szemben. Továbbá képesnek kell lenniük megtelepedni és elszaporodni az emésztőrendszerben. Ezen túlmenően biztonságosnak és hatásosnak kell lenniük, valamint ezt a pozitív hatást a fermentált termék eltarthatósági idejének egészen a végéig meg kell őrizniük (FAO/WHO, 2002).

Az élelmiszer- és a gyógyszeriparban a probiotikumok legfontosabb képviselői a tejsavbaktériumok. Az 5. táblázatban összefoglalom az élelmiszeriparban, állattakarmányozásban és a gyógyszeriparban leggyakrabban alkalmazott probiotikus baktériumokat.

5. táblázat: Leggyakrabban alkalmazott probiotikus baktériumok az élelmiszeriparban, állattakarmányozásban és a gyógyszeriparban (HOLZAPFEL et al., 2001; GIRAFFA et al., 2010)

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Egyéb
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lb. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>Lb. fermentum</i>		
<i>Lb. gasseri</i>		
<i>Lb. johnsonii</i>		
<i>Lb. paracasei</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. rhamnosus</i>		

Legnagyobb számban a *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó fajok szerepelnek, amely szintén igazolja, hogy a tejsavbaktériumok legfejgazdagabb nemzetségéről van szó és széleskörben alkalmazhatóak az élelmiszeriparban, állattakarmányozásban és a gyógyszeriparban egyaránt.

2.1.3. Tejsavbaktériumok anyagcseréje

A tejsavbaktériumok a szaporodásukhoz, életfolyamataikhoz szükséges energiát a tejsavas fermentáción keresztül, a szénhidrátok tejsavvá alakítása során nyerik. Ehhez alapvetően két fő útvonalat használnak: a glikolízist (Embden–Meyerhof út) vagy a 6-foszfoglükonát/foszfoketoláz útvonalat. Az előbbit a homofermentatív, utóbbit a heterofermentatív törzsek használják. A homofermentatív törzsek azonos mennyiségű glükózból kétszer akkora mennyiségben termelnek tejsavat, mint a heterofermentatív törzsek, míg az utóbbiak a tejsav mellett ecetsavat és szén-dioxidot is képeznek. E két savat termelik legnagyobb mennyiségben, ezek játsszák a fő szerepet a termékek savanyításában és tartósításában. Mind az ízhatás, mind az antimikrobás hatás vonatkozásában előnyösebbek a heterofermentatív metabolizmussal rendelkező tejsavbaktériumok, mivel a tejsav mellett ecetsavat is termelő baktériumok karakteresebb ízvilágú terméket képeznek, valamint a szinergista hatás miatt együttesen erősebb az antimikrobás hatásuk is (KANDLER, 1983; AXELSSON, 1998).

A szerves savak mellett fontos és különleges szerepe lehet a laktobacillusok antimikrobás aktivitásában az általuk termelt fehérje jellegű, antibakteriális anyagoknak, az ún. bakteriocineknek. A tejsavbaktériumok által termelt bakteriocinek olyan riboszómáisan szintetizált és extracellulárisan kiválasztott, elsődleges vagy módosított, fehérje jellegű, általában 30-60 aminosavból álló peptidek vagy peptidkomplexek, amelyeknek baktericid vagy bakteriosztatikus hatása van rokon fajokkal szemben. Aktivitásuk viszonylag szűk spektrumú, többnyire csak a saját vagy a közeli rokon fajokra fejtik ki hatásukat. Hatásmechanizmusukat tekintve főként a célorganizmus sejtmembránjában képzett pórusok által fejtik ki gátló aktivitásuk. E bioaktív fehérjejellegű anyagok genetikailag kódoltak, mely gének kromoszómán, plazmidon vagy transzpozonon helyezkedhetnek el, ahol a bakteriocin termeléséért és a termelő sejt immunitásáért felelős gének egy operonban csoportosulnak. Egy ilyen operon kódolja általában a bakteriocin szerkezeti peptidjeit, a bakteriocin membránon keresztüli transzportját és a termelő törzs számára immunitást biztosító fehérjét, a szabályozó fehérjét, valamint a módosuló bakteriocinek esetén az aktívvá válás folyamatának enzimeit, illetve a segítő fehérjét (CAPLICE & FITZGERALD, 1999; CHEN & HOOVER, 2003). A *Lactobacillus* fajok termel(het)nek antifungális fehérjejellegű anyagokat is, de ezen anyagok tulajdonságaikban igen különböznek egymástól, s gyakran nem lehet kategórikusan elkülöníteni őket a bakteriocinektől.

2.1.4. Tejsavbaktériumok antimikrobás metabolitjai

A tejsavbaktériumok azon tulajdonságát, miszerint képesek mikrobaellenes anyagokat termelni, az emberiség már hosszú ideje kihasználja élelmiszerek tartósítására.

A sumérok már időszámításunk előtt 6000-ben fermentáció segítségével tartósították a tejet. A hús fermentációjának módszerét az időszámításunk előtti 15. századi Babilóniában és Kínában dolgozták ki. A zöldségek fermentálása is ismert volt Kínában már az i.e. 3. évszázadban (PEDERSON, 1971). Napjainkban is számos élelmiszer élvezeti és beltartalmi értékeinek, eltarthatóságának növelése, illetve emészthetőségének javítása céljából alkalmazzák a tejsavbaktériumokat az élelmiszeriparban.

Anyagcseretermékeik segítségével a tejsavbaktériumok gátolhatják a versengő mikrobióta résztvevőinek szaporodását és így az élelmiszerekben romlást okozó mikroorganizmusok számát is csökkenthetik. A tejsavbaktériumok által termelt antimikrobás anyagok közé tartoznak a szerves savak, hidrogén peroxid, diacetil (MESSENS & DE VUGST, 2002), az antifungális anyagok, mint például különböző zsírsavak, fenil-tejsav (LAVERMICOCCA et al., 2000), illetve az elsődleges gátló anyagcseretermékek mellett számos egyéb antimikrobás anyag, köztük bakteriocinek termelésére is képesek a tejsavbaktériumok (DE VUGST & VANDAMME, 1994). Azonban nem szabad elfelejtenünk, hogy ezeket az anyagokat nem a mi kényelmünkért, hanem a versengő mikroorganizmusok ellen termelik.

2.1.4.1. Szerves savak

Hexózok fermentációja során homofermentatív úton tejsavat, míg heterofermentatív anyagcsere során tejsavat, ecetsavat, etanolt és széndioxidot termelnek a tejsavbaktériumok.

A gyenge savak alacsony pH értéken erőteljesebb gátlóaktivitással rendelkeznek, mint neutrális pH-n. A tejsavbaktériumok által termelt két fő sav közül az ecetsav az erősebb gátlóanyag, amely széles spektrumban fejti ki hatását, gátolja az élesztőgombák, penészgombák és baktériumok szaporodását is. Ez köszönhető részben a tejsavhoz képest magasabb disszociációs állandójának. A két sav keveréke nagyobb gátlóaktivitással rendelkezhet, mint külön-külön, ami szinergens hatásra utal.

Gyenge sav esetében csak a disszociálatlan molekula a toxikus, azonban disszociált savak esetében is figyeltek már meg gátló aktivitást.

A szerves savak disszociálatlan alakban bediffundálnak a sejtekbe a sejtmembránon keresztül, és ott fejtik ki gátló aktivitásukat miközben disszociálódnak a citoplazmában lévő neutrális közeli pH-n (OUWEHAND, 1998; CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

2.1.4.2. Etanol

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

2.1.4.3. Hidrogén-peroxid

A tejsavbaktériumok oxigén jelenlétében képesek hidrogén-peroxidot (H_2O_2) termelni a flavoprotein tartalmú oxidázok, NADH oxidázok és a szuperoxid dizmutáz aktivitásán keresztül. Hem forrás hiányában a tejsavbaktériumok nem termelnek katalázt, ami a hidrogén peroxid akkumulálódását eredményezi.

A hidrogén-peroxid baktericid hatása a sejtekre gyakorolt erős oxidáló hatásának köszönhető, valamint a hidrogén peroxid képződés során az oxigén kötött állapotba kerül, anaerob környezetet okoz, amely bizonyos baktériumok számára kedvezőtlen (OUWEHAND, 1998; LINDGREN & DOBROGOSZ, 1990).

2.1.4.4. Széndioxid

A tejsavbaktériumok a hexózok heterofermentatív anyagcsereúton történő fermentációja során termelik főként a széndioxidot, de más anyagcsere útvonalakon is képződik CO_2 a fermentáció során. A széndioxid kettős antimikrobás hatással rendelkezik. Egyrészt anaerob környezetet eredményez a termelődése, illetve önmagában is rendelkezik antimikrobás aktivitással, amelynek a pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert, azonban a feltételezések szerint gátolja az enzimátikus dekarboxileződést és a kettős lipidrétegben történő akkumulációja megszünteti annak permeabilitását (KING & NAGEL, 1975; LINDGREN & DOBROGOSZ, 1990).

2.1.4.5. Diacetil

A tejsavbaktériumok közül a *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, és *Streptococcus* nemzetségbe tartozó törzsek citrátok metabolizációja során termelnek diacetilt. A diacetil aktívabban gátolja a Gram-negatív baktériumok, élesztő- és penészgombák szaporodását, mint a Gram-pozitív csoportba tartozó baktériumok növekedését. A tejsavbaktériumok a legkevésbé érzékenyek a diacetillel szemben. A diacetil reakcióba lép a Gram-negatív baktériumok arginin kötő fehérjéjével és ezáltal zavarja, illetve megakadályozza az argininhasznosulást (OUWEHAND, 1998; CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

2.1.4.6. Kis molekulatömegű antimikrobás vegyületek

Sokan beszámoltak már a tejsavbaktériumok által termelt kis molekulatömegű anyagokról, amelyek antibakteriális hatással rendelkeznek. A kis molekulatömeg mellett egyéb tulajdonságokban is osztoznak egymással ezek az összetevők, mint a hőstabilitás, széles hatásspektrum, acetonban oldhatóak, továbbá alacsony pH-n aktívak. Ilyen kis molekulatömegű antimikrobás anyag a *Lactobacillus reuteri* által termelt reuterin, valamint a *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lb. casei* ssp. *pseudoplantarum* és *Streptococcus bovis* által termelt piroglutaminsav (TALARICO et al., 1988; OUWEHAND, 1998).

2.1.4.7. Bakteriocinek

A bakteriocin elnevezést Jacob és munkatársai alkották 1953-ban, amelyet viszonylag kis molekulatömegű, fehérje jellegű antibiotikumként definiáltak, amely az azonos fajba tartozó törzsek, illetve közeli rokon fajok ellen fejt ki gátlóaktivitást a sejtek receptoraihoz való kötődés révén.

Az utóbbi években egyre nagyobb figyelmet fordítanak a tejsavbaktériumok által termelt bakteriocinek megismerésére, mivel ezek a vegyületek hatékonyan helyettesíthetik a mesterséges tartósítószerket az élelmiszerek eltarthatóságának és biztonságosságának növelése céljából.

Számos különböző rendszertani csoportba tartozó baktérium, köztük a Gram-negatív és Gram-pozitív is termelhet bakteriocineket (DE VUGST & VANDAMME, 1994). E peptidek többségükben kationos tulajdonságúak és az anionos töltésű bakteriális membránokhoz történő kapcsolódásukat követően membránpórusok kialakítása és depolarizáció révén eredményezik a baktériumok pusztulását.

A termelő mikroorganizmus és az osztályozási feltételek alapján több csoportba sorolhatók (ENNAHAR et al., 2000; JACK & JUNG, 2000; CLEVELAND et al., 2001; MCAULIFFE et al., 2001), amelyek közül leginkább az I és II csoportba tartozó bakteriocineket tanulmányozták. Az első osztályba tartozókat lantibiotikumoknak nevezik, amelyek különleges aminosavösszetételű kis fehérjék (GUDER et al., 2000). A második osztályba tartozó bakteriocinek kis molekulatömegű, módosítatlan, hőstabil peptidek (NES & HOLO, 2000).

Számos bakteriocin hatásos az élelmiszerben romlást és fertőzést okozó baktériumok ellen (VIGNOLO et al., 1996; DE MARTINIS & FRANCO, 1998; BREDHOLT et al., 1999). Számos, tejsavbaktériumok által termelt bakteriocint izoláltak és jellemeztek már, amelyek közül néhány megkapta a potenciális antimikrobás szer státuszt. Ezek közül a legfontosabbak a nizin, diplococcin, acidophilin, bulgaricin, helveticinek, lactacin és plantaricinek (NETTLES & BAREFOOT, 1993).

A különböző *Lactococcus lactis* törzsek által termelt lantibiotikum, a nizin, a legalaposabban tanulmányozott bakteriocin és az egyetlen olyan bakteriocin, amelyet világszerte alkalmaznak élelmiszeradalékanyagként (DELVES-BROUGHTON et al., 1996). A bakteriocinek csoportosításában összetételük, molekulatömegük és hőtűrő-képességük játszott szerepet, ami alapján 4 fő csoportba lehet besorolni őket, amelyeket a 6. táblázat foglal össze.

6. táblázat: Bakteriocinek osztályozása (OUWEHAND 1998, CLEVELAND et al., 2001; CHEN & HOOVER, 2003)

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

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

2.1.4.8. Megtapadás gátlás

Önmagukban nem antimikrobás anyagok, amelyek gátolják a mikroorganizmusok kitapadását a bélnyálkahártyán és ezzel megakadályozzák a kolóniaképződést.

A baktériumok számára a legtöbb környezetben igen fontos a felületen történő kitapadás, amely olyan környezetben, felületen is lehetővé teszi a szaporodásukat ahonnan egyébként könnyen lemosódnának, mint például a bélcsatornában a folyadékszekréció valamint a perisztaltikus mozgás hatására. A bifidobaktériumok képesek megannyi enteropatogén és uropatogén mikroorganizmus megtapadását blokkolni és így megakadályozzák azok elszaporodását (OUWEHAND, 1998; CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

2.2. Mikrobiológiai vizsgálati módszerek

A mikrobiológiai vizsgálatok kezdetén, a XIX. század második felében, a mikroorganizmusokat a laboratóriumban húslevesben vagy más tápléban elszaporítva gyakran még egyes tenyészetekben tanulmányozták. Louis Pasteur is hasonlóképpen végezte vizsgálatait, aki ennek ellenére zseniális felfedezésekre volt képes. Robert Koch-nak és munkatársainak csak később sikerült a mikrobák tiszta tenyészeit (csak egyféle mikroorganizmust tartalmaznak), kezdetben zselatinnal majd később agarral mesterségesen szilárdított táptalajon létrehozni. Így lehetővé vált a mikroorganizmusok tulajdonságainak tiszta tenyészetekben történő tanulmányozása és valós megismerése. A módszer az orvosi mikrobiológia területén kívül hamarosan ipari alkalmazást is nyert. A sör- és a borélesztő tiszta tenyészeit is ennek a módszernek a segítségével hozták létre, az előbbi 1896-ban Emil Christian Hansen, míg az utóbbit az 1900-as évek elején Müller-Thurgau.

Számos ma is használt mikrobiológiai vizsgálati módszer több mint száz éve alakult ki. Világszerte a vizsgálatok millióit végzik évente ezekkel a hagyományos tenyésztési módszerekkel annak ellenére, hogy idő- munka- és anyagigényesek, az eredmény gyakran csak több napos vizsgálatssorozat után értékelhető (DEÁK, 2006a; DEÁK, 2006b).

A mikrobiológiai vizsgálati módszerek továbbfejlesztéseinek céljai, hogy gyorsabban, több mintából, kevesebb élő munkával, olcsóbban és mégis informatívabban jussunk eredményekhez. Ezeknek a céloknak a megvalósításához a mikrobiológia számos társtudomány és szakterület eszköztárát hívhatja segítségül, mint például az analitikai kémiát, a fizikai kémiát vagy az enzimológiát, az immun-biokémiát, a biotechnológiát, sőt a molekulárbiológia és génsebészet eredményeit is, mind pedig a szenzor- és műszerfejlesztést, valamint az elektronika és számítástechnika eszköztárát, amelyek segítségével a korszerű

mikrobiológiai módszerek képesek a mikroba-biomassza szelektív kimutatására, a mikrobaszaporodás, illetve anyagcsere-termékeik meghatározására (FARKAS, 1998).

A mikrobiológiai vizsgálati módszerek két fő csoportra bonthatóak aszerint, hogy sejtszám meghatározás vagy detektálás a cél. Az előbbi csoportba tartoznak a kvantitatív módszerek, míg az utóbbiba a kvalitatív eljárások (JASSON et al., 2010).

Az élelmiszer-mikrobiológiában a minta tömeg- vagy térfogategységre vonatkoztatott mikroba számának meghatározása általános és az egyik legfontosabb feladat. Számos módszer létezik, amely alkalmas a mikroorganizmusok számának meghatározására. Aszerint, hogy a módszer az összes sejtszám vagy csak az élők meghatározására alkalmas, két csoportba sorolhatjuk őket. Az utóbbi csoportba azok a sejtszám meghatározási módszerek tartoznak, amelyek a mikroorganizmusok tenyésztésén alapulnak, az első csoportba pedig azok sorolhatók, amelyek optikai, fizikai, kémiai, immun-analitikai, illetve molekulárbiológiai alapokon nyugszanak, közvetve mérik a sejtszámot (KISS, 1977).

2.2.1. A mintaelőkészítés és -kezelés fejlődése

Az eredményes mikrobiológiai analízis egyik legfontosabb lépése a megfelelő mintaelőkészítés, amely nélkül nem kapunk reprezentatív eredményt. A mikrobiológiai technikák fejlődésével és miniatürizálásával a mintaelőkészítés kritikussá vált, amelyet aszerint, hogy szilárd- vagy folyékony anyagból, felületről-, illetve levegőből szeretnénk mintát venni, négy csoportba oszthatunk.

A szilárd minta előkészítésében és hígításában nagy segítséget jelentenek az automatizált hígító rendszerek, amelyekbe csak bemérjük a vizsgálandó mintát és az automatikusan hígítja azt a megadott hígítási faktornak megfelelően (gravimetriás hígító, Dilufo, Dilumacher). Hígítás után a minták homogenizálása szükséges, amelyet kezdetekben turmixgép segítségével végeztek azonban számos hátránya miatt újabb módszerek kidolgozására volt szükség, így jelentek meg a piacon mintegy 35 éve az úgynevezett Stomacher, Masticator, illetve Pulsifier berendezések, amelyek megnövelték e művelet hatékonyságát. A Pulsifier előnye az előző kettő berendezéssel szemben, hogy a szilárd minták roncsolása nélkül képes azok felületén, illetve belsejében lévő mikroorganizmusok hígító folyadékba juttatására, ezáltal tisztább mintával dolgozhatunk tovább és a kapott eredményünk megegyezik a roncsolásos technikával kapott eredménnyel (FUNG, 2002).

Folyadékminták esetében könnyebb dolgunk van, amelyet a számos pipettázó automata és hígító berendezés még egyszerűbbé tesz.

A felületi mintavételezésnél gyakran használnak steril nedvesített vattát, amelyet az ismert nagyságú felület törlését követően hígító folyadékba helyeznek és később ezt a folyadékot oltják le agarra, azonban a biofilmek esetében ez nem megfelelő mintavételezési eljárás, ilyen esetekben pl. cellux használata megoldást jelenthet.

Levegő mintavételezés esetében kezdetben a passzív mintavételezési technikák voltak jellemzőek, amelyek azonban nem nyújtottak megfelelő eredményt, így ezeket a technikákat felváltották a hatékonyabb aktív mintavételezési technikák, amely során egy berendezés segítségével (Anderso Air Sampler, SAS sampler, MAS 100 sampler) ismert mennyiségű levegőt szívunk, amelyet a berendezésben elhelyezett szilárd táptalaj felületére áramoltatunk, majd a táptalajt inkubátorba helyezzük és számoljuk a telepeket (FUNG, 2002).

2.2.2. Az összes élő sejtszám meghatározás módszereinek fejlődése

A legfontosabb információ az élelmiszerekkel kapcsolatban az összes élő sejtszám, amelyet a már több mint 100 éve kifejlesztett lemezöntéses technika segítségével képesek vagyunk megadni, azonban ez a módszer számos anyag- és idő igényes lépést tartalmaz.

Az utóbbi 30 évben jó néhány új módszert fejlesztettek ki, teszteltek, amelyeket ma is hatékonyan használnak telepszám meghatározásra. A cél, hogy gyorsabb, egyszerűbb és olcsóbb meghatározást tegyenek lehetővé.

Az elmúlt években számos „real-time” élő sejtszám meghatározási módszer gyorsítását oldották meg, amelyek az élő sejtek vitális festésén (DEFT technika, Chemunex Scan RDI rendszer), illetve ATP detektáláson (Microstar rendszer) alapulnak. Előnyük, hogy sok minta egyidejű és gyors vizsgálatát teszik lehetővé, azonban ezekhez a módszerekhez körültekintő mintaelőkészítés, szűrés, a szín reagensek helyes kiválasztása és drága berendezések szükségesek.

A hagyományos lemezöntéses, szélesztéses telepszámláláson alapuló élő sejtszám meghatározás helyettesítésére kidolgozott MPN módszert is már 100 éve alkalmazzák rutinszerűen a mikrobiológiában, amelynek a miniaturizálását, ezzel együtt gyorsítását és egyszerűsítését már 1968-ban Fung és Kraft, illetve 1969-ben Fung és LaGrange megvalósította. Az eredetileg kémcsövekben nagy mennyiségű táptalaj igényű hígítások helyett, 96-lyukú mikrotiter lemezen végezték el a hígításokat, amely egyszerre akár 12 minta 8 tagú tízszeres tova futó hígítását vagy 4 minta 3 párhuzamosának hasonló számú hígítását tette lehetővé. A módszert később továbbfejlesztették automatapipettázó robot használatával, amely pontosabb hígítást tesz lehetővé (WALSER, 2000).

Az immunológiai módszerek viszonylag újnak számítanak a mikroorganizmusok sejtszámának meghatározására alkalmazott eljárások között, azonban már ezeknek a módszereknek is számos automatizált gyors és miniatürizált formája létezik (VIDAS, EIA), amelyek segítségével akár 10 perc alatt lehetséges a kórokozó vagy patogén mikroorganizmusok jelenlétének vagy hiányának kimutatása (VIP, Eclipse). Azonban ezeket a módszereket leginkább a nemkívánatos mikroorganizmusok, illetve azok toxinjainak kimutatására alkalmazzák, mintsem azok sejtszámának meghatározására (FUNG, 2002).

A DNS- illetve RNS-alapú technikák is széleskörűen alkalmazhatóak a mikrobiológia területén, mind azonosítás, mind sejtszám meghatározásban, azonban az identifikálás területén alkalmazzák elterjedtebben.

A mikrobapopulációk szaporodása során bekövetkező változások monitorozására, mint például az ATP szint, specifikus enzimek, pH, elektromos impedancia, vezetőképesség pontos mérésére berendezések szükségesek. Az évek során ezek a műszerek is számos újításon mentek keresztül, amelyek precízebb és gyorsabb mérést tesznek lehetővé és így pontosabb képet kaphatunk a mikrobaszámról.

A mikrobák anyagcseretermékeire vagy enzimeire irányuló kémiai-biokémiai módszerek közé sorolhatóak a reduktáz próbák (rezazurin, TTC, metilénkék, MTT stb.), melyek során az élő sejtekben jelenlévő mikrobiális dehidrogenázok a hidrogént átviszik a szubsztrátról a festékre, amely színváltozáson megy át. A mikroba-szaporodást kísérő redox-potenciál csökkenés mérése alkalmas lehet a mikrobiális aktivitás kimutatása mellett az élősejtszám becslésére is. Erre vonatkozóan a 20. század első harmadától kezdődően festék-redukciós próbák terjedtek el, döntően a tej mikrobiológia állapotának relatíve gyors meghatározására.

A szaporodás detektálására tetrazólium sók (TTC) alkalmazása is elterjedt. Tengerdy és munkatársai (1967) TTC színintenzitás mérésével vizsgálták *Escherichia coli* és *Staphylococcus aureus* szaporodását. A mérés során TTC-t adtak a vizsgálandó mikroorganizmusok szaporodó tenyészetéhez és 3-4 óra után mérték a vörös színű formazán (a TTC redukált formája) színintenzitását 420 nm hullámhosszon. Azt tapasztalták, hogy a színintenzitás összefüggésben van a baktériumok TTC hozzáadása előtti számával (KISS, 1977.). A módszer kezdetben még csak jelenlét vagy hiány kimutatására volt alkalmazható, azonban fejlesztések és újabb indikátorként használt színezékek alkalmazásával, meghatározott körülmények között a mikroorganizmusok élő sejtszámának kvantitatív, gyors és pontos meghatározását teszik lehetővé.

2.2.3. Tenyésztésen alapuló módszerek

A tenyésztésen alapuló klasszikus mikrobiológiai módszerek az élő, szaporodásra képes mikroorganizmusok kimutatására és az ismert mennyiségű minta sejtszámának meghatározására alkalmazhatóak

Ez a sejtszám gyakran a szilárd táptalajon, agarlemezen kifejlődött telepek számának a meghatározását jelenti, feltételezve azt, hogy minden egyes telep a táptalajra oltott egy-egy sejtből alakult ki. Azonban ez a feltételezés nem minden esetben állja meg a helyét, mivel még a megfelelően homogenizált mintában is maradhatnak sejtsomók és sejláncok, amelyek inkubálás után egyetlen telepet képeznek. Ezért a sejtszám helyett gyakran használják a telepképző egységek számát (tke vagy cfu).

A telepszám meghatározása és más sejtszámlálási módszer is csak bizonyos határok között végezhető el kellő pontossággal (pl. 30-300 közt), ezért a minta mikrobaszámát hígítással, esetleg koncentrállással be kell állítani.

A telepszám meghatározására leggyakrabban alkalmazott két módszer a lemezöntés és szélesztés, amely módszerek során a megfelelőnek vélt hígítási tagokból megadott mennyiséget pipettázunk a még folyékony halmazállapotú, olvasztott táptalajba, vagy a már előre elkészített, szilárd táptalaj felületére visszük fel és terítjük szét a mintát.

A másik, sejtszám meghatározásra gyakran alkalmazott eljárás a legvalószínűbb sejtszám módszere. A legvalószínűbb sejtszámot (most probable number, MPN) folyékony tápközegben, a szaporodást mutató, zavarossá váló tenyészetek száma szerint matematikai statisztikai módszerek segítségével határozzuk meg. Ez a módszer az előző két telepszámlálási módszer pontosságától elmarad, azonban alacsony sejtszámú mintáknál is alkalmazható.

A telepszámláláson és tenyésztésen alapuló módszerek előnyei, hogy érzékenyek és rugalmasak, azonban a legnagyobb hátrányuk, hogy idő- (kiértékelésükhöz 3-5 nap szükséges), anyag- és munkaigényesek.

A módszertani fejlesztések évtizedek óta arra irányulnak, hogy a hagyományos tenyésztési eljárásokat meggyorsítsák és automatizálják, csökkentve ezzel azok munka-, idő-, és anyagigényét, illetve új, nem tenyésztésen alapuló gyors és automatizált módszerekkel kívánják helyettesíteni azokat.

Az ilyen irányú törekvések a tenyésztési időt nem csak a minta előkészítésének (stomacher), hígításának (gravimetriás hígító készülék), táptalajra történő felvitelének (spirál lemezelő készülék) a táptalaj kiadagolásának, illetve az eredmények kiértékelésének automatizálásával (automata telepszámláló berendezés) a vizsgálathoz szükséges munkaidőt

csökkentik le. A táptalajok előkészítésének gyorsítását eredményezik a gyári kész, porított tápközegek, illetve a táptalajkészítés hosszadalmas munkáját kiválthatja az előre elkészített valamilyen hordozófelületre felvitt megszilárdult táptalajt tartalmazó egyszer használatos tesztek alkalmazása. Ilyenek lehetnek az ún. bemártó- vagy érintőlemezes módszerek (pl. dip slide, contact slide, petri-film stb.), amelyek alkalmazhatósága kiterjed a folyékony élelmiszerek mikrobaszámának, szilárd élelmiszerek felületi szennyezettségének (szilárd élelmiszerből alapszuszenziót készítve azok összcsíraszámának meghatározására is), valamint munkafelületek tisztaságának és a személyi higiénia vizsgálatára is.

A kromogén és fluorogén szubsztrát tartalmú új típusú szelektív táptalajok (Petrifilm, Compact Dry, SimPlate, Tempo, Coliert, Soleris) alkalmazásával egyetlen táptalajon több mikrobát, mikrobacsoportot tudunk elkülöníteni. Ezen táptalajok alapelve, hogy a baktériumok szaporodásuk során specifikus enzimeket termelnek, melyek a táptalajban lévő egy vagy több kromogén vagy fluorogén szubsztráttal enzim-szubsztrát reakcióba lépnek, melyet színreakció követ. A kromogén táptalajok segítségével helyettesíthetünk egyes biokémiai teszteket. Hatalmas előnyük e táptalajoknak a nagy specifikusság, könnyű felhasználhatóság, mely a minták értékelését gyorsítja, és így a laboratórium áteresztő képességét is növeli (JASSON et al., 2010).

A hagyományos eljárások esetében nagymértékben megkönnyíthetik és felgyorsíthatják az előkészületeket és a munka elvégzését a mosás és sterilizálás mellőzését lehetővé tevő egyszer használatos műanyag eszközök (Petri-csésze, pipetta, oltókacs) is.

Az utóbbi évtizedek fejlesztései jelentősen megkönnyíthetik és felgyorsíthatják a klasszikus tenyésztésen alapuló módszerek előkészületeit és kiértékelését, emellett csökkenthetik az esetleges hibalehetőségeket (hígítás, sejtszámlálás), azonban a tenyésztés még mindig sok időt vesz igénybe. Ebből adódóan a törekvések mindinkább a tenyésztést mellőző sejtszám meghatározási módszerek fejlesztésére és automatizálására irányulnak (DE BOER & BEUMER 1999; DEÁK, 2006a).

2.2.4. Mikrobaszám becslés közvetett módszerei

Ezeknél a technikáknál valamilyen, a mikroorganizmusok mennyiségét jellemző paramétert mérünk és ezekből az értékekből következtetünk a sejtszámról. Az ilyen meghatározásoknál a korrelációt előzetesen felvett kalibrációs görbével kell meghatározni, amelyet ismert koncentrációjú sejtekből készített hígítási sorozat és a hígítási tagokhoz tartozó, mért jellemző érték függvényében ábrázolunk.

A sejtszám közvetett becslése történhet optikai- (turbiditás mérés, áramlásos citometria), kémiai- (fehérje-, szervesanyag-, szárazanyag-, ATP meghatározás, enzimaktivitás mérés) és fizikai módszerek (tömegmérés, impedancia és konduktancia mérésén alapuló módszerek) segítségével.

2.2.4.1. Indirekt kémiai módszerek

A mikroorganizmusok számának kémiai módszerek segítségével történő meghatározása a sejtekben valamilyen állandó arányban jelenlévő összetevő mennyiségi meghatározásán alapul. Ilyen összetevő lehet például az ATP, amelyet minden élő sejt tartalmaz és a sejt pusztulása esetén gyorsan elbomlik. A módszer lényege, hogy a mintában jelenlévő ATP a luciferin-luciferáz enzimreakció hatására fénykibocsátás mellett elbomlik és ezt a fényintenzitást az erre a célra kifejlesztett luminométer segítségével mérhetjük. A fény intenzitása és az ATP mennyisége között szoros összefüggés tapasztalható. Az eljárás érzékenysége igen nagy, akár 5-10 élesztősejt vagy 100 baktériumsejt kimutatására is képes, és csupán 15-20 percet vesz igénybe. A módszert legfőképpen felületek és eszközök higiéniai vizsgálatára használják, mivel az ATP jelen van minden aktív anyagcserét folytató sejtben, így az élelmiszerekben jelenlévő állati és növényi sejtekben is. Kizárólag a mikroorganizmusok kimutatásához szükség van egy megelőző lépésre ahol a szomatikus ATP-t elkülönítjük a mikrobiálisról (szűrés), vagy a szomatikus sejtek degradációját kell előidézni a mintában, ami viszont a módszer időigényességét hosszabbítja meg, illetve csökkenti annak érzékenységét. Továbbá a módszer limitáló tényezői, a pH, hőmérséklet, valamint a jelenlévő luciferáz inhibitorok, illetve más egyéb tényezők is befolyásolhatják a folyamatot (GRACIAS & MCKILLIP, 2004; DE BOER & BEUMER, 1999).

Penészgombák kimutatására leggyakrabban használt indirekt kémiai analitikai módszer a gombák sejtmembránjában jelenlévő ergoszterin meghatározása folyadék vagy vékonyréteg kromatográfia segítségével.

Ide sorolhatók még a mikrobák anyagcseretermékeire vagy enzimeire irányuló kémiai-biokémiai módszerek, amelyek meghatározott körülmények között szintén alkalmasak lehetnek a mikroorganizmusok kvantitatív meghatározására. Ilyen alapon működő módszerek a redukáz próbák (rezazurin, TTC, metilénkék, MTT stb.), amelyek során az élő sejtekben jelenlévő mikrobiális dehidrogenázok a hidrogént átviszik a szubsztrátról a festékre, amely színváltozáson megy át. A színváltozás mértékéből következtethetünk a mintában jelenlévő mikroorganizmusok számára (MOSMANN, 1985; DE BOER & BEUMER, 1999; DEÁK 2006a; KISS, 1977).

2.2.4.2. Indirekt fizikai módszerek

E módszerek esetében a mikroorganizmusok szaporodása által bekövetkezett valamilyen fizikai mennyiség megváltozását követjük nyomon arra alkalmas szenzorok és detektorok segítségével, amelyekből előzetes kalibrációt követően következtethetünk az aktuális, illetve a kiindulási sejtszámokra. Ilyen eszközök/módszerek, amelyek az elektromos ellenállás és vezetőképesség mérésén alapulnak a Bactometer, BacTrac, Malthus és RABIT. A mérés alapja, hogy a mikroorganizmusok anyagcsere-tevékenységüknek köszönhetően megváltoztatják a táptalaj vezetőképességét. A táplevesbe helyezett elektródák segítségével mérik a vezetőképesség változását megadott időközönként. Egy előre meghatározott küszöbérték elérése esetén a berendezés meghatározza az ún. detekciós időt, amelyből következtethetünk a mintában lévő kezdeti mikrobaszámra, természetesen csak megfelelő kalibrációt követően. Az úgynevezett indirekt konduktimetriás módszer a mikroorganizmusok által termelt széndioxid által okozott vezetőképesség változást regisztrálja. Ebben az esetben az elektródok nem érintkeznek közvetlenül a mintával (Malthus, RABIT), hanem egy elkülönített mérőcellában lévő KOH vagy NaOH oldatba merülnek. Széndioxid fejlődés esetén elnyelődve a lúgban karbonátok keletkeznek, amelyek az eredeti oldathoz képest alacsonyabb vezetőképességet eredményeznek.

Egy másik fizikai paraméter, a fényáteresztő képesség változásának mérésével is lehetséges a mikrobák szaporodásának vizsgálata. A módszer lényege, hogy a tiszta oldatokban a mikroorganizmusok szaporodása zavarosodást okoz, amelynek mértéke arányos a sejtszámmal. Ezt a zavarosodást valamilyen fotometriás automata berendezés segítségével mérhetjük és megfelelő kalibrációt követően az adatokból következtethetünk a sejtszámra is. A módszer igen egyszerű és egyszerre akár számos paraméter hatását is vizsgálhatjuk, azonban hátrány, hogy csak tiszta tenyészetek megfigyelésére alkalmazható, élelmiszermintákra nem (DEÁK, 2006a).

Az utóbbi 20 évben egyre nagyobb teret hódítanak a szubjektív érzékszervi vizsgálatokat is helyettesítő, objektív gyors, roncsolásmentes és vegyszert nem igénylő módszerek/műszerek. Ilyen pl. az elektronikus orr a NIR (közeli infravörös spektroszkópia - near infrared spectroscopy) és a Mikrokolorimetria.

2.2.4.3. Immunológiai módszerek

Azok a módszerek sorolhatók ide, amelyek immunológiai alapokon határozzák meg a mikroorganizmusok sejtszámát. Ezeknél a módszereknél a legnagyobb problémát az

jelentheti, hogy nem tudnak különbséget tenni az élő és holtsejtek között, illetve előszaporítást igényelnek. Ezeket a módszereket inkább kórokozó, illetve patogén mikroorganizmusok gyors kimutatására alkalmazzák, mint sejtszám meghatározásra.

2.2.4.4. Molekuláris biológiai módszerek

A molekuláris biológiai alapokon nyugvó technikák alkalmazásával lehetőség nyílik akár a mikroorganizmusok sejtszámának meghatározására is, azonban e technikákat legfőképpen a mikrobiológiában a mikroorganizmusok gyors kimutatására, identifikálására alkalmazzák.

A molekuláris technikák általában egy vagy néhány kiszemelt gén vagy jellemző nukleinsav-szekvencia kimutatásán, vizsgálatán alapulnak, amelyeket a legtöbb esetben az adott élőlény fenotípusos jellemzői alapján választanak ki. A molekuláris diagnosztikai módszerek alapvetően háromféle eljárásan alapulnak, a sejtekből kivont DNS közvetlen vizsgálatán, a hibridizációs technikákon, és a polimeráz láncreakción (PCR).

A sejtekből izolált genomi DNS restrikciós endonukleázos emésztése, majd agarózgélben való elektroforézises elválasztása és a kapott DNS-sávok mintázatának értékelése az örökítőanyag közvetlen vizsgálatán alapuló eljárások közé sorolható módszer, amelyet RFLP (restriction fragment length polymorphism = restrikciós fragmentum méret polimorfizmus) technikának neveznek. A módszer lényege, hogy az izolált kétszálú DNS-t hasító enzimek, a restrikciós endonukleázok specifikus felismerési és hasítási hellyel rendelkeznek. Ez a specifikusság 4-8 nukleotid hosszúságú szekvenciára vonatkozik, amelyet az enzim felismer, és egy síkban vagy lépcsősen elhasítja mindkét DNS-szálat. Az emésztést követően különböző hosszúságú DNS szakaszokat, fragmentumokat kapunk, amelyeket gélelektroforézissel elválasztva egy mintázatot, úgynevezett molekuláris újlenyomatot („fingerprint”-et) kapunk, amely az adott mikroorganizmusra jellemző.

A hibridizációs technikák segítségével a cél olyan gének kimutatása, amelyek az azonosítani kívánt mikrobák jellemző génjeinek tekinthetők. A hibridizáció végbemenetelét speciális jelölési eljárásokkal mutatják ki, korábban radioaktív jelölési módszerek voltak, mára azonban kiszorították őket a nem radioaktív (ún. hideg) jelölések, mint például a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) amely a molekuláris módszer érzékenységét és specifitását köti össze a mikroorganizmusok láthatóvá tételével, előfordulásuk helyén. A FISH módszer fluoreszcens festékkel jelzett specifikus nukleinsav-probák hibridizációján alapul a helyben rögzített intakt sejtek cél-DNS szekvenciájához. A fluoreszcens jelzés epifluoreszcens mikroszkóppal, áramlásos citométerrel, vagy lézer szkennelrel mutatható ki.

A célgén kimutatásához használt nukleinsav-próbák, lehetnek homológ DNS- vagy RNS-szekvenciák, sőt mesterséges ún. peptid-nukleinsav (PNS) próbákat is kifejlesztettek, amelyek az előző két nukleinsav-próbákhoz hasonló, de annál kedvezőbb tulajdonsággal bírnak.

Élelmiszer-mikrobiológiai alkalmazása a molekuláris hibridizációs módszereknek elsősorban a patogén baktériumok megbízható faji identifikálása, reprodukálható törzsi szintű azonosítása és jellemzése (tipizálása) területére terjed ki (BELÁK & DEÁK, 2007; JASSON et al., 2010; BELÁK et al., 2011; LÓPEZ et al., 2012).

A polimeráz láncreakció (PCR = Polymerase Chain Reaction) specifikus nukleinsav szekvenciák in vitro sokszorozására alkalmas eljárás, amelynek segítségével kis mennyiségű DNS, akár 1 kópia is kimutatható.

Az eredeti eljárást a Cetus cégben dolgozták ki Mullis és Saiki, és a Scienceben ismertették 1985-ben a β -globulin gén amplifikálására. A módszer új távlatokat nyitott meg a kutatásban és a diagnosztizálásban. A reakció a sejtekben végbemenő DNS replikációt utánozza, a sokszorozandó DNS templát mentén a DNS polimeráz új DNS-t szintetizál. A sejtben az enzim működéséhez RNS indító molekulára, primerre van szükség, amelyet a PCR technikában mesterségesen előállított oligonukleotid molekulák helyettesítenek.

A PCR alapszámítógépes érzékenységét és specifikusságát számos módosítással növelték, és újabb irányú vizsgálatokra tették alkalmassá. A számos változat közül csak néhány jelentősebbet említek az alábbiakban.

A PCR reakció érzékenysége lényegesen megnövelhető az ún. fészek (**nested**)-PCR módszerrel. Ennek lényege, hogy két specifikus primer párt alkalmaznak. Az első ún. külső primer párt kevéssé szoros amplifikációs körülmények között, így a kisebb mennyiségben jelen lévő cél DNS is biztosan felsokszorozódik. Ezt követően egy ún. belső specifikus primer párt alkalmaznak szoros amplifikációs körülmények között, amelynek során az első PCR termék cél DNS-é válik (MEYER et al., 1996).

A „**multiplex PCR**” módszer esetében egyidejűleg alkalmaznak több mint egy primer párt. Az egyik lehet egy általános primer pár, amely amplifikációs kontrollként működik, míg a második a kimutatni kívánt génre specifikus (GERMINI et al., 2004).

A **reverz transzkripció PCR** (RT-PCR) reakció során nem csak DNS-t, hanem közvetve RNS-t is lehetséges amplifikálni. Ehhez azonban a reverz transzkriptáz enzim segítségével először az RNS-ről egy kiegészítő DNS-szálat (cDNS) kell szintetizálni amely templátként szolgál az egyszerű PCR reakcióhoz. A módszer legnagyobb előnye, hogy segítségével az RNS vírusok is kimutathatók és azonosíthatók, továbbá az élő de szaporodni nem képes sejtek kimutatása is kimutathatóak a RT-PCR segítségével (SHERIDAN et al., 1998).

PCR-RFLP a PCR módszer és a restrikciós enzimekkel végzett hasítás (RFLP) kombinálásával nagymértékben növelhető a vizsgált DNS-ek közti különbségek kimutathatósága (WOLF et al., 1999).

A PCR technikán alapuló módszerek általában csak a cél DNS kimutatására, illetve az azt tartalmazó mikroba jelenlétének vagy hiányának kimutatására alkalmasak, függetlenül attól, hogy a keresett mikroorganizmus milyen számban volt jelen. A valós idejű „**real-time**” **PCR** segítségével az adott időben jelenlévő cél DNS nemcsak kimutatható, hanem a mennyisége is meghatározható. A kvantifikáláson kívül ez élő és holt sejtek megkülönböztetésére is alkalmas. A real-time PCR módszer lényege, hogy a PCR termék amplifikálódása során egy fluoreszcens festékkel jelölt specifikus génpróba mennyiségét is detektáljuk, amelynek mennyisége arányos lett a folyamat során sokszorozódott DNS mennyiségével (WONG & MEDRANO, 2005).

Posztamplifikációs módszerek:

A PCR-termék kimutatása és további elemzése többféleképp történhet. Legegyszerűbb esetben az amplifikált DNS-t agaróz gélben futtatják és etidium-bromiddal megfestve UV fényben vizsgálják (AUSUBEL et al., 1989). A futtatás nagyobb érzékenységgű agaróz (metafor) vagy poliakrilamid gélen is történhet és az etidium-bromid helyett SYBR Green I festék is alkalmazható a gél festésére. A SYBR Green I 50-100x nagyobb érzékenységgel bír mint az etidium-bromid (SINGER et al., 1994). A termék kimutatása immunológiai reakcióval is összeköthető (PCR-ELISA). A hagyományos gélelektroforézis helyett kapilláris elektroforézist alkalmazva az amplikonok mérete gyorsan és pontosan meghatározható (DOOLEY et al., 2005). A fluoreszcens festékkel jelölt próbák pedig lehetővé teszik a PCR reakció követését valós időben (pl. TaqMan).

A molekuláris biológiai módszerek a legmodernebb technikák közé tartoznak, amelyek a mikroorganizmusok gyors (akár egy óra) és pontos kimutatását, identifikálását és akár azok sejtszámának meghatározását is lehetővé teszik, azonban a legtöbb esetben a gyors módszerekhez a vizsgálni kívánt mikroorganizmusok előszaporítása szükséges a megfelelő mennyiségű és minőségű DNS izolálásához, amely 6 – 48 órát is igénybe vehet.

2.2.4.5. Bioszenzorok

Az alapötlet igen egyszerű, azonban a tényleges megvalósítása rendkívül összetett és műszerigényes. A módszer lényegében egy hordozóhoz kötött valamilyen biológiailag aktív anyag, ami lehet enzim, antitest, nukleinsav molekula, sejt szerv vagy egész sejt, amely egy

detektorhoz és egy jeladóhoz kapcsolódik. A jeladó lehet elektrokémiai (feszültség, konduktancia), optikai (fény, biolumineszcencia, fluoreszcencia) vagy más jel (termisztor, piezoelektromos kristály, kvarckristály). A bioszenzor érzékelhet toxint, specifikus patogént, antibiotikumot vagy más hatóanyagot. A módszer előnye, hogy rendkívül szelektív és gyors, azonban a költségeken kívül problémát okozhat, hogy a biológiai érzékelők aktivitásukat elveszthetik. Mikroorganizmusok sejtszámának meghatározása a tömegérzékelő kvarckristályhoz kötött specifikus antitest bioszenzor segítségével történik, amely esetében az élő és holt sejtek megkülönböztetése problémát jelenthet (DE BOER & BEUMER, 1999).

2.3. Tetrazólium sók és formazán kristályok alkalmazása élősejtszám meghatározásra

A továbbiakban a tetrazólium sók és formazán kristályok felfedezését és alkalmazhatóságát mutatom be röviden.

2.3.1. Történelmi áttekintés

A tetrazólium sók a heterociklikus szerves vegyületek egy nagy csoportját alkotják, amelyek közül az elsőt 1894-ben Pechmann és Runge állította elő. Ekkor azonban még a biológiai redukciós folyamatok indikátoraként történő alkalmazhatóságát nem ismerték, a folyamat biokémiai háttere ismeretlen volt. A tetrazólium sók legnagyobb jelentősége abban a némileg szokatlan tulajdonságában rejlik, hogy redukcióját követően erősen színezett úgynevezett vízzoldhatatlan formazán keletkezik belőlük. Úgy gondolhatnánk, hogy a formazánokat a tetrazólium sókból állították elő először azok redukálásával, azonban valójában ennek az ellentéte az igaz, ugyanis Pechmann és Runge (1894) a formazán vegyületek oxidációs tulajdonságait tanulmányozva szintetizálták az első tetrazólium sót, a trifenil tetrazólium kloridot. A formazán első előállítását Fries (1875) nevéhez köthető, azonban az ebbe a csoportba tartozó vegyületek még ismeretlenek voltak abban az időben. Von Pechmann (1892), Mamberger és Wheelwright (1892) egymástól függetlenül tisztázták ezen és hasonló vegyületek szerkezetét, és közösen a formazil nevet javasolták ennek a csoportnak (ALTMAN, 1976).

Annak ellenére, hogy a tetrazólium sókat már a tizenkilencedik század utolsó évtizedében fedezték fel, részletesebb tanulmányozására csak az 1940-es évek elején került sor (SMITH 1951), amikor is Moewus a tetrazólium sók növényekre gyakorolt mutagén hatásának vizsgálata során tett jelentős felfedezést. Az elültetett zsázsa magjára tetrazólium sót tartalmazó oldattal átitatott szűrőpapírt helyezve a kifejlődött növény levelei piros színűek

lettek. Kuhn és Jerchel 1941-ben e figyelemre méltó felfedezésnek köszönhetően különböző tetrazólium sók hatását kezdték el vizsgálni élesztőkre és baktériumokra. Az alkalmazott tetrazólium sókat a mikroorganizmusok átalakították formazánná amelyet a sejtek lízise után ki is tudtak vonni, ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a sejtek intracellulárisan redukálják a tetrazólium sót. Bebizonyosodott, hogy a tetrazólium sók alkalmazhatók a biológiai redukciós rendszerek indikátoraként (ALTMAN, 1976; JÁMBOR, 1956).

Eközben Lakon (1939) kifejlesztett egy módszert vetőmagok csírázásának tanulmányozására, nátrium-szelenit használatával. Az élő magok átalakították a nátrium-szelenitet szeléné. Azonban nagy hátránya volt a módszernek, hogy a nátrium-szelenit nagymértékben toxikus, ami a növekedést igen erősen gátolta. Ezért más indikátor után kellett néznie, mert a hagyományos redox indikátorok nem bizonyultak alkalmasak. Ezt követően Kuhn konzultált Lakonnal a tetrazólium sókról, amelyek nem toxikusak a növényekre és színes redukciós termékük van. A tetrazólium sókkal helyettesíteni tudta a nátrium-szelenitet, és megállapította, hogy számos különböző mag csírázásának tanulmányozására alkalmazható az élő sejtek által termelt formazán kristályokon keresztül (ALTMAN, 1976).

Ezeknek a vegyületeknek a vetőmag életképesség vizsgálatában való alkalmazhatóságának a híre csak a II. Világháború után jutott el az Egyesült Államokba. Ez jelentette a dehidrogenáz hisztokémiai vizsgálatának kezdetét is egyben. Hatalmas érdeklődés jelentkezett ezzel a munkával kapcsolatban és nagy számban jelentek meg a tudományos dokumentációk, amelyek igazolták és kibővítették Lakon 2,3,5-trifenil tetrazólium klorid TTC eredményeit. Straus és munkatársai 1948-ban kimutatták, hogy a daganatos szövetek több formazánt képeznek, mint a normál szövetek. Kun és Abood (1949) voltak az elsők, akik a tetrazólium sót különböző specifikus enzimek kimutatására alkalmazták. Jensen és munkatársai (1951) különféle dehidrogenázokat vontak ki kukorica embriókból és kimutatták, hogy ezek képesek redukálni a TTC-t a megfelelő koenzim jelenlétében (ALTMAN, 1976).

Ettől kezdve számos munka jelent meg új típusú tetrazólium vegyületekről, és azok alkalmazhatóságáról (NINEHAM, 1955). Nineham (1955) 240 tetrazólium sót és 414 formazánt írt le az 1954-ig publikált irodalmak alapján. A jelenlegi adatok szerint ez a szám meghaladja az 1000-et. Azonban csak néhányat alkalmaznak a biológiai kutatásokban. A legszélesebb körben tanulmányozott tetrazólium sók közé tartozik a TTC, XTT és MTT. A legújabb kutatásokban az új generációs vízdoldható WST-1, WST-3, WST-5, WST-8, WST-9 tetrazólium sók tulajdonságait és alkalmazhatóságukat is tanulmányozzák (TSUKATANI et al., 2008; ISHIYAMA, 1996).

2.3.2. 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) kolorimetriás módszer

A 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromidot (MTT) 1957-után szintetizálták és kezdték el tanulmányozni (ALTMAN, 1976). A mérföldkövet a Mosmann (1983) által leírt módszer jelentette az MTT alapú eljárások tekintetében. Mosmann eredetileg emlős sejtek aktivitásának, növekedésének és túlélésének tanulmányozására fejlesztette ki az MTT kolorimetriás módszert (MOSMANN, 1983), a későbbiekben számos publikáció jelent meg, amely Mosmann modelljét alapul véve kisebb-nagyobb módosításokkal átalakítva kiterjesztette alkalmazhatóságát (GERLIER & THOMASSET, 1986; SCUDIÉRE et al., 1988). A továbbfejlesztett módszereket sikeresen alkalmazzák az immunológiában, toxikológiában a sejtbiológiában különböző emlőssejtek köztük daganatos sejtek életképességének, növekedésének és vegyszerérzékenységének (CARMICHAEL et al., 1987; TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987; ALLEY et al., 1988; CAMPLING et al., 1991; BERRIDGE & TAN, 1993; LIU et al., 1997; TAKAHASHI et al., 2001), valamint a mikrobiológiában számos mikroorganizmus, baktérium, élesztő- és penészgomba szaporodásának, életképességének, antibiotikum rezisztenciájának vizsgálatára is (PECK, 1985; STOWE et al., 1995; ABATE et al., 1998; FREIMOSER et al., 1999; DIAS et al., 1999; STENTELAIRE et al., 2001; GABRIELSON et al., 2002; SARAVANAN et al., 2003; WANG et al., 2007; WANG et al., 2010; WADHAWAN et al., 2010).

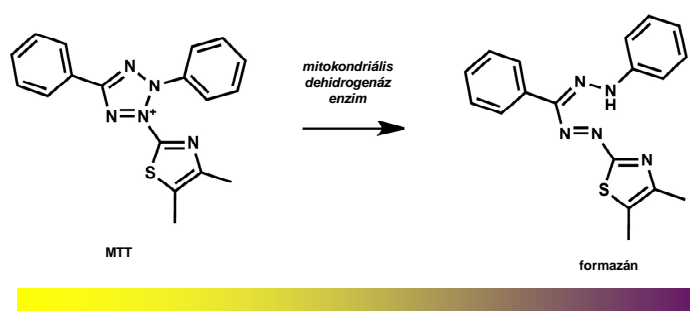
Az MTT és általában a tetrazólium sók redukcióján alapuló kolorimetriás módszerek legnagyobb előnye az egyszerűségükben és a gyorsaságukban rejlik. Azonban ahhoz, hogy a lényegesen több munkát, időt és vegyszert igénylő hagyományos módszerek alternatívájaként szolgáljanak, számos paraméter pontos meghatározása és beállítása szükséges.

A módszer az élő sejtek azon tulajdonságán alapszik, miszerint képesek a vízzoldható tetrazólium söt vízzoldhatatlan formazánná alakítani (TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987) és az így keletkezett formazán mennyisége spektrofotometriás úton meghatározható, amiből az élő sejtek számára következtethetünk (MOSMANN, 1983; PECK, 1985; DENIZOT & LANG, 1986). Ezek a megállapítások emlős és bakteriális eredetű sejtekre egyaránt igazak (ABATE et al., 1998). Az MTT esetében a sárga színű, vízben jól oldódó tetrazólium söt redukálják a sejtek vízben oldhatatlan lila formazán kristályokká (PLUMB et al., 1989).

Az MTT próbát annak ellenére, hogy széles körben alkalmazzák sejtleletképesség és sejtszaporodás mérésére, a redukció mechanizmusa és a felelős enzimek pontos elhelyezkedése nem teljesen ismert (COLLIER & PRITSOS, 2003). Egy korai tanulmányban Slater és munkatársai 1963-ban megállapították, hogy a szukcinát függő MTT redukciója a

patkány máj sejtek mitokondriumában megy végbe. Későbbi tanulmányok bebizonyították, hogy a szukcinát dehidrogenáz függő MTT redukció mellett NADH és NADPH függő formazán termelés is történik, amely a mitokondriumon kívül a belső membránban megy végbe (BERRIDGE & TAN, 1993). További tanulmányok eredményei is megkérdőjelezték a mitokondrium kizárólagos szerepét az MTT redukciójában (LIU et al., 1997), illetve bebizonyították azt is, hogy sok más, nem mitokondriális dehidrogenáz enzim és flavin oxidáz is képes redukálni az MTT-t. Számos eredmény található az irodalomban arra is, hogy az MTT redukciója élő sejtek jelenléte nélkül, különböző flavonoidok, magnézium oxid vagy akár porózus szilícium (PSI) mikrorészecskék hatására is spontán végbemehet, amely így hamis pozitív jelet eredményezhet (PENG et al., 2005; LAAKSONEN et al., 2007; TALORETE et al., 2006; FISCHER et al., 2010).

Az MTT vizsgálati módszer két fő részre, a redukciós és az oldódási folyamatra osztható fel. A redukciós folyamat pontos megértése és az esetleges hamis pozitív vagy negatív jelet produkáló tényezők kiküszöbölése mellett a keletkezett formazán kristályok hatékony feloldása is elengedhetetlen a pontos eredmény elérése érdekében. Oldódás szempontjából a tetrazólium sókból keletkezett formazán kristályok lehetnek vízben, illetve vízben nem, csak valamilyen szerves oldószerben oldhatóak. A vízoldható formazánok esetében az oldási folyamat nem igényel külön lépést, mivel a kristályok a sejtek szaporodását biztosító táptalajban intenzív színreakció mellett feloldódnak. A vízben oldhatatlan formazán kristályt képző tetrazólium sók esetében, amilyen az MTT is, azonban az oldószer kiválasztása is fontos lépés. Az MTT redukálódásának folyamatát az 1. ábrán mutatom be.



1. ábra: Az MTT redukálódása formazánná

2.4. Fehérje elválasztási és tisztítási módszerek

A fehérjék elválasztásának és tisztításának igénye azok felfedezésével párhuzamosan jelent meg. Tisztításokat már 200 évvel ezelőtt is végeztek, azonban a 20. század kezdetéig csak fehérje elválasztási műveletek léteztek, mint a szűrés, kicsapás (alkohol, ammónium szulfát) és kristályosítás.

1903-ban egy fontos mérföldkő következett, amikor a botanikus Mikhail Tswet növényi színanyagok kalcium-karbonát oszlopon történő szeparálásának módszerét írta le, majd megalkotta 1906-ban a kromatográfia kifejezést. Az ezt követő évtizedekben számos fontos fehérjeszeparálási módszert fejlesztettek ki, mint az affinitás kromatográfia (1930) és az ioncserés kromatográfia (1940).

Napjainkban is a legáltalánosabban használt preparatív fehérjetisztítási eljárások mind a kromatográfia körébe tartoznak, amelyek a mintában lévő fehérjét (elválasztani kívánt célfehérje) az egyéb anyagoktól, illetve más fehérjéktől az eltérő tulajdonságaik alapján választják el. Ezek a tulajdonságok attól függően, hogy a kromatográfiás oszlopon milyen töltetet alkalmazunk, lehetnek a méret (GF, gélszűrés), töltés (IEX, ioncserés kromatográfia), specifikus ligandumhoz való kötődés (AC, affinitás kromatográfia), fém ionhoz való kötődés (IMAC, immobilizált fémion affinitás kromatográfia), hidrofób jelleg (RPC, fordított fázisú kromatográfia, HIC, hidrofób kölcsönhatás kromatográfia), illetve izoelektromos pont (kromatofókuszálás).

A kromatográfiás eljárások lényege, hogy az elválasztandó anyagok keverékét tartalmazó mintát rögzített és mobil fázist tartalmazó rendszerben vándoroltatjuk, a mobil fázissal mozgatott minta összetevői affinitásuk függvényében oszlanak meg a két fázis között. A rögzített fázishoz nagyobb affinitást mutató anyagok vándorlása kromatográfia során a rögzített fázishoz mutatott affinitásuk arányában lelassul, a különféle anyagok elkülönülése létre jön. A gélkromatográfia során fizikai tulajdonságok alapján történik az elválasztás. Az elválasztási folyamat molekuláris jelenségei a gélfázist képező és az azt körülvevő folyadékterekben mennek végbe. A gélkromatográfia módszereinek két típusa van, az egyik a csoportelválasztás (pl.: fehérjék sómentesítése, peptidek és fehérjék ill. oligo- és poliszacharidok, stb., elválasztása) és a másik a frakcionálás, amikor a molekulákat méret alapján tudjuk elkülöníteni (KREMMER & BOROSS, 1974).

Munkám során a tejsavbaktériumok által termelt bakteriocinek elválasztására a felülúszóban lévő más fehérjéktől a gélszűrést (GF) alkalmaztam.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám céljául tűztem ki:

- Egy dehidrogenáz enzimaktivitás mérésen alapuló kolorimetriás módszer adaptálását *Laktobacillus* törzsek élő sejtszámának gyors meghatározására, ami bakteriocin gátló aktivitásának méréséhez is alkalmazható.
- Az új kidolgozott módszert befolyásoló paraméterek (pH, táptalaj, inkubációs idő) feltárását valamint a módszer esetleges validálásához szükséges teljesítmény jellemzőinek meghatározását, illetve a módszer összehasonlítását hagyományos élő sejtszám meghatározási módszerekkel.
- Bakteriocin termelést kódoló gének kimutatásához DNS izolálási módszer kidolgozását valamint a PCR eljárás optimalizálását.
- A PCR technikával igazolt bakteriocin (plantaricin) termelést kódoló gént tartalmazó törzsek felülűszójából a fehérje jellegű gátlóanyag izolálását gélkromatográfiás módszer segítségével valamint molekulatömegének meghatározását.
- Az izolált bakteriocin gátlóaktivitásának igazolását.

4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

4.1. Vizsgált *Lactobacillus* törzsek

7. táblázat: A vizsgálatokhoz alkalmazott tejsavbaktériumok

FAJOK	KOLLEKCIÓ SZÁM	TÖRZSEK JELÖLÉSE	SZÁRMAZÁSI HELY
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		N2	AFP
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	DMF 30120	154	ICT
<i>Lb. casei</i>		2107	AFP
		2752	AFP
		2756	AFP
		2763	AFP
<i>Lb. casei</i> Shirota		Shirota	FVM
<i>Lb. curvatus</i>		2768	AFP
		2770	AFP
		2771	AFP
		2775	AFP
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		B397	AFP
<i>Lb. fermentum</i>		D13	AFP
		DT41	AFP
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>casei</i>	DMF 30136	SF1	ICT
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DMF 30134	05	ICT
		2749	AFP
		2750	AFP
<i>Lb. plantarum</i>	DMF 30131	01	ICT
		2108	AFP
		2142	AFP
		2741	AFP
	DSM 9843	299v	FVM
		VE56	AFP
<i>Lb. rhamnosus</i>	DMF 30105	VT1	ICT
		GG	*
<i>Lb. sakei</i>	DSM 20017	<i>sakei</i>	AFP

ICT – Kémiai Technológiai Intézet, Tej és Zsírtechnológiai Tanszék (DMF- Department of Milk and Fat technology) Prága, Csehország

AFP – Perugia-i Egyetem Mezőgazdasági Tanszék, Tejipari Intézet, Olaszország

FVM - Utrecht-i Egyetem, Állatorvosi Kar, Hollandia

* - Multi-tabs[®] IMMUNO tablettából izoláltuk

DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganism

Kontrollként használt baktérium törzsek:

- ~ (Ta-wt) *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728
- ~ (Tb) *Thermobifida cellulosilytica* DSM 44535
- ~ (Top10) *Escherichia coli* DH10B

4.2. Alkalmazott táptalajok és összetételük

MRS tápleves (de Man, Ragosa, Sharpe)

(Merck KGaG, Darmstadt, Németország)

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

MRS agar

MRS tápleves összetétel +

Agar 15 g/l

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

MRS lágyagar

MRS tápleves összetétel +

Agar 7 g/l

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

Tejtáplé tejsavbaktériumok fenntartására

Sovány tejpor 100 g/l

Pepton 10 g/l

Brómkrezolbíbor 0,04 g/l

Kalcium-karbonát 0,2 g/kémcső

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

Csicsóka táplé

Csicsókapor (Dr. Fitokup Kft., Budapest) 100 g

Desztillált víz 900 ml

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

Céklalé

Céklalé (Dr. Steinberger Nachf., Unkel, Németország)

Dextróz 5 g/l

pH 6; 2 M-os NaOH oldattal beállítva

4.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek

4.3.1. Turbiditás mérésen alapuló módszer

A vizsgált tejsavbaktériumok szaporodását, illetve a gátlóanyagok sejtszámukra kifejtett hatását mikrotiter lemez segítségével is vizsgáltam. Ezen módszer a táplében lévő sejtek fényelnyelésén alapul. Egy steril 96 lyukú mikrotiter lemez első oszlopának lyukaiba 100 µl MRS táplevest, 80 µl desztillált vizet és 20 µl *Lactobacillus* szuszpenziót pipettáztam (tejsavbaktérium-szaporodás kontroll). A második oszlopba 100 µl MRS táplét, 80 µl gátlóanyagot és 20 µl desztillált vizet (vizsgált gátlóanyag-tápleves kontroll), a harmadik oszlopba 100 µl MRS táplevest és 100 µl desztillált vizet (tápleves kontroll), a negyedik oszlopba pedig 100 µl MRS táplevest, 80 µl gátlóanyagot és 20 µl tejsavbaktérium-szuszenziót pipettáztam (minta *Lactobacillus*-gátlás). Mindegyikből három párhuzamos sorozatot mértem. A bemérés után a lemezt 30 °C-os inkubátorba helyeztem, majd meghatározott időközönként a lyukakban lévő minták steril pipetta hegygel történő felkeverése után, spektrofotométer segítségével 630 nm-en mértem az abszorbanciát. A sejtszám meghatározásához 2-szeres tovaftató hígítási sort készítettem a tejsavbaktériumokból, majd a hígítási tagokból mikrotiter lemezre mértem, illetve lemezöntést végeztem. A mért abszorbanciából és a meghatározott telepszámból készített kalibrációs görbe segítségével határoztam meg az adott abszorbancia értékhez tartozó sejtszámot.

4.3.2. Telepszámlálós módszer

A vizsgált *Lactobacillus* törzsek sejtszámának meghatározását lemezöntéssel végeztem. A sejtszám meghatározás során a vizsgálati mintából tízszeres tovaftató hígítási sort készítettem, amely szükségesnek vélt tagjaiból (általában 4., 5., 6.) 1 ml-t steril Petri-csészébe pipettáztam, majd megközelítőleg 20 ml, körülbelül 50 °C-os MRS agart öntöttem a csészébe, amelyet megfelelő elosztatás és megszilárdulás után 30 °C-os inkubátorba helyeztem. A kiválasztott hígítási tagok mindegyikéből három párhozamos lemezt öntöttem. A kiértékelés 48 - 72 óra elteltével lehetséges. A telepszámlálás során azokat a lemezeket vettem figyelembe, amelyeknél a sejtszám 30 és 300 között volt. A megszámlolt telepekből a *Lactobacillus*-ok tényleges sejtszámára a Magyar Élelmiszerkönyv „A nyers- és hőkezelt tej vizsgálati módszerei” (2003) című előírásában leírt erre vonatkozó számolással következtettem.

4.3.3. Agardiffúziós módszer (Lyuk-teszt)

A vizsgált gátlóanyagoknak az alkalmazott tesztorganizmusra kifejtett gátlóaktivitásának a meghatározására alkalmas módszer. A kiválasztott tejsavbaktérium törzsekből 10-szeres tova futó hígítási sort készítettem, melynek a 4. tagjából 1 ml-t pipettáztam egy kémcsőbe, amely előzőleg felolvasztott és 40 °C-ra visszahűtött 9 ml MRS agart tartalmazott. Az így előkészített hozzávetőleg milliliterenként 10^4 sejtet tartalmazó MRS agarból kettő kémcsőnyit, 20 ml-t steril Petri-csészébe öntöttem. Az agar megszilárdulását követően steril 200 µl-es pipetta hegy segítségével 7 mm átmérőjű lyukakat fúrtam. A vizsgálni kívánt gátlóanyagból 80 µl-t juttattam az agarban kialakított lyukakba, ahonnan az bediffundált a megszilárdult táptalajba. A gátlóanyag agarba történő bediffundálásának elősegítése céljából a Petri-csészéket 52 °C-os szárítószekrénybe helyeztem a felszívódásig. Ezt követően a lemezeket 30 °C-os inkubátorba tettem a kiértékelésig. Az agarban az adott törzs elszaporodott, miközben a lyukakból bediffundált gátlóanyag kifejtette hatását szaporodásukra. A gátlóhatás mértékére a lyukak körül kialakult „feltisztulási zóna” nagyságából következtethetünk. Az eredmények kiértékelése 48 - 72 óra elteltével lehetséges.

4.3.4. MTT kolorimetriás módszer

A módszer lényege, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimeai az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromid) tetrazólium gyűrűjét vízben oldhatatlan színes formazánná alakítja, így annak mennyisége jól korrelálva az élő sejtek számával, kolorimetriásan meghatározható.

A felszaporított tejsavbaktérium lecentrifugálása után eltávolítottam az MRS táplevest a sejtekről, majd 10^8 - 10^9 sejt/ml-re állítottam be a sejtkoncentrációt fiziológiás sóoldat segítségével. A beállított sejtszámot mikrotiterlemez-leolvasó segítségével 630 nm-en ellenőriztem. A megfelelő sejtszám esetén 1 ml-t pipettáztam a mintából egy 2 ml-es Eppendorf csőbe, majd hozzáadtam a vizsgálni kívánt gátlóanyagból 100 µl-t, illetve 100 µl előzőleg elkészített 8 - 9 mg/ml koncentrációjú MTT-t. A tetrazolium-bromidot foszfát pufferelt sóoldatban (pH 7,2) oldottam fel majd 0,2 µm-es fecskendőszűrőn átszűrtem. Az összemért mintákból minden esetben 3 párhuzamost készítettem, amelyeket 37 °C-os inkubátorba helyeztem 2 órára. Az inkubációs idő elteltét követően a csöveket 6000 ford./perc fordulatszámra lecentrifugáltam, majd a felülszót elöntöttem. A visszamaradt formazán kristályokat 1 ml DMSO hozzáadásával és 400 ford./perces rázatással szobahőmérsékleten 10 perc alatt oldottam fel. Az így kapott oldat színintenzitását spektrofotométer segítségével

mértem 595 nm-en (a DMSO-ban feloldott formazán kristályok maximális abszorbanciája 500 – 600 nm között van).

Egyes méréseknél az MTT kolorimetriás módszer továbbfejlesztett, mikrotiterlemezre kidolgozott változatát (mMCA) alkalmaztam, amely idő, energia és vegyszer megtakarítást tett lehetővé. E módszer annyiban különbözik az előzőekben leírt eljárástól, hogy a mintákat steril 96 lyukú mikrotiterlemezre mérem össze, így a *Lactobacillus* sejteket tartalmazó fiziológiás sóoldatból 200 µl-re, a gátlóanyagból 20 µl-re és a feloldott MTT-ből is (8 mg/ml) csak 20 µl-re, illetve a 2-órás inkubáció elteltével és a felülúszó eltávolítását követően a DMSO-ból is mindössze 200 µl-re van szükség.

4.3.5. PCR technika

4.3.5.1. DNS izolálás

A különböző tejsavbaktériumok PCR technikával történő azonosításának első lépése a DNS izolálása a mintából. Ez különböző módszerekkel történhet és célja a megfelelő mennyiségű és tisztaságú, sokszorozható DNS kinyerése. A baktérium mintákból történő DNS izolálásához minden esetben módosított Wizard módszert alkalmaztam (Promega).

4.3.5.2. A DNS izoláláshoz szükséges oldatok és reagensek

- A'' oldat (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1,2 % Triton X-100, 20 mg/ml lizozim, pH 7,5)
- Wizard puffer (10 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % SDS);
- 5 M guanidin-hidroklorid oldat;
- 20 mg/ml proteináz-K enzim oldat;
- 80 %-os izopropil-alkohol;
- TE puffer (10 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0))

4.3.5.3. Módosított Wizard módszer

- A tejsavbaktériumok MRS táplevesben történő felszaporítása után a sejtek lecentrifugálását és a felülúszó eltávolítását követően fiziológiás sóoldattal átmostam a sejteket és ismét lecentrifugáltam azokat.

- Az így kapott tiszta sejtekből 40 mg mintát mértem egy 2 ml-es steril Eppendorf csőbe, amelyhez QuickGene-mini80 DNS izoláló módszerben alkalmazott úgynevezett „A” oldatból 160 µl-t mértem. Ezt követően 30 percre 37 °C-os vízfürdőbe helyeztem, majd az inkubációs idő felénél a sejteket tartalmazó csöveket megkevertem.
- Ezután 860 µl extrakciós puffert (TNE), 100 µl 5M-os guanidin hidrokloridot és 40 µl 20 mg/ml proteináz K enzimet pipettáztam a mintához. Tizenöt másodpercnyi maximális sebességű vortexelést követően az így előkészített mintákat 60 °C-os inkubátorba helyeztem folyamatos keverés mellett 90 percre.
- Inkubálás után a mintát 10 percig 14000 rpm-n centrifugáltam (AB2.14 típusú szögrotor Eppendorf csövekhez, Jouan BR4i centrifuga). Ötszáz mikroliter felülúszót átpipettáztam 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe, majd 1-1 ml Wizard gyantát adtam hozzá.
- A keveréket átforgattam, majd minioszlopon fecskendő segítségével átnyomtam, így a DNS-t a gyanta megkötötte, amely így az oszlopban lévő szűrőn fennmaradt.
- Az oszlopon lévő mintákat 2 ml 80 %-os izopropanollal mostam fecskendő segítségével, majd a maradék izopropanolt centrifugálással (14000 x g, 2 perc) távolítottam el.
- A minioszlopról 50 µl, 70 °C-os TE puffer segítségével eluáltam a megkötött DNS-t (14000 x g, 2 perc).
- Az izolált DNS oldatok tisztaságát és koncentrációját spektrofotometriás analízissel vizsgáltam és felhasználásig -20 °C-on tároltam.

4.3.5.4. Az izolált DNS tisztaságának meghatározása

A DNS oldatok jellemzésére spektrofotometriás mérést és gél-elektroforézist végeztem. A DNS oldat koncentrációját és a tisztaságára jellemző R értéket spektrofotometriás analízissel határoztam meg a 260 és 280 nm-en mért abszorbancia értékek hányadosa alapján. A DNS izolálást minden esetben két párhuzamos mintával végeztem. Ha a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciák hányadosa 1,7-2,0 közötti, akkor az extrahált DNS oldat megfelelő tisztaságú, ha 1,7-nél kisebb, az extrahált oldatban fehérje is jelen van, ha 2,0-nél nagyobb, az extrahált oldat RNS-t is tartalmaz. Amennyiben a minta 260 nm hullámhosszon mért abszorbancia értéke 1,0 az megfeleltethető 50 µg/ml koncentrációjú, duplaszálú DNS oldatának.

Az izolált DNS fragmentumnagyság-változását 1%-os agaróz-gélelektroforézissel követtem nyomon. Az elektroforézist MANIATIS et al. (1989) szerint hajtottam végre 100V állandó feszültség mellett 45 percig, 10 µl DNS oldat/zseb mintamennyiséggel, 1x TBE

pufferben LKB Midget Electrophoresis Unit készülékkel. A géleket etidium-bromid oldattal (1 µg/ml) festettem és az eredményeket KODAK EDAS 290 rendszerrel értékeltem ki.

4.3.5.5. Polimeráz láncreakció

A PCR-rendszerek a sejtek genetikai információját meghatározó DNS kimutatásán alapulnak, melynek három alaplépése a megfelelő tisztaságú DNS izolálása, a DNS szakaszok polimeráz enzimmal történő felszorzása, valamint a termékek azonosítása.

4.3.5.6. A laktobacilluszok szelektív kimutatására, valamint a plantaricin gént tartalmazó törzsek megkülönböztetésére felhasznált primerek

A PCR vizsgálatokhoz felhasznált primereket az 8. és 9. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: *Lactobacillus*-ok szelektív kimutatásához felhasznált primerek

Primer neve	Primer szekvenciája	Irodalom
IFL	5'-AGAAGAGGACAGTGGAAC-3'	SINGH & RAMESH (2008)
IFR	5'-TTACAAACTCTCATGGTGTG-3'	

9. táblázat: A plantaricin gént tartalmazó törzsek megkülönböztetésére felhasznált primerek

Primer neve	Primer szekvenciája	Irodalom
PlnA1	5'-ATGAAAATTCAAATTAAAGGTATGAAGC-3'	MALDONADO et al. (2004)
PlnA2	5'-TTACCATCCCCATTTTAAACAGTTTC-3'	

4.3.5.7. A polimeráz láncreakció reagensei

A tejsavbaktériumok vizsgálatokor alkalmazott PCR-es vizsgálatok során:

- DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)-et (Thermo Scientific),
- Primereket (InvitrogenTM),
- PCR tiszta vizet (Sigma) használtam.

4.3.5.8. A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált reakcióelegy összetétele

A laktobacilluszok szelektív kimutatására, és a plantaricin-gént tartalmazó törzsek azonosítására alkalmas PCR reakcióhoz felhasznált reakcióelegy összetételét a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: PCR reakcióelegyek összetétele

<i>Lactobacillus</i>-szelektív PCR	Plantaricin-gén jelenlétének kimutatása
<ul style="list-style-type: none">▪ 3 µl templát DNS (20 ng/ µl),▪ 1,8 µl forward primer, (8 µmol/ µl)▪ 1,8 µl reverse primer, (8 µmol/ µl)▪ 12,5 µl master mix,▪ 5,9 µl PCR tiszta víz <hr/> összesen: 25 µl	<ul style="list-style-type: none">▪ 5 µl templát DNS (20 ng/ µl),▪ 2 µl forward primer, (8 µmol/ µl)▪ 2 µl reverse primer, (8 µmol/ µl)▪ 12,5 µl master mix,▪ 3,5 µl PCR tiszta víz <hr/> összesen: 25 µl

4.3.5.9. A laktobacilluszok szelektív kimutatására, és a plantaricin-gént tartalmazó törzsek azonosítására alkalmas PCR reakció paraméterei

A laktobacilluszok szelektív kimutatására, és a plantaricin-gént tartalmazó törzsek azonosítására alkalmas primereket a megadott irodalomban ismertetett szekvencia információk alapján szintetizáltattam (Invitrogen™). A vizsgálatok során elsőként meg kellett határoznom az adott, egyszálú templát DNS sokszorozásához szükséges PCR-reakció optimális paramétereit. Ezek a vizsgálatok kiterjedtek többek között az optimális primer-és templát DNS koncentrációjának meghatározása mellett, az optimális primer-kapcsolódási hőmérséklet és a ciklusszám meghatározására. Eredményeimet, valamint a továbbiakban alkalmazott PCR-reakció körülményeit a 11. táblázatban tüntettem fel.

11. táblázat: A laktobacilluszok szelektív kimutatására, valamint a plantaricin-gént tartalmazó törzsek azonosítására alkalmazott PCR-reakció paraméterei

Vizsgálat neve	Sokszorozandó szakasz hossza (bp)	Kettős szálú DNS szétválása	Primer kapcsolódás	DNS átiródás polimeráz enzimmel	Extenziós szakasz	Ciklus-szám
<i>Lactobacillus</i> -ok szelektív kimutatására alkalmas PCR	767 bp	94 °C 3 min + 94 °C 30 sec	59 °C 30 sec	72 °C 40 sec	72 °C 3 min	33
Plantaricin-gént tartalmazó törzsek azonosítására alkalmas PCR	159 bp	94 °C 3 min + 94 °C 30 sec	56°C 30 sec	72 °C 40 sec	72 °C 3 min	33

4.3.5.10. Gélelektroforézis

A PCR reakció során keletkezett különböző hosszúságú DNS-fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel nagyság szerint lehet elválasztani egymástól.

A gélelektroforézishez felhasznált reagensek:

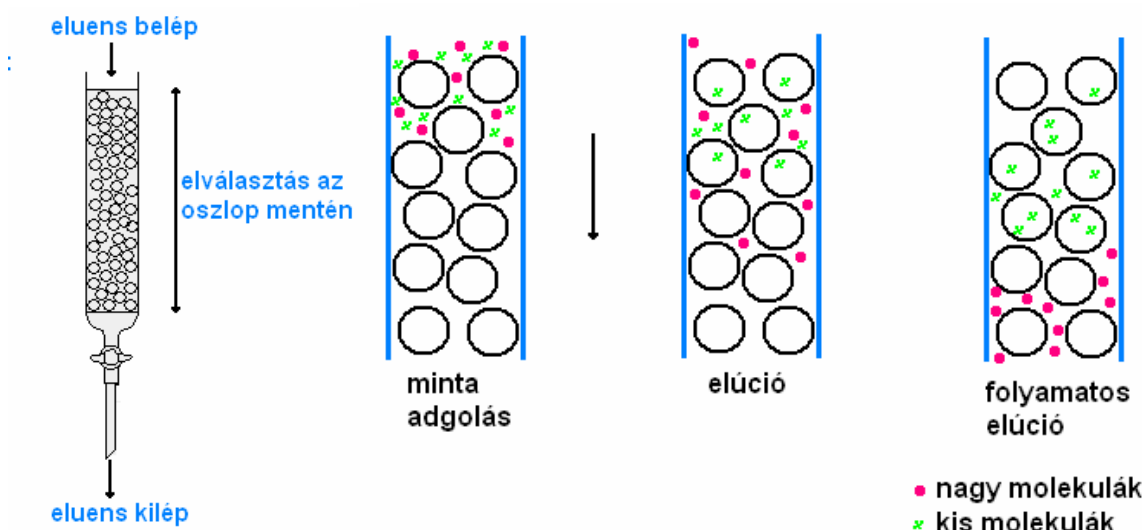
- TRIS-Bórsav-EDTA elektroforézis puffer (TBE puffer), pH 8,0 10x törzsoldat (108 g TRIS bázis, 55 g bórsav, 40 ml 0,5 M Na₂EDTA);
- 1%-os agarózgél (Sigma) oldat TBE pufferben;
- Etidium-bromid gélfestő oldat (1 µg/ml etidium-bromid desztillált vízben);
- DNS bázispár hossz-standard (Fermentas)

A gélelektroforézis lépései:

A vizsgálatok során a mintákat 1%-os agaróz gélen futtattam. A mintákból 10-10 µl-t, a használt DNS markerből 5 µl-t vittem fel a gélekre. Körülbelül 45 percen át, 200 V állandó feszültség mellett történt az elektroforézis, LKB Midget Electrophoresis Unit típusú készülékkel. Futtatás után a gél 15 percig etidium-bromid festékkel festettem és a kapott mintázatot a DNS-hosszúság markerrel értékeltem ki. Az így kapott géleket UV transzilluminátor alatt vizsgáltam, majd megfelelő szűrőfeltét alkalmazása mellett Kodak EDAS 290 rendszerrel (EASTMAN KODAK, USA) dokumentáltam és értékeltem ki az eredményeket.

4.3.6. Gélkromatográfia

Vizsgálataim során a fehérjék molekulaméret alapján történő elválasztását alkalmaztam *Lactobacillus* törzsek felülúszójából történő bakteriocin izolálására. Az elválasztási folyamat sematikus képét az 2. ábra mutatja be. A megfelelő elválasztáshoz fontos a helyes szemcseméretű töltet kiválasztása.



2. ábra: A gélkromatográfia működése

4.3.6.1. Szűrőoszlop készítése

Az oszlop elkészítéséhez szükséges mosó- és töltő pufferként mononátrium-foszfát (NaH_2PO_4 , 3,2 g/L) 20 mM-os oldatát alkalmaztam. Töltétként pedig a Molselect G-25 elnevezésű, 40-120 μm szemcseátmérőjű félszintetikus gélképző anyagot használtam.

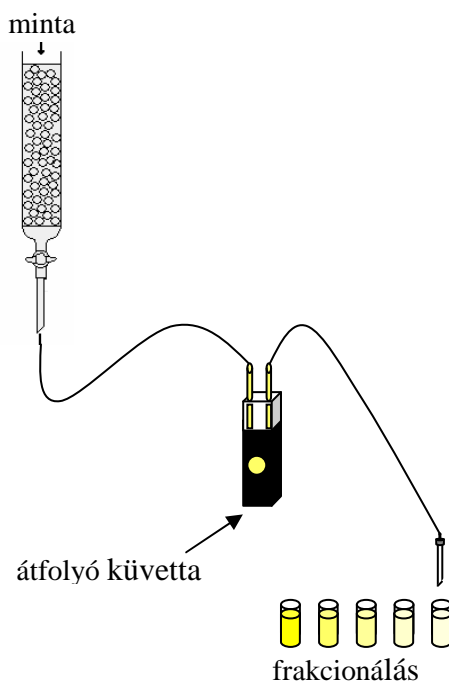
A töltet elkészítéséhez a Molselect gélképző anyagból desztillált vízben feloldva azt 95 °C-os vízfürdőben kevertetve (kb. 30 perc) 10 %-os oldatot készítettem. Az így előkészített oldatot az oszlopba töltöttem, úgy, hogy a szemcsék ülepedése egyenletes legyen, a kifolyócsap a művelet során nyitva van.

A kész szűrőoszlopot, amelynek átmérője 1 cm, a töltet magassága 10 cm, felhasználásig hűtve tároltam.

4.3.6.2. A vizsgálat menete

A vizsgálni kívánt *Lactobacillus* törzseket MRS táplékban felszaporítottam. Centrifugálással eltávolítottam a sejteket és a felülúszót vittem fel a gélészűrő oszlopra, amelyet a használat előtt 50 ml pufferrel átmostam.

Az oszlopon átfolyt minta abszorbanciáját 280 nm hullámhosszon mértem spektrofotométer és egy átfolyó kivetta segítségével. A mérés menetét a 3. ábrán mutatom be.



3. ábra: A gélkromatográfiás frakcionálás folyamatábrája

A vizsgálat során 5 ml felülúszót vittem fel az oszlopra. A spektrofotométer mérése alapján az első megjelent jeltől kezdve 3 ml-es steril csövekbe 2 ml-enként vettem külön a frakciókat, amelyeket 0,22 μm -es fecskendőszűrő segítségével sterilre szűrtem és a felhasználásig hűtőben tároltam.

4.3.7. Fehérjék elválasztása és kimutatása SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE)

A fehérjék molekulasúly szerinti elválasztását akrilamid és bisz akrilamid tartalmú 15 %/16 %-os elválasztó-/gyűjtőgélben, Trisz-SDS-glicin tartalmú futtató-pufferrel végeztem Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Cell készülékkel (BioRad power PAC1000 feszültségadó készülékkel)

alkalmazva, beállított paraméterek ($U=200$ V konstans, $I=54$ mA, $P=11$ W, futtatás ideje=65 perc) mellett. A mintákat Trisz-SDS-glicerín- β -merkapto-etanol tartalmú mintaoldó-pufferben oldottam, majd 5 percig forraltam a mintafelvétel előtt. A gél zsebeibe a minták felvitele előtt futtató pufferben oldott brómfenolkék jelzőfestéket pipettáztam.

Az elektroforézis befejezése után a szeparált fehérjéket 20 percig fixáltam 20 % triklór-ecetsav (TCA) oldatban. A maradék TCA eltávolításához háromszor 10 percig rázattam a géleket PAGE-mosó oldatban. Ezután 10 percig Comassie Brilliant Blue R-250 festékoldatban rázattam a gél, majd 6 perc után 10 % ecetsav-oldattal távolítottam el a háttérben maradt felesleges festéket.

5. EREDMÉNYEK

5.1. MTT kolorimetriás módszer adaptálása és alkalmazása

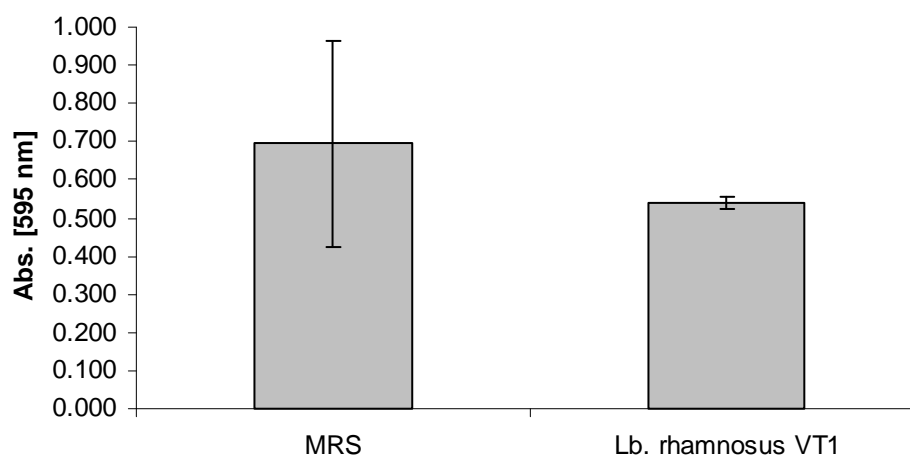
Az elsőként Mosmann (1983) által leírt MTT kolorimetriás módszert, amelyet eredetileg emlős sejtek vizsgálatára dolgozott ki, sokan alkalmazták saját kutatásaikhoz különböző módosításokkal. A számos módosítás közül az egyik ilyen a Wang Fang és munkatársai (2007) által leírt MTT módszer, amelyet a *Micrococcus luteus* Gram-pozitív baktérium vizsgálatához fejlesztettek ki. Ezt az eljárást alapul véve kívántam átalakítani a módszert úgy, hogy a tejsavbaktérium törzseink vizsgálatához alkalmas legyen.

A módszer két fontos részre osztható fel, az egyik az élő sejtek dehidrogenáz enzimei által a tetrazólium bromidból képzett formazán képződése, a másik pedig a keletkezett, vízben oldhatatlan kristályok feloldása szerves oldószerrel. A keletkezett formazán kristályok mennyisége függ a sejtek számától, illetve azok dehidrogenáz enzimeinek aktivitásától, valamint nagymértékben függ a hozzáadott kezdeti tetrazólium só koncentrációjától. A vízzoldhatatlan formazán kristályok maradéktalan feloldása is elengedhetetlen ahhoz, hogy pontos eredményeket kapjunk. Az MTT-ből keletkezett formazán kristályok oldásához alkalmazott megfelelő oldószerekkel kapcsolatban eltérő eredmények találhatók az irodalomban. Huamin és munkatársai (2002) szerint az izopropanol a legmegfelelőbb oldószere az MTT-ből keletkezett formazán kristályoknak, azonban az irodalmi adatok nagyobb számban utalnak arra, hogy a legalkalmasabb erre a célra a dimetil-szulfoxid (DMSO), amely maradéktalanul képes feloldani a formazán kristályokat, illetve kellőképpen stabil, színes oldatot eredményez (CARMICHAEL et al., 1987; TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987; ALLEY et al., 1988; CAMPLING et al., 1991). Vizsgálataim során is azt tapasztaltam, hogy a törzsek által termelt formazán kristályokat maradéktalanul feloldja a dimetil-szulfoxid, amely 24 óra elteltével is változatlan abszorbanciával rendelkezett.

A módszer adaptálásakor tehát fontos a különböző paraméterek, MTT koncentráció, inkubációs idő, sejtkoncentráció pontos meghatározása, valamint a megfelelő oldószer kiválasztása is.

5.1.1. A táptalaj redukáló hatása

Amint azt sokan mások is tapasztalták a tetrazólium sók alkalmazása során igen sok tényező okozhatja azok redukálódását a vizsgálni kívánt élő sejtek dehidrogenáz enzimein kívül (PENG et al., 2005; LAAKSONEN et al., 2007; TALORETE et al., 2006; FISCHER et al., 2010). A vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy a tejsavbaktériumok szaporítására alkalmazott MRS táptalaj igen nagy mértékben képes redukálni a hozzáadott tetrazólium bromidot mikroorganizmusok jelenléte nélkül, fals pozitív jelet eredményezve. Az MRS táptalaj MTT-t redukáló hatását a 4. ábrán szemléltetem. A hiba kiküszöbölésére a vizsgálatok során minden esetben szükséges az MRS táptalaj maradéktalan eltávolítása a sejtekről az MTT hozzáadása előtt.



4. ábra: Az MRS-táptalaj redukáló hatása. (MRS: kizárólag MRS tápleves élő mikroorganizmusok nélkül, *Lb. rhamnosus* VT1: fiziológiás sóoldat, amely élő *Lactobacillus*-t tartalmaz)

A 4. ábra jól szemlélteti, hogy az MRS tápleves élő mikroorganizmusok jelenléte nélkül is képes redukálni az MTT-t. A sejtek szaporítására alkalmazott különféle táptalajok MTT-t redukáló hatásairól korábban számos esetben beszámoltak már (DENIZOT & LANG, 1986; DIAS et al., 1999; WANG H. et al., 2010), ezzel szemben WANG F. és munkatársai (2007) nem tettek említést a szaporító tápközeg redukáló hatása által okozott problémáról.

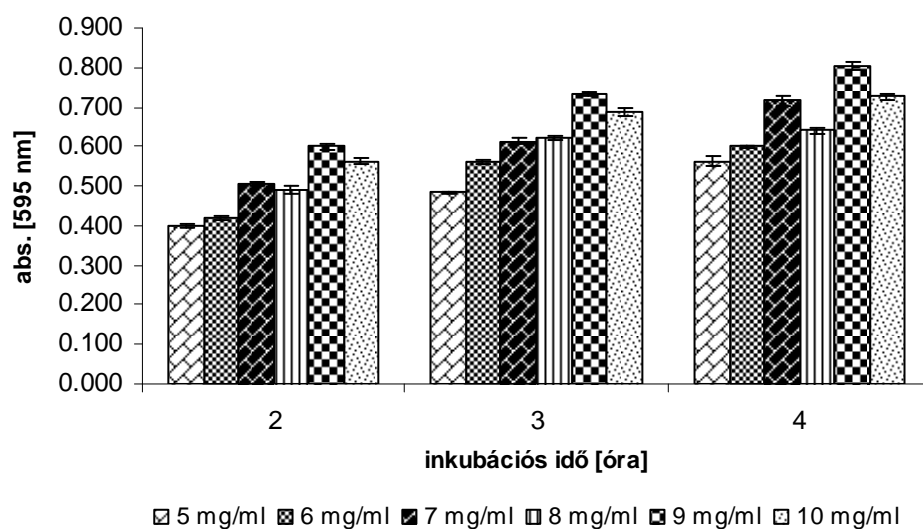
5.1.2. Az inkubációs idő és az MTT koncentráció kiválasztása *Lactobacillus*-ok dehidrogenáz enzimaktivitásának méréséhez

A vizsgálni kívánt sejtektől és mikroorganizmusoktól függően az alkalmazott MTT koncentráció igen tág határok között mozoghat, az irodalmi adatok szerint 1mg/ml és 10 mg/ml koncentrációk között alkalmazzák (STOWE et al., 1995; ABATE et al., 1998; DIAS et al., 1998). Leggyakrabban az eredeti módszert alapul véve (MOSMANN, 1983), 5 mg/ml koncentrációban alkalmazzák az MTT-t (WANG et al., 2010; SARAVANAN et al., 2003).

Az ideális inkubációs idő megválasztása is fontos, e paraméter is tág határok között mozoghat, pár órától akár 24 óráig is (ABATE et al., 1998; DIAS et al., 1999; SARAVANAN et al., 2003; WANG et al., 2007).

Az optimális MTT koncentráció és az inkubációs idő meghatározásához *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset alkalmaztam, amelynek sejtszámát $6-7 \cdot 10^8$ sejt/ml koncentrációra állítottam be. A beállított sejtszámú mintából 1-1 ml-t pipettáztam 2 ml-es Eppendorf csövekbe, amelyekhez hozzáadtam 100 μ l ismert koncentrációjú (5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/ml) MTT oldatot.

Az összemért oldatokat 37 °C-os inkubátorba helyeztem, majd 2, 3 és 4 óra elteltével mértem az abszorbanciát 595 nm-en spektrofotométer segítségével. Az eredményeket az 5. ábra mutatja be.

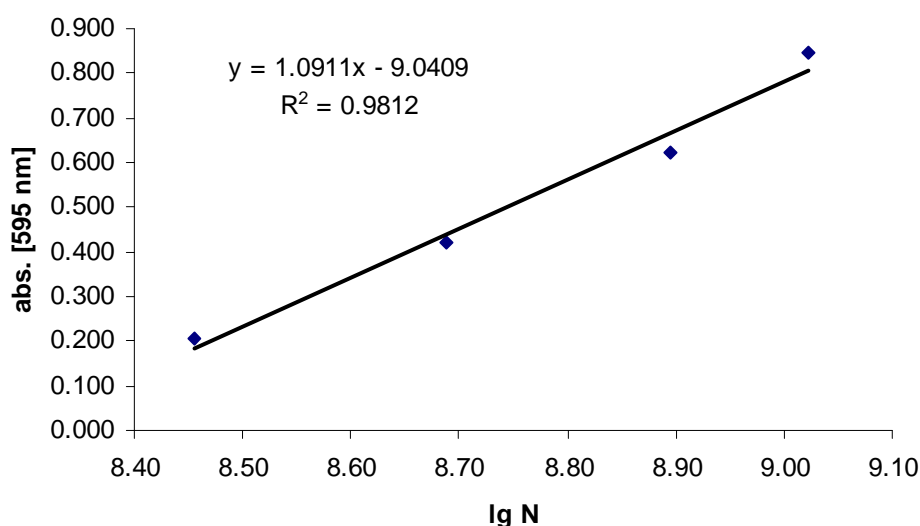


5. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése különböző MTT koncentráció és eltérő inkubációs idő esetén

A 9 mg/ml koncentrációjú MTT esetében kaptam a legnagyobb jelet mindegyik inkubációs idő esetében. A 10 mg/ml koncentrációjú MTT esetében kisebb jelet kaptam, mint a 9 mg/ml koncentráció esetén, ennek oka az lehet, hogy a magasabb koncentráció esetén az MTT gátló hatást fejthet ki a tesztmikroorganizmusra (TENGERDY et al., 1967; STOWE et al., 1995). Az inkubációs idő növelésével a keletkezett formazán mennyisége is növekszik. Mivel egy gyorsmódszert szeretnénk létrehozni, a 2 órás inkubációs időt választottuk a további vizsgálatainkhoz.

5.1.3. A legkedvezőbb sejtkoncentráció meghatározása

Az optimális mérési tartomány meghatározásához hígítási sort készítettem a *Lactobacillus plantarum* 2142 törzsből 10^9 és 10^6 sejt/ml koncentráció között. Ebben az esetben is 1 ml mintához adtam 100 µl 9 mg/ml MTT oldatot és 37 °C-os 2 órás inkubációt követően mértem a keletkezett formazán mennyiséget. Az eredményeket az 6. ábra mutatja.



6. ábra: Optimális méréstartomány meghatározása *Lactobacillus plantarum* 2142 esetén

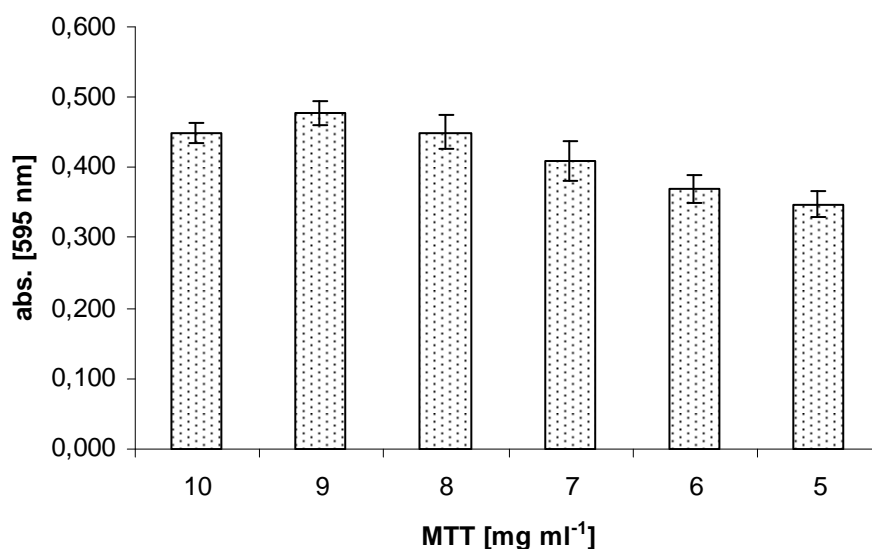
A bemutatott 6. ábrán látható, hogy *Lactobacillus plantarum* 2142 esetében, 10^8 - 10^9 sejt/ml koncentráció tartományban lineáris összefüggés tapasztalható a sejtszám és a keletkezett formazán kristályok mennyisége között. *Lactobacillus plantarum* 2142 esetén 10^8 sejt/ml sejtkoncentráció alatt nem kaptam értékelhető jelet.

5.1.4. MTT módszer alkalmazása mikrotiter lemezen

Az MTT kolorimetriás módszer mikrotiter lemezen történő alkalmazása számos törzs és paraméter egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé, illetve igen lényeges szempont, hogy a

kísérletek során kevesebb mennyiségű vegyszer és táptalaj felhasználása szükséges. Azonban ahhoz, hogy a módszer ilyen módon is alkalmazható legyen, ebben az esetben is szükséges a paraméterek előzetes optimalizálása.

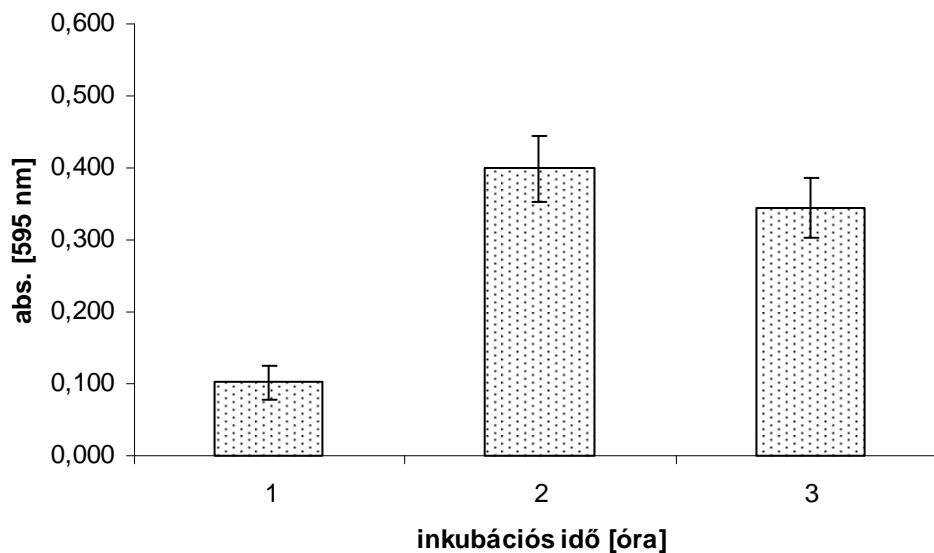
Az inkubációs idő és az ideális MTT koncentráció meghatározásához mikrotiter lemezen *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset alkalmaztam $7 \cdot 10^7$ sejt/ml sejtkoncentrációban. A megfelelő MTT koncentráció meghatározásához, foszfát pufferelt sóoldatban feloldva 5, 6, 7, 8, 9 és 10 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettem. Az abszorbanciát 2 órási 37 °C-os inkubációt követően mértem. A kapott eredményeket a 7. ábrán mutatom be.



7. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése különböző MTT koncentrációk esetén

A keletkezett formazán mennyisége függ az alkalmazott MTT koncentrációjától. Mivel a 8 és 9 mg/ml koncentráció között nincs szignifikáns különbség 95%-os biztonsági szinten (Minitab 13.1), ezért a további vizsgálatokhoz a 8 mg/ml MTT koncentraciót alkalmaztam.

Az ideális inkubációs idő megállapításához előzőleg optimálisnak talált 8 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot alkalmaztam $7 \cdot 10^7$ sejt/ml koncentrációjú *Lb. plantarum* 2142 törzs esetében. A lemezeket 37 °C-os inkubátorba helyeztem 1, 2, illetve 3 órára. A kapott eredményeket a 8. ábra szemlélteti.

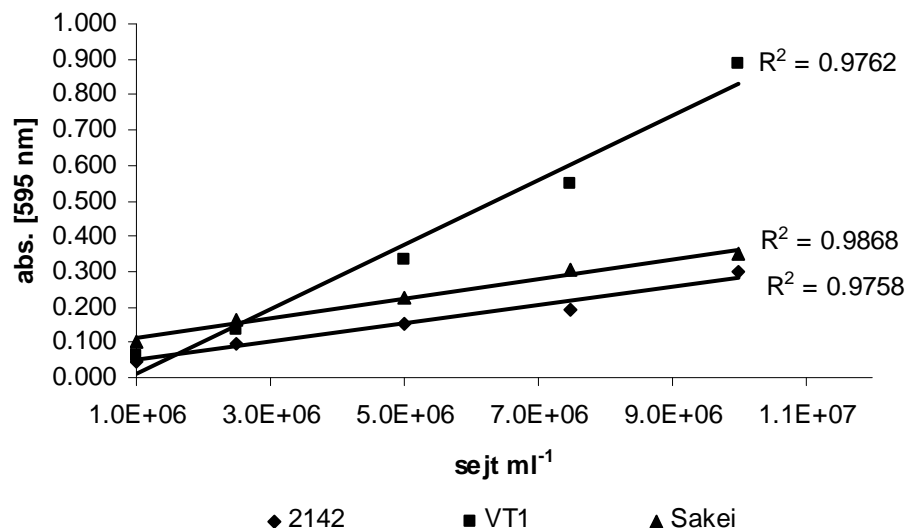


8. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése 8 mg/ml MTT koncentráció és különböző inkubációs idők esetén

A keletkezett formazán mennyisége négyszer nagyobb volt a 2 órás inkubációs idő esetében, mint az 1 órás inkubációt követően, azonban az inkubációs idő továbbnövelésével, az Eppendorf csőre kidolgozott módszerrel ellentétben, itt már nem volt elérhető nagyobb formazán mennyiség. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a mikrotiterlemez módszer esetében lényegesen kisebb a reakcióelegy térfogata, amely így rövidebb idő alatt elérte a reakcióhoz szükséges ideális hőmérsékletet. A további kísérletekhez a 2 órás inkubációs időt és 8 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot alkalmaztam.

5.1.5. MTT redukáló képesség vizsgálata különböző törzsek esetében

Az előzőekben megállapított optimális paramétereket alkalmazva mikrotiter lemezen vizsgáltam különböző tejsavbaktérium törzsek enzimaktivitását.



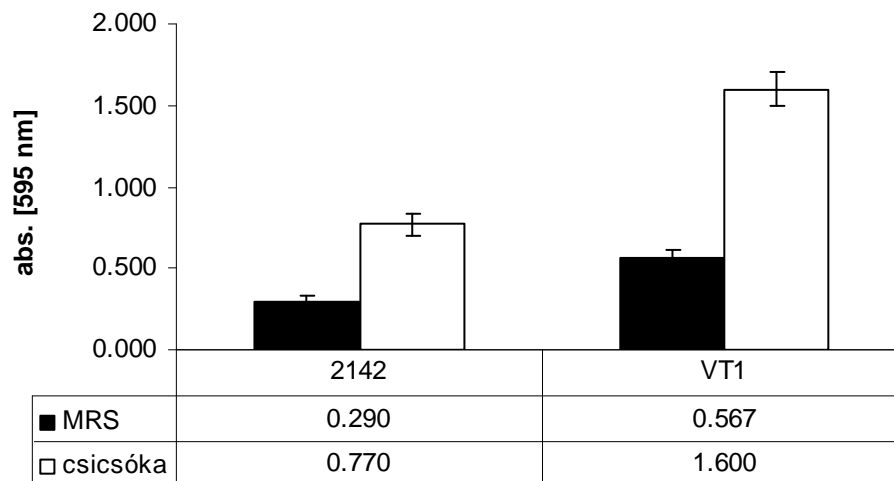
9. ábra: Formazán képződés és a sejtszám összefüggése (*Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus rhamnosus* VT1, *Lactobacillus sakei* DSM 20017)

Ahogy az a 9. ábra is jól szemlélteti, a különböző *Lactobacillus* törzsek eltérő dehidrogenáz enzim aktivitással rendelkeznek ugyanakkora sejtszám mellett. A legnagyobb mennyiségű formazánt a *Lactobacillus rhamnosus* VT1 képezte a vizsgált törzsek közül, míg a *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus sakei* DSM 20017 közel azonos mennyiséget képeztek.

5.1.6. A táptalaj hatása az enzimaktivitásra

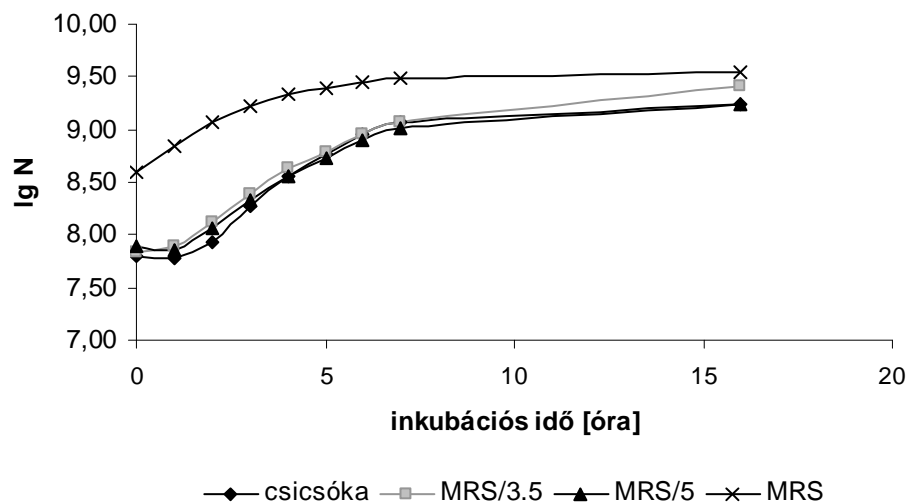
Az előző kísérletekből világossá vált, hogy a különböző tejsavbaktérium törzsek azonos sejtszám mellett eltérő enzimaktivitással rendelkeznek, vagyis adott mennyiségű MTT-ből eltérő mennyiségű formazánt képesek redukálni. A további kísérletekben megvizsgáltam, hogy miként változik a törzsek enzimaktivitása, ha mesterséges táptalaj helyett természetes csicsóka táptalajon szaporítom azokat.

A természetes és mesterséges táptalajokat egyaránt 10^5 sejt/ml induló sejtszámmal oltottam be, amelyeket 30 °C-os inkubátorba helyeztem. Tizenhét órás inkubációt követően a mintákat lecentrifugáltam, a felülúszókat eltávolítottam és a sejtszámokat azonosra állítottam be fiziológiás sóoldat segítségével. Ezt követően mértem a sejtek dehidrogenáz enzimaktivitását, amelyek eredményét a 10. ábra mutatja.



10. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus rhamnosus* VT1 formazán képzése azonos sejtszám és eltérő táptalaj esetén

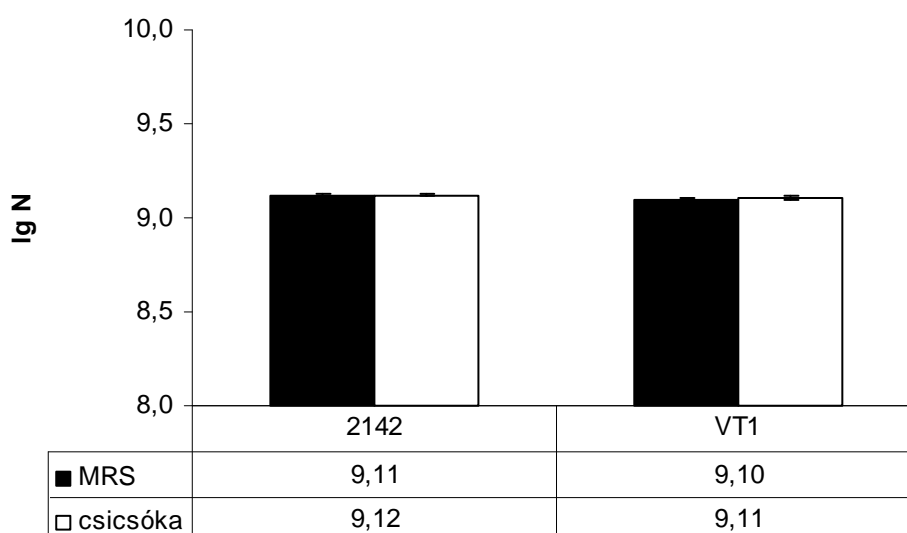
Az eredmények azt mutatták, hogy ugyanakkora sejtszám mellett különböző táptalajon szaporítva az azonos törzsek esetében is eltérő enzิมaktivitás figyelhető meg. A csicsóka táptalajon szaporított baktériumok enzımaktivitása mind a két törzs esetében lényegesen nagyobb volt, mint az MRS-en szaporított mikroorganizmusoké. Azt feltételeztem, hogy az azonos törzsek különböző táptalajon mutatott dehidrogenáz enzımaktivitásbeli különbsége az egyes táptalajok eltérő szubsztrátumából eredő különböző szaporodási sebességekből is következhet. Ennek a hipotézisnek az igazolására a következő kísérleteket végeztem el. Mesterséges MRS táptalaj hígításával értem el, hogy a teszt mikroorganizmus azonos szaporodási görbét mutasson mindkét táptalajon, melynek eredményét a 11. ábra mutatja.



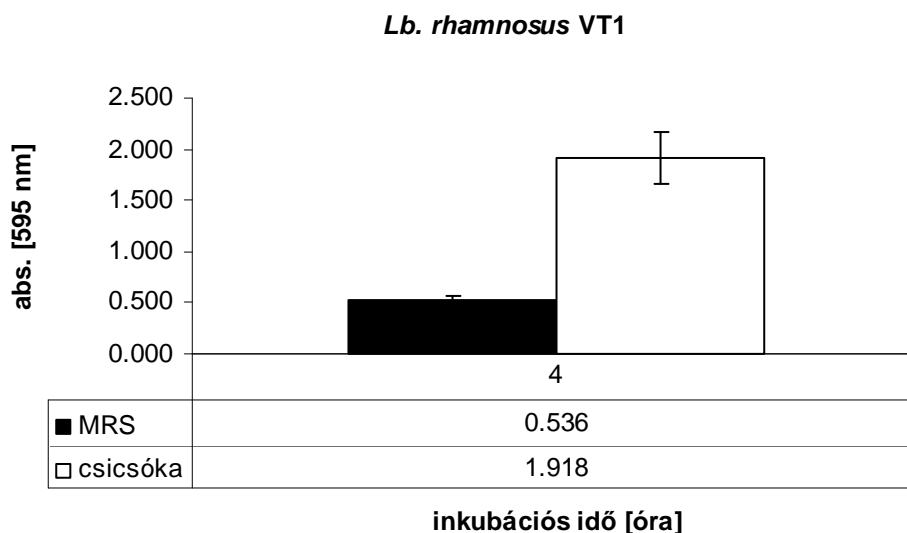
11. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 szaporodási sebességének beállítása

A szaporodási görbékből arra következtethetünk, hogy az ötszörösére hígított MRS táptalajon és a csicsóka táptalajon a *Lb. rhamnosus* VT1 törzs azonos sebességgel szaporodott. A szaporodási sebességi együtthatókat kiszámolva is közel azonos eredményeket kaptam ($\mu_{\text{csicsóka}}$: 0.01 1/min $\mu_{\text{MRS/5}}$: 0.009 1/min).

A további kísérletben ötszörösen hígított MRS táptalajt és a csicsóka táptalajt azonos induló sejtszámmal beoltva ($5 \cdot 10^8$ sejt/ml) 4 órás inkubációt követően mintát vettem, majd meghatároztam a sejtszámukat és az enzimaktivitásukat spektrofotométer segítségével. A 12. ábra jól mutatja, hogy azonos induló sejtszámmal beoltva a táptalajokat, 4 óra elteltével mind a hígított MRS, mind a csicsóka táptalajon azonos sejtszámot ért el a *Lactobacillus rhamnosus* VT1 törzs.



12. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 sejtszáma 4 órás inkubációt követően csicsóka- és ötszörösére hígított MRS táptalajon szaporítva

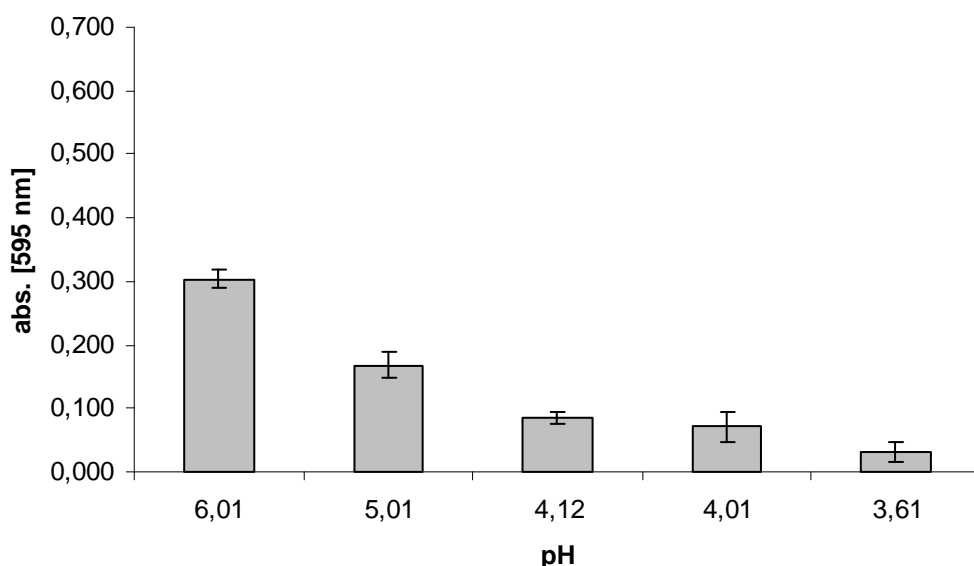


13. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 formazán képzése (8 mg/ml MTT) azonos sejtszám és eltérő táptalajon történő 4 órás szaporítást követően

Mint azt a 13. ábra mutatja, az azonos sejtszám és szaporodási sebesség ellenére a csicsóka táptalajon közel négyszer nagyobb enzimaktivitást mutatott a teszt mikroorganizmus az MRS táptalajon mérthez képest. Megállapíthatjuk, hogy a baktériumok enzimaktivitását a sejtszám, illetve szaporodási sebességen kívül a szaporításukhoz alkalmazott táptalaj minősége is nagymértékben befolyásolja. Ennek oka a különböző táptalajokban lévő eltérő szénhidrát forrás lehet, amelyeknek eltérő metabolizációja során a sejtek különböző mértékű dehidrogenáz enzimaktivitással rendelkeznek (BERRIDGE et al., 1996).

5.1.7. A pH hatásának vizsgálata

A pH okozta változást a sejtek MTT redukálási képességében a *Lactobacillus casei* Shirota törzs példáján keresztül mutatom be. A teszt mikroorganizmus sejtszámát $2.36 \cdot 10^9$ sejt/ml-re beállítottam fiziológias sóoldatban. A törzsoldatból 3 millilitereket kivettem és beállítottam külön-külön a pH-kat (6,01, 5,01, 4,01, 3,61). A pH beállítására 0,01 M-os HCl és NaOH oldatot alkalmaztam. A törzsoldat eredeti pH-ja 4,12. A különböző pH-jú sejtuszuspenziókat 30 °C-os inkubátorba helyeztem 1 órára. Az inkubációt követően mikrotiter MTT módszert alkalmazva mértem az enzimaktivitást.



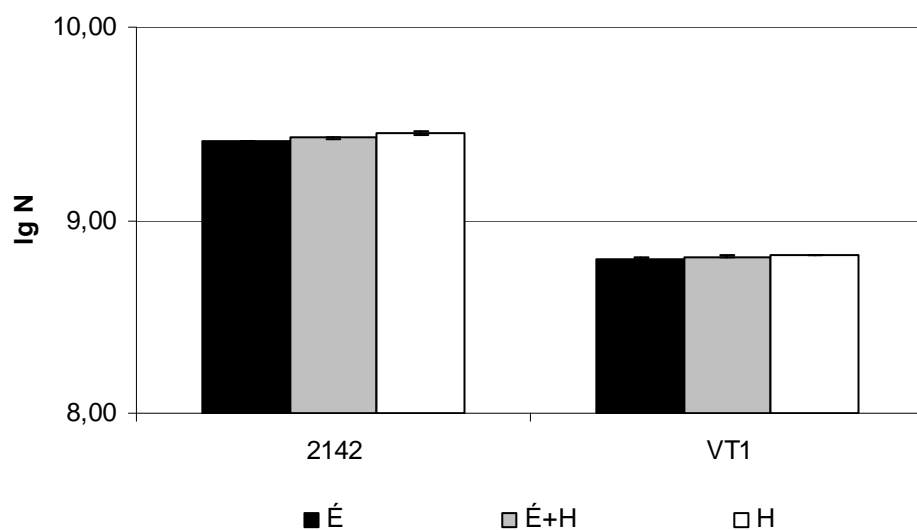
14. ábra: *Lactobacillus casei* Shirota formazán képzése különböző pH-értékeken

A 14. ábrán bemutatott eredményekből jól látható, hogy a sejtek tetrazólium bromid redukáló képessége a pH esésével csökkenő tendenciát mutat. A pH-beállítás nélküli sejtuszuspenzió a

4,01-re beállított pH-jú mintához hasonló enzimaktivitást mutatott. Az eredményeim jól egyeznek azokkal a megállapításokkal miszerint a tetrazólium sók redukálódásának a pH optimuma a semlegeshez közeli (JÁMBOR et al., 1956; CESARI et al., 1969). Az eredményekből az is megfigyelhető, hogy a kapott jelek nagysága elmarad a korábbi mérések során kapott hasonló sejtszám mellett mért eredményektől. Az eltérés azzal magyarázható, hogy a fiziológiás sóoldatban beállított pH-jú sejtszuszpenziók enzimaktivitásának mérését 1 órás inkubáció előzte meg, amely során a sejtek élettevékenysége és így az enzimaktivitása is a tápanyagok hiányában lecsökkent.

5.1.8. Élő és holt sejtek enzimaktivitásának vizsgálata

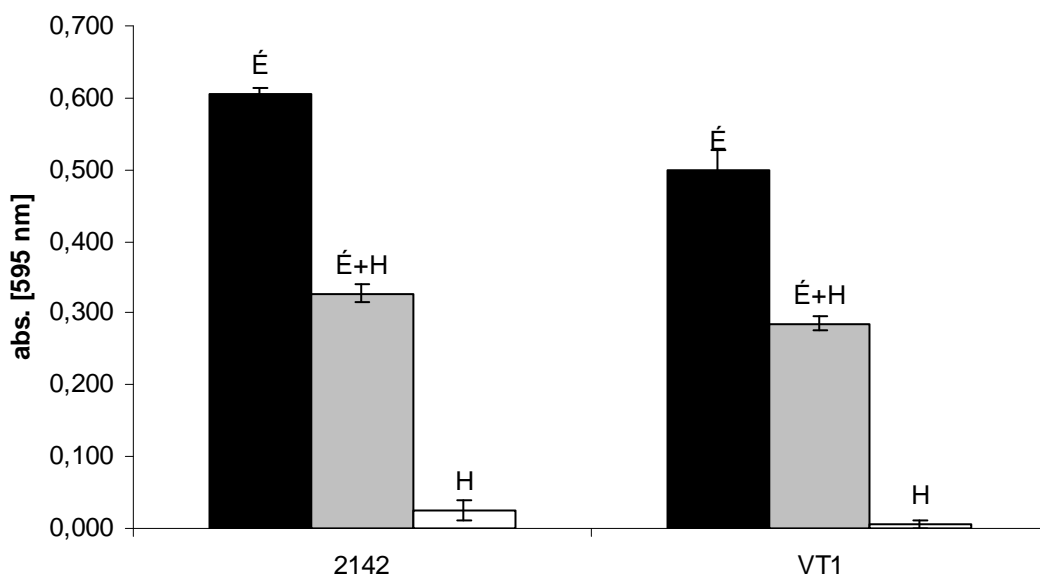
Annak igazolására, hogy kizárólag az élő sejtek képesek az MTT-t formazánná átalakítani, a következő kísérletet végeztem el. A tesztmikroorganizmusok (*Lb. plantarum* 2142 és *Lb. rhamnosus* VT1) sejtszámát fiziológiás sóoldatban beállítottam a korábbi kísérletekben megállapított optimális értékekre (amely sejtkoncentrációnál megfelelő nagyságú jelet kapunk enzimaktivitás mérésekor). A törzsoldatokból 3-3 ml-t Eppendorf csőbe mértem, majd a mintákat 80 °C-os vízfürdőbe helyeztem és 10 percig hőn tartottam, az így kezelt sejtek elpusztultak. Mindkét tejsavbaktérium törzsből három különböző mintát készítettem. Az első minta kizárólag élő sejteket tartalmazott (É), a második mintához 1 ml élő sejteket és 1 ml holt sejteket tartalmazó szuszpenziót készítettem (É+H), a harmadik minta csak a hőkezelt sejteket tartalmazta (H). Az így előkészített minták abszorbanciáját 630 nm-en lemértem és ebből következtettem a sejtkoncentrációra, a mért adatokat a 15. ábra tartalmazza.



15. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus rhamnosus* VT1 élő és holt sejtkoncentrációja. (É: élő sejtek, É+H: élő és holt sejtek 1:1 arányban, H: holt sejtek)

Az 15. ábra jól szemlélteti, hogy a törzseken belül mindhárom mintában azonos volt a sejtkoncentráció. Látható, hogy a 630 nm-en mért abszorbanciából származtatott sejtszám alapján nem lehet különbséget tenni élő és holt sejtek között.

A minták enzimaktivitását mikrotiter MTT módszerrel mértem le 595 nm-en, az eredményeket a 16. ábra mutatja be.



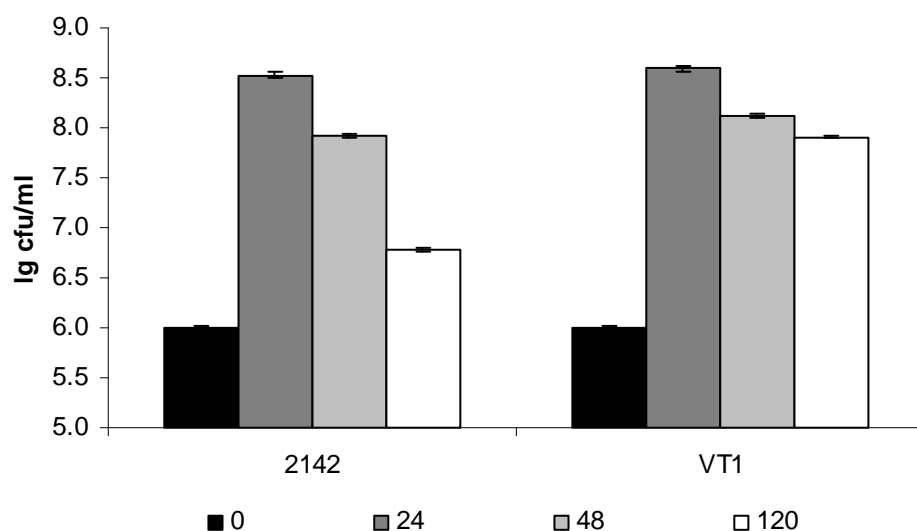
16. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus rhamnosus* VTI törzsek formazán képzése különböző élő és holt sejt arány esetén. (É: élő sejtek, É+H: élő és holt sejtek 1:1 arányban, H: holt sejtek)

Az MTT módszerrel kapott eredményekből már tudunk következtetni a mintában jelenlévő élő és holt sejtek arányára is. Az MTT-t csak az élő sejtek képesek redukálni (MOSMANN, 1983; ABATE et al., 1998). Mindkét vizsgált törzs esetében megfigyelhető, hogy az azonos sejtkoncentrációjú, azonban 50 %-ban holt sejteket tartalmazó minta enzimaktivitása közelítőleg a fele a kizárólag élő sejteket tartalmazó sejtuszuspenzió enzimaktivitásának. A kizárólag holt sejteket tartalmazó minták enzimaktivitása a mérési hibán belül van, amely gyakorlatilag nullának tekinthető. Az MTT módszerrel szelektíven képesek vagyunk mérni az élő sejtek számát a mintában, illetve előzetes OD mérés alapján az élő és holt sejtek arányára is következtethetünk.

5.1.9. Céklalében szaporított tejsavbaktériumok enzimaktivitásának, sejtszámának és a zöldséglé színváltozásának vizsgálata

A kísérlet célja az MTT módszer élelmiszer-mátrixban történő alkalmazhatóságának vizsgálata, valamint a dehidrogenáz enzimaktivitás és a céklalé színváltozása közötti összefüggés elemzése volt.

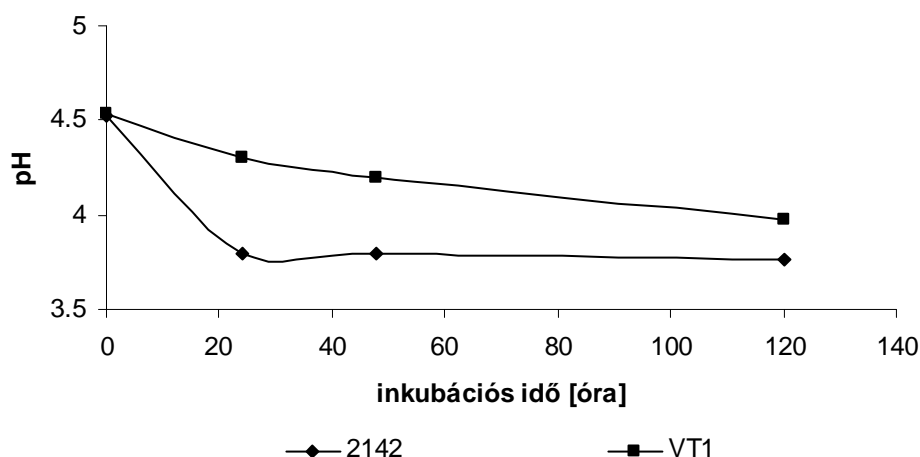
Kereskedelmi forgalomban kapható céklalevet oltottam be előzőleg MRS-ben felszaporított tejsavbaktérium törzsekkel, a fermentáció során mértem a sejtszám-, az enzimaktivitás- és a pH változását a mintákban, valamint mértem a céklalé színének változását az inkubáció során. A céklaléből 50 ml-es mintákat vettem, amelyeket külön-külön beoltottam a tejsavbaktérium törzsekkel (*Lb. plantarum* 2142 és *Lb. rhamnosus* VT1) úgy, hogy az induló sejtszám 10^4 sejt/ml legyen. A céklalékhez 0,5 % dextrózt adtam az inkubáció megkezdése előtt. A mintákat 30 °C-os inkubátorba helyeztem, a *Lactobacillus* törzsek sejtszámát lemezöntéses módszer segítségével állapítottam meg 0, 24, 48 és 120 órás inkubációt követően.



17. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus rhamnosus* VT1 törzsek sejtszámának alakulása céklalében szaporítva

A 17. ábrán bemutatott eredményekből jól látható, hogy 24 órás inkubáció után mindkét törzs elérte a maximális sejtszámot, amely 10^8 sejt/ml volt, 48 órás inkubációt követően kismértékű csökkenés volt megfigyelhető az élősejtszámban, közelítőleg fél nagyságrendnyi törzsenként. Az 5 napos fermentációt követően a *Lb. plantarum* 2142 törzs esetén egy nagyságrendnyivel kevesebb élő sejt volt jelen a céklalében, mint a *Lb. rhamnosus* VT1 törzs esetén.

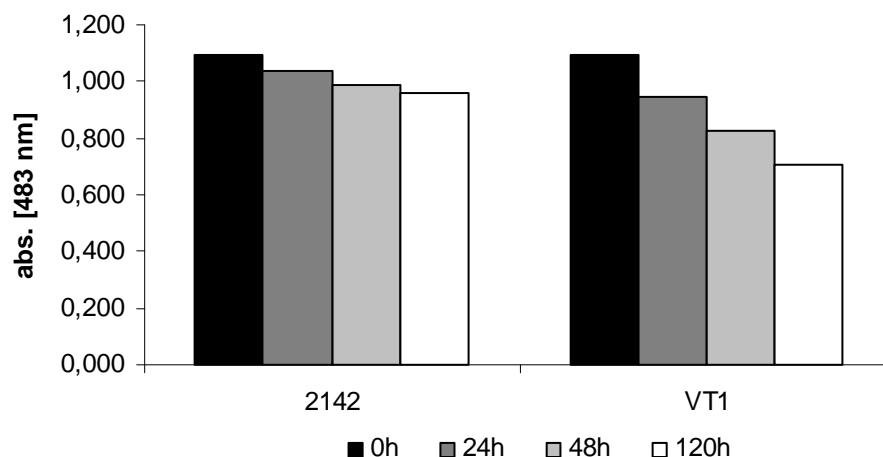
A pH változását digitális pH mérő (METLER TOLEDO, Swicherland) segítségével mértem, az eredményeket a 18. ábra mutatja be.



18. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus rhamnosus* VT1 törzsek pH csökkentő hatása céklalében az inkubációs idő függvényében

Az eredményekből megfigyelhető, hogy a *Lb. plantarum* 2142 már 24 óra elteltével lecsökkentette a pH-t 4-es érték alá, míg a *Lb. rhamnosus* VT1 esetében ez a csökkenés lényegesen lassabb volt, de 120 órát követően ebben az esetben is 4-es érték alá csökkent a céklalé pH-ja.

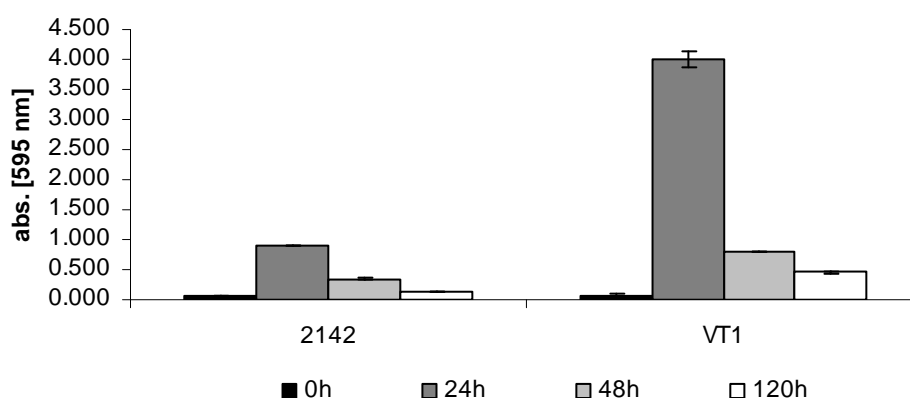
A zöldséglé színváltozását a fermentáció során spektrofotométer segítségével mértem. Első lépésként fotométer segítségével lemértem a céklalé abszorpciós spektrumát, amelyből megállapítottam azt a hullámhosszt ahol a legnagyobb a folyadék elnyelése. A céklalé a 483 nm hullámhosszúságú fényt nyeli el a legnagyobb mértékben, így a fermentáció során ezen a hullámhosszon mértem a céklalé színváltozását.



19. ábra: Céklalé színének változása fermentáció során (*Lactobacillus plantarum* 2142, illetve *Lactobacillus rhamnosus* VT1 esetén)

A 19. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy színintenzitás vizsgálata során mindkét esetben egyenletes csökkenés volt megfigyelhető, azonban a *Lb. rhamnosus* VT1 esetében ez a csökkenés átlagosan háromszor nagyobb volt, mint a *Lb. plantarum* 2142 törzs esetében.

Az élő mikroorganizmusok dehidrogenáz enzimaktivitását mikrotiter MTT módszer segítségével mértem. A sejteket a vizsgálat előtt lecentrifugáltam és a céklalevet eltávolítottam, hogy az ne befolyásolhassa az eredményt.



20. ábra: Céklalén szaporított *Lactobacillus* törzsek (*Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus rhamnosus* VT1) formazán képzése fermentáció során

Ahogy az a 20. ábra jól szemlélteti, nagymértékben eltérő dehidrogenáz enzimaktivitást mértem a különböző törzseknél, az aktivitás változásának tendenciája azonban hasonló volt

mindkét esetben. Az enzimaktivitásuk maximumát a 24 órás inkubációt követően mutatták, illetve jól látható, hogy minden mérési időpontban a *Lb. rhamnosus* VT1 enzimaktivitása többszöröse volt a *Lb. plantarum* 2142 törzs által mutatottnak.

A kísérlet során látható volt, hogy 24 óra elteltével a tesztorganizmusok elérték a maximális sejtszámukat a céklalében, amely azonos volt mindkét törzs esetében ($3,5 \cdot 10^8$ sejt/ml), ekkor volt mérhető a legnagyobb enzimaktivitása a törzseknek, azonban a *Lb. rhamnosus* VT1 törzs 4,5-szer nagyobb jelet mutatott, mint a *Lb. plantarum* 2142. A dehidrogenáz enzimaktivitás ilyen nagymértékű eltérése azonos sejtszám mellett magyarázható azzal is, hogy a VT1-jelű törzs pH csökkentő hatása (pH 4,3) lényegesen elmaradt a 2142-jelűtől (pH 3,8) a 24 órás inkubációt követően, és a neutrálshoz közelebbi pH-értéken azonos sejtszám mellett is magasabb enzimaktivitás mérhető (CESARI et al., 1969), illetve a törzsek eltérő fermentatív jellege is okozhatja.

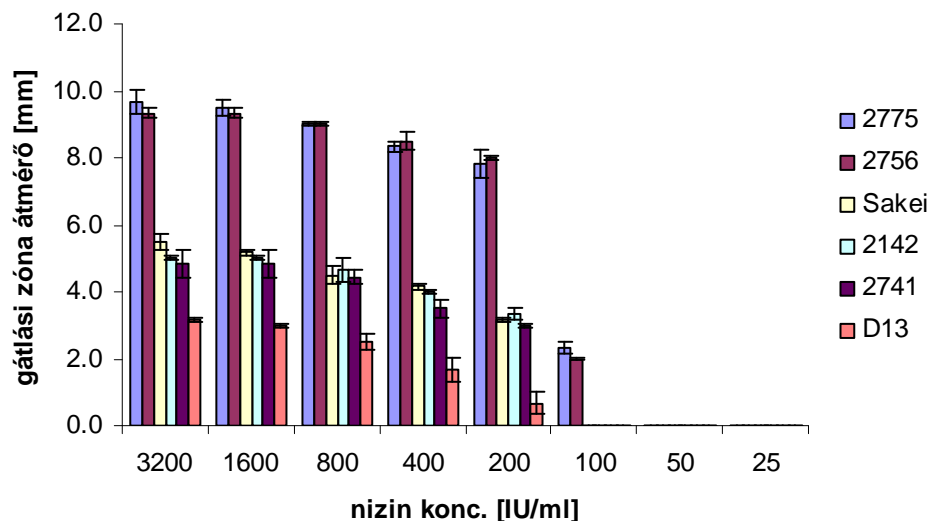
A céklalé színintenzitásának csökkenése a magasabb enzimaktivitású törzs esetében nagyobb mértékű volt, amely összhangban van a BARÁTH és munkatársai (2001) által mért fermentált céklalé színintenzitásának nagyobb mértékű csökkenésével hozzáadott pektolitikus enzimkomplex esetében. A zöldséglevék természeteshez közeli színintenzitásának megőrzése a fermentáció során igen fontos, mivel az jelentős érzékszervi tulajdonság, amely nagymértékben befolyásolhatja a fermentált zöldséglé fogyasztói megítélését, ezért fontos lehet azon törzsek szelektálása a fermentációhoz, amelyek esetében kevésbé csökken a zöldséglé színintenzitása. Ehhez nyújthat segítséget az MTT módszer.

5.1.10. Bakteriocin (nizin) érzékenység vizsgálata

Lactobacillus törzsek (*Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus plantarum* 2741, *Lactobacillus sakei* DSM 20017, *Lactobacillus casei* 2756, *Lactobacillus curvatus* 2775, *Lactobacillus fermentum* D13) nizin érzékenységének vizsgálatát végeztem el agardiffúziós módszer, turbiditás mérésen alapuló módszer és az általam kidolgozott mikrotiter MTT kolorimetriás módszer segítségével. A cél az volt, hogy meghatározzam, hogy melyik módszer alkalmasabb a *Lactobacillus* törzsek bakteriocin érzékenységének vizsgálatára.

5.1.11. Agardiffúziós módszer

A vizsgálat leírása az anyagok és módszerek fejezetben található (4.3.3. pont).



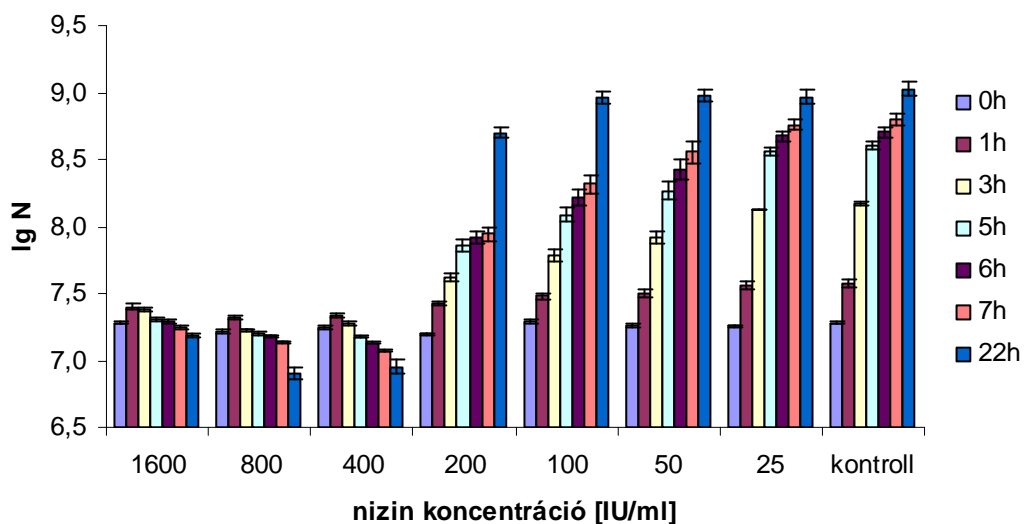
21. ábra: *Lactobacillus* törzsek nizin érzékenysége vizsgálatára agardiffúziós módszerrel.
 (■2775: *Lb. curvatus* 2775, ■2756: *Lb. casei* 2756, ■Sakei: *Lb. sakei* DSM20017, ■2142: *Lb. plantarum* 2142, ■2741: *Lb. plantarum* 2741, ■D13: *Lb. fermentum* D13)
 (10.000 IU/ml = 250 µg/ml nizin)

Az agardiffúzióval végzett vizsgálatok eredményét a 21. ábra mutatja. Látható, hogy a legkisebb koncentráció, amely az összes vizsgált tesztorganizmus esetében értékelhető feltisztulási zónát mutatott a 200 IU/ml volt, illetve két törzs, a *Lactobacillus casei* 2756 és a *Lactobacillus curvatus* 2775 esetében még a 100 IU/ml koncentráció esetében is észleltem feltisztulási zónát. Megállapítható, hogy az alkalmazott tesztorganizmusok közül a nizinre legérzékenyebb törzsek a 2756 és 2775 jelűek voltak, míg a legkevésbé érzékeny a *Lactobacillus fermentum* D13 törzs volt.

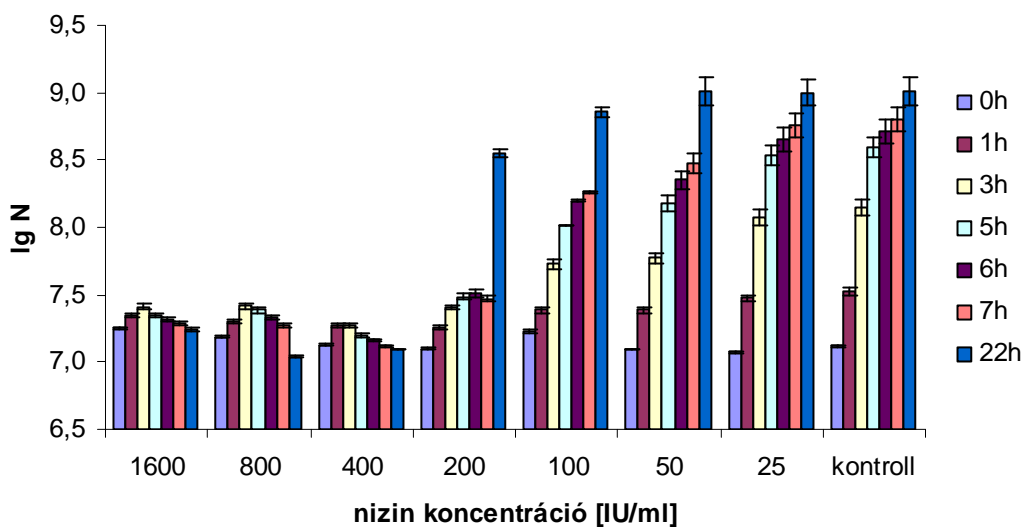
Agardiffúziós módszer segítségével információt kaphatunk a *Lactobacillus* törzsek gátlóanyag érzékenységéről és e törzsek esetében a kimutatási határ 100 IU/ml koncentrációra tehető nizin esetén.

5.1.12. Turbiditás mérésen alapuló módszer

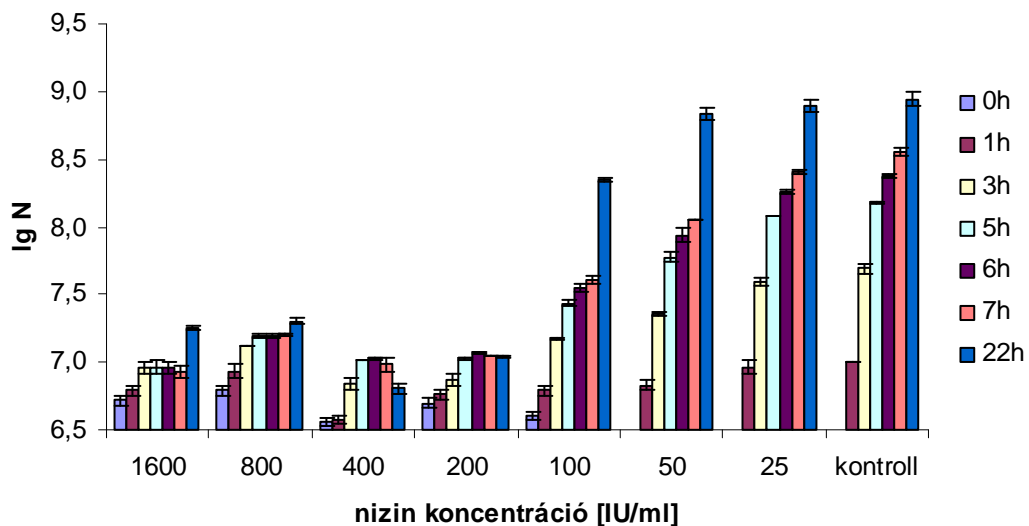
A módszer pontos leírása az anyagok és módszerek részben található (4.3.1.).



22. ábra: *Lactobacillus sakei* nizin érzékenysége vizsgálatára turbiditás mérés



23. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 nizin érzékenysége vizsgálatára turbiditás mérés

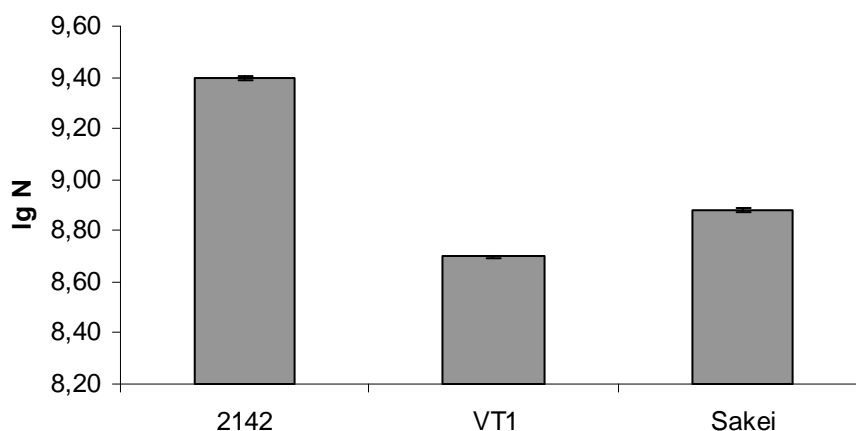


24. ábra: *Lactobacillus fermentum* D13 nizin érzékenysége vizsgálat turbiditás méréssel

Az eredmények (22. ábra, 23. ábra, 24. ábra) azt mutatják, hogy egyértelmű gátlás az 200 IU/ml koncentrációig volt kimutatható a turbiditás mérésen alapuló módszer használatával. Ez az érték a duplája az agardiffúzióval kimutatható legkisebb gátló koncentrációnak. Ennél az eljárásnál 10^7 sejt/ml induló sejtszámmal dolgoztam, míg az agardiffúziós módszernél 10^4 sejt/ml volt a sejtsűrűség. Azonban ahhoz, hogy az agardiffúzióhoz képest, ami 24-48 órát vesz igénybe, gyorsabb meghatározást tegyünk lehetővé, a meghatározáshoz szükséges idő akár 8-10 órára is lecsökkenthető ilyen magas induló sejtkoncentráció alkalmazása szükséges.

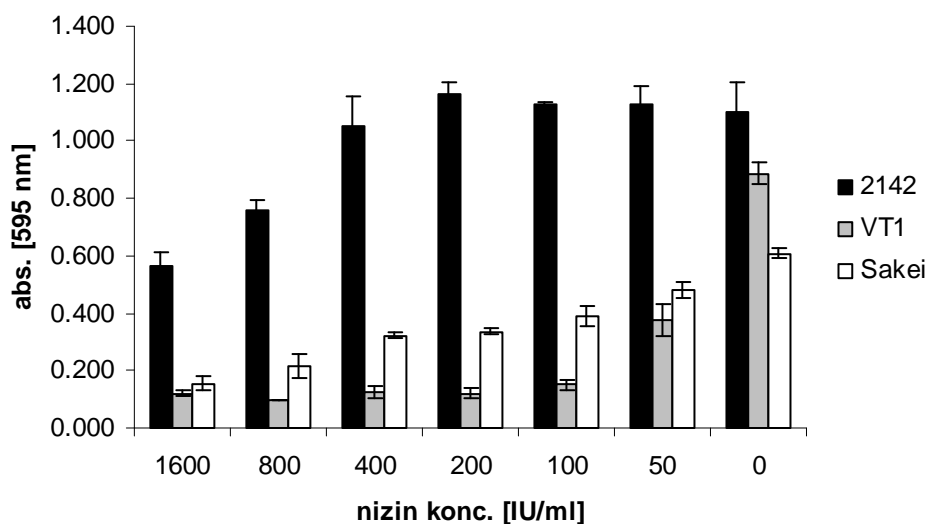
5.1.13. MTT kolorimetriás módszer

A módszer részletes leírása az anyagok és módszerek részben található (4.3.4.).



25. ábra: Tesztmikroorganizmusok beállított sejtszáma a mikrotiter MTT módszeres méréshez

A teszt mikroorganizmusok nizin érzékenységét a 25. ábrán látható koncentrációra teszteltem az MTT kolorimetriás módszerrel. Az előző két vizsgálati módszerhez képest több nagyságrenddel magasabb sejtszámot alkalmaztam, mivel a módszer segítségével csak ilyen magas sejtszám esetében kapunk értékelhető jelet.



26. ábra: *Lactobacillus* törzsek nizin érzékenységének vizsgálata mikrotiter MTT módszerrel

A mikrotiter MTT kolorimetriás módszerrel kapott eredményekből láthatjuk, hogy 10^9 sejt/ml koncentráció esetében a *Lb. plantarum* 2142 enzimaktivitása csak 400 IU/ml és a feletti nizin koncentráció esetében csökkent, míg a turbiditásmérés és az agardiffúziós módszerrel végzett kísérlet során már 50 IU/ml nizin koncentráció esetében gátlás volt megfigyelhető. A két

módszerrel kapott eltérő eredmény a különböző sejtkoncentrációkból és a nizin hatásmechanizmusából adódik (GONZALES et al., 1996; ZACHAROF et al., 2012).

A *Lb. sakei* esetében azonban a több nagyságrendnyi sejtszámbeli különbség esetén is már 50 IU/ml gátlóanyag koncentrációnál látható az enzimaktivitás csökkenése, ami az előbbi módszerekkel megegyező eredményt mutat.

Az MTT módszer alkalmazásánál magasabb sejtkoncentráció használata szükséges, hogy értékelhető eredményt kapjunk. A magasabb sejtkoncentráció természetesen a mért gátlóaktivitást is befolyásolhatja, azonban az MTT kolorimetriás módszer segítségével a hagyományos módszerekhez szükséges idő töredéke alatt mérhetjük az egyes mikróbagátló anyagok aktivitását.

5.2. Az MTT módszer teljesítményjellemzőinek meghatározása

Napjainkban a mikrobiológiai vizsgálatokkal szemben támasztott követelmények közé tartozik a gyorsaság mellett a nemzetközi kihívásoknak való megfelelés. Részben a honosított ISO és EU szabványok szerinti jártasság igazolása körvizsgálatokban való részvétellel, másrészt az akkreditálási követelményeknek való megfelelés.

A vizsgáló és kalibráló laboratóriumok alkalmasságának általános követelményeit az MSZ EN ISO/IEC 17025:2001 szabvány tartalmazza. E szabvány 5.4 pontja előírja, hogy a laboratóriumban kifejlesztett, vagy átvett módszert a használatba vétel előtt validálni kell.

Validálni kell a nem szabványos, saját kifejlesztésű, működési területen kívül eső szabványos módszereket, illetve a szabványos módszerek kiegészítéseit, módosításait.

A vizsgálati módszer jellemző paramétereinek meghatározására szolgáló eljárást mikrobiológiai területen az EN ISO 16140 szabvány rögzíti mind a jelenlét/hiány próbákra, mind a szám meghatározási módszerekre vonatkozóan (TABAJDINÉ PINTÉR, 2002).

A validálás annak igazolása, hogy az alternatív módszer (gyors, érzékeny, automatizált, olcsó) összehasonlítható eredményt ad a referencia módszerrel. A validálás első lépése az alternatív és referencia módszer laboratóriumon belüli összehasonlítása, amelyet körvizsgálat követ (minimum tíz laboratórium részvételével) (BELÁK et al., 2011).

Annak a ténynek az eldöntésére, hogy az alternatív módszer megfelelő-e, meg kell határozni a módszer teljesítmény jellemzőit (EN ISO 16140:2003).

A dehidrogenáz enzimaktivitás mérésre alapozott mikrobaszám-meghatározási módszer álabbi teljesítményjellemzőit határoztam meg EN ISO 16140 szabvány szerint:

- Szelektivitás
- Linearitás
- Érzékenység
- Kimutatási határ
- Meghatározási határ
- Mérési tartomány
- Pontosság

5.2.1. Szelektivitás

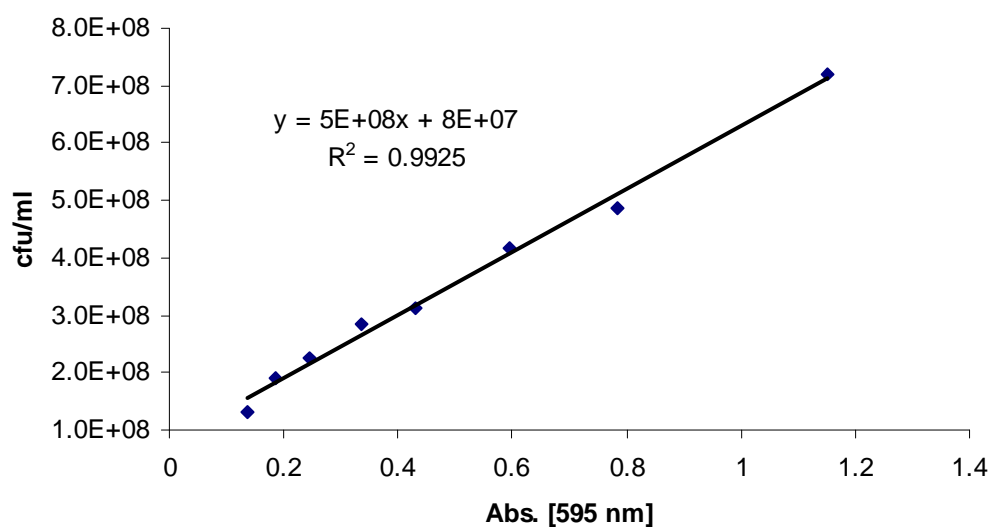
A módszer segítségével dehidrogenáz enzimaktivitás mérés alapján következtethetünk a mikroorganizmusok sejtszámára. A tejsavbaktériumok azonos sejtszám mellett eltérő enzimaktivitással rendelkezhetnek, azonban a módszer nem teszi lehetővé, hogy kevert tenyészetek esetében különbséget tegyünk a mikroorganizmusok között, illetve a mikroorganizmusok vizsgálatakor a táptalaj eltávolítása is szükséges, mivel a táptalajban lévő komponensek is képesek redukálni az MTT tetrazólium bromidot. Élő és holt sejtek elkülönítése szempontjából azonban szelektívnek mondható.

5.2.2. Linearitás

A keletkezett formazán kristályok mennyiségének 595 nm-en mért abszorbanciája és a meghatározni kívánt sejtszám közötti összefüggés linearitása.

Az MTT kolorimetriás, enzimaktivitás mérésen alapuló élősejtszám-meghatározási módszer linearitását a minták sejtkoncentrációjának függvényében ábrázolt enzimaktivitás értékekkel mutatom be.

Az eljárást a *Lactobacillus rhamnosus* VTI törzs adatainak kiértékelésén keresztül szemléltetem. A tesztmikroorganizmus szuszpenziójából 8 tagú hígítási sort készítettem, a hígítási tagok sejtszámát lemezöntéses módszerrel meghatároztam. A hígítási tagok enzimaktivitását a mikrotiter MTT módszer segítségével lemértem és a kapott adatokat ábrázoltam a sejtszámok függvényében. Az eredményeket a 27. ábra tartalmazza.

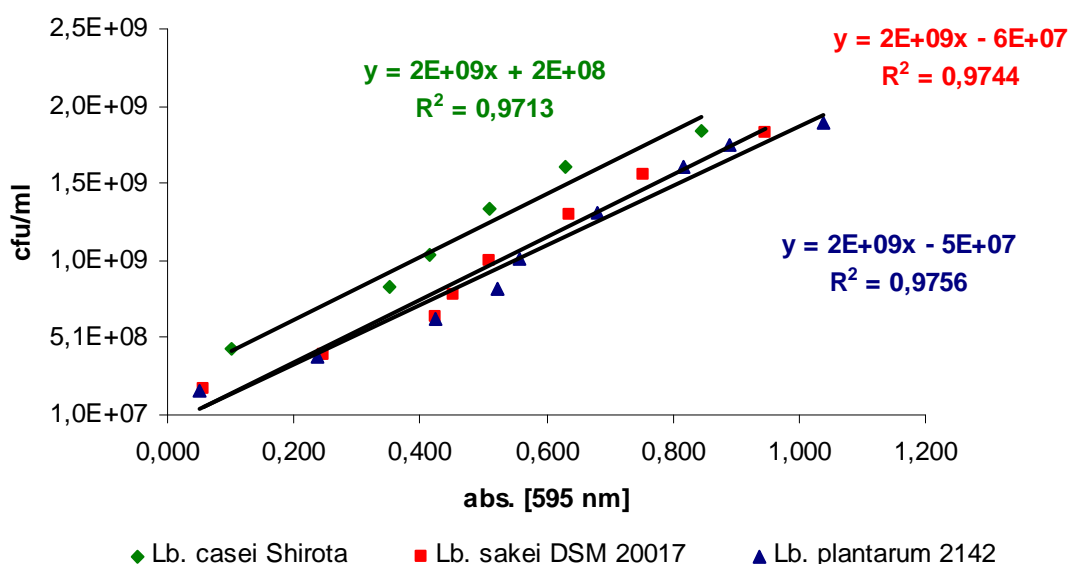


27. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 kalibrációs görbéje

A szabvány szerint elvégzett linearitás vizsgálat alapján elmondható, hogy szoros korreláció áll fenn az élő sejtek és a termelt formazán kristályok mennyisége között.

Az MTT módszer teljesítményjellemzőinek a meghatározása során az alternatív módszerek validálásáról szóló ISO 16140:2003 szabvány szerinti R-jelű mellékletében a megfelelő linearitási vizsgálat kiválasztásához szükséges előzetes becslések során az alternatív és a referencia módszer úgynevezett globális szórásainak a hányadosa ($sr(alt)/sr(ref)$) megad egy R értéket. Amennyiben az így kapott érték 0.5 tizednél kisebb a leírás azt javasolja, hogy cseréljük fel az x és az y tengelyen ábrázolt értékeket és így ábrázoljuk a kalibrációs görbét. A mi esetünkben ez az érték 0.5 tizednél kisebb.

A következő ábrán (28. ábra) három másik törzs kalibrációs egyenesét mutatom be.



28. ábra: *Lb. plantarum* 2142, *Lb. casei* Shirota, *Lb. sakei* DSM20017 törzsek kalibrációs görbéi

5.2.3. Érzékenység

A mérési módszer érzékenységét a kalibrációs görbe meredeksége adja meg. A különböző törzsek kalibrációs egyeneseiből számított regressziós egyenleteket és az azokból számított érzékenységüket a 12. táblázatban összegzem.

12. táblázat: Az alkalmazott tesztmikroorganizmusok regressziós egyenletei és az ebből számított érzékenységük

<i>Lactobacillus</i> törzs	Regressziós egyenlet	Érzékenység 0.01 OD változás
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	$Abs_{[595\text{ nm}]} = 5 \cdot 10^8 \text{ cfu/ml} + 10^8$	$5 \cdot 10^6 \text{ cfu/ml}$
<i>Lb. plantarum</i> 2142	$Abs_{[595\text{ nm}]} = 2 \cdot 10^9 \text{ cfu/ml} - 5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7 \text{ cfu/ml}$
<i>Lb. casei</i> Shirota	$Abs_{[595\text{ nm}]} = 2 \cdot 10^9 \text{ cfu/ml} + 2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7 \text{ cfu/ml}$
<i>Lb. sakei</i> DSM 20017	$Abs_{[595\text{ nm}]} = 2 \cdot 10^9 \text{ cfu/ml} - 6 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7 \text{ cfu/ml}$

A *Lb. rhamnosus* VT1 törzs esetében a sejtszám $5 \cdot 10^6$ cfu/ml növekedése a mért abszorbanci értékének 0.01 századnyi növekedését eredményezi. A másik három vizsgált törzs esetében az abszorbanci ilyen mértékű változását $2 \cdot 10^7$ cfu/ml sejtszám növekedése vagy csökkenése okozza.

5.2.4. Kimutatási határ

Az a koncentráció, vagy anyagmennyiség, mikroba-koncentráció, amelyhez tartozó jel értéke megegyezik a vak minta közepes jelének és a vak minta jel 3-szoros SD értékének összegével.

$$J_{KH}=J_{vak}+3\cdot SD_{vak}$$

Ez az érték a különböző *Lactobacillus* törzsek esetén eltérő. *Lactobacillus rhamnosus* VT1 törzs esetében $1.2\cdot 10^8$ cfu/ml a legkisebb kimutatható sejtszám. A különböző *Lactobacillus* törzsekhez tartozó kimutatási határokat a 13. táblázatban mutatom be.

13. táblázat: Az alkalmazott tesztmikroorganizmusokra vonatkozó kimutatási határok

<i>Lactobacillus</i> törzs	Kimutatási határ cfu/ml
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	$1.20\cdot 10^8$
<i>Lb. plantarum</i> 2142	$3.05\cdot 10^7$
<i>Lb. casei</i> Shirota	$2.80\cdot 10^8$
<i>Lb. sakei</i> DSM 20017	$2.05\cdot 10^7$

5.2.5. Meghatározási határ

A mennyiségi mérés alsó határa, alsó méréshatár. Az a legkisebb koncentráció, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg.

$$J_{MH}=J_{vak}+10\cdot SD_{vak}$$

Ez az érték a különböző *Lactobacillus* törzsek esetén eltérő. *Lactobacillus rhamnosus* VT1 törzs esetében $1.2\cdot 10^8$ cfu/ml a legkisebb kimutatható sejtszám. A különböző *Lactobacillus* törzsekhez tartozó meghatározási határokat a 14. táblázatban mutatom be.

14. táblázat: Az alkalmazott tesztmikroorganizmusokra vonatkozó meghatározási határok

<i>Lactobacillus</i> törzs	Meghatározási határ cfu/ml
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	$1.26\cdot 10^8$
<i>Lb. plantarum</i> 2142	$5.20\cdot 10^7$
<i>Lb. casei</i> Shirota	$3.02\cdot 10^8$
<i>Lb. sakei</i> DSM 20017	$4.20\cdot 10^7$

5.2.6. Méréstartomány

Méréstartomány alatt azt a tartományt értjük, amelyen belül a sejtkoncentráció megfelelő pontossággal, precizitással és lehetőleg linearitással meghatározható.

A kalibrációs görbék alapján a módszer méréstartománya ebben az esetben is törzsenként eltérő. A különböző *Lactobacillus* törzsekhez tartozó mérési tartományokat a 15. táblázatban mutatom be.

15. táblázat: Az alkalmazott tesztmikroorganizmusokra vonatkozó méréstartományok

<i>Lactobacillus</i> törzs	Méréstartomány cfu/ml
<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	$1.26 \cdot 10^8 - 6.00 \cdot 10^8$
<i>Lb. plantarum</i> 2142	$5.20 \cdot 10^7 - 1.95 \cdot 10^9$
<i>Lb. casei</i> Shirota	$3.02 \cdot 10^8 - 2.20 \cdot 10^9$
<i>Lb. sakei</i> DSM 20017	$4.20 \cdot 10^7 - 1.94 \cdot 10^9$

5.2.7. Pontosság

A módszer pontossága a méréstartomány valódiságának mértéke, a módszer rendszeres hibájának jellemzője.

A dehidrogenáz enzimaktivitás mérésen alapuló élősejtszám meghatározása a sejtszám és az 595 nm-en mért abszorbancia között meghatározott regressziós összefüggéseken alapszik, a módszer pontossága a kalibrációs görbék megbízhatóságától függ.

A pontos sejtszám meghatározáshoz, minden törzs és tápközeg kombináció esetén egyedi kalibrációs görbe felvétele szükséges.

5.3. PCR eredmények

5.3.1. A DNS izolálás eredményei

A vizsgálataim során a különböző tejsavbaktérium és a kontrollként használt baktérium-törzsekből módosított Wizard módszerrel DNS izolálását végeztem el, a 4.3.5.3. fejezetben bemutatott, módosított módszert alkalmaztam.

A DNS izolálás mennyiségi és minőségi ellenőrzésének eredményeit a 16. táblázat tartalmazza.

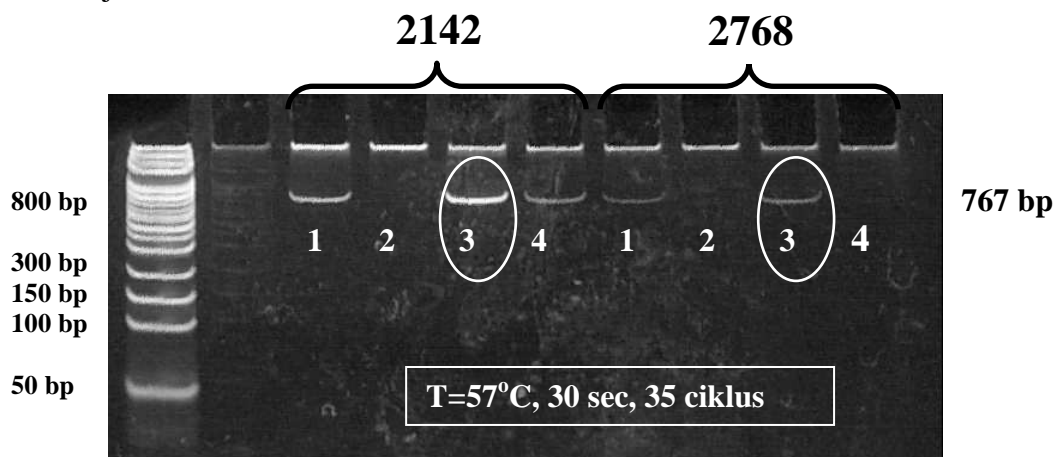
16. táblázat: DNS izolálás eredményei

A vizsgált minta jele a baktérium törzs jelölése alapján	A mintából kinyerhető DNS mennyisége (ng/μl)	R érték(A_{260}/A_{280})
01	19,9	1,77
05	21,1	2,01
154	18,1	1,78
2107	23,1	1,79
2108	68,4	1,84
2142	115,7	1,93
2741	259,9	2,10
2749	42,7	1,93
2750	219,3	2,07
2752	235,8	2,07
2756	215,5	2,07
2763	83,9	2,08
2768	331,6	2,08
2770	315,5	2,08
2771	168,1	1,99
2775	214,2	2,08
299v	34,0	1,78
397	67,9	1,82
D13	62,8	1,81
DT41	100,3	1,81
Sakei	52,1	1,76
N2	15,4	1,70
SF1	51,8	1,82
Shirota	11,6	1,76
VE56	29,3	1,79
VT1	134,8	2,08

A DNS izolálását követően UV-spektrofotométerrel valamennyi minta esetében meghatároztam az oldatok abszorbanciáját, valamint a kapott DNS-oldatok tisztaságát és koncentrációját. A 16. táblázatban feltüntetett eredményeink alapján elmondható, hogy az alkalmazott módosított Wizard módszerrel minden esetben megfelelő tisztaságú és koncentrációjú, PCR-sokszorozásra alkalmas DNS-oldatokat kaptam, amelyet az ezt követően elvégzett gél-elektroforézises vizsgálatok is alátámasztottak.

5.3.2. A PCR optimálás eredményei

A *Lactobacillus*-ok szelektív kimutatására alkalmas PCR módszer fejlesztésének első lépéseként optimáltam a reakcióhoz szükséges primer és a templát DNS mennyiségét. A PCR reakciókhoz a 2142 és a 2768- jelű tejsavbaktérium törzseket használtam. Eredményeimet a 29. ábra mutatja be.



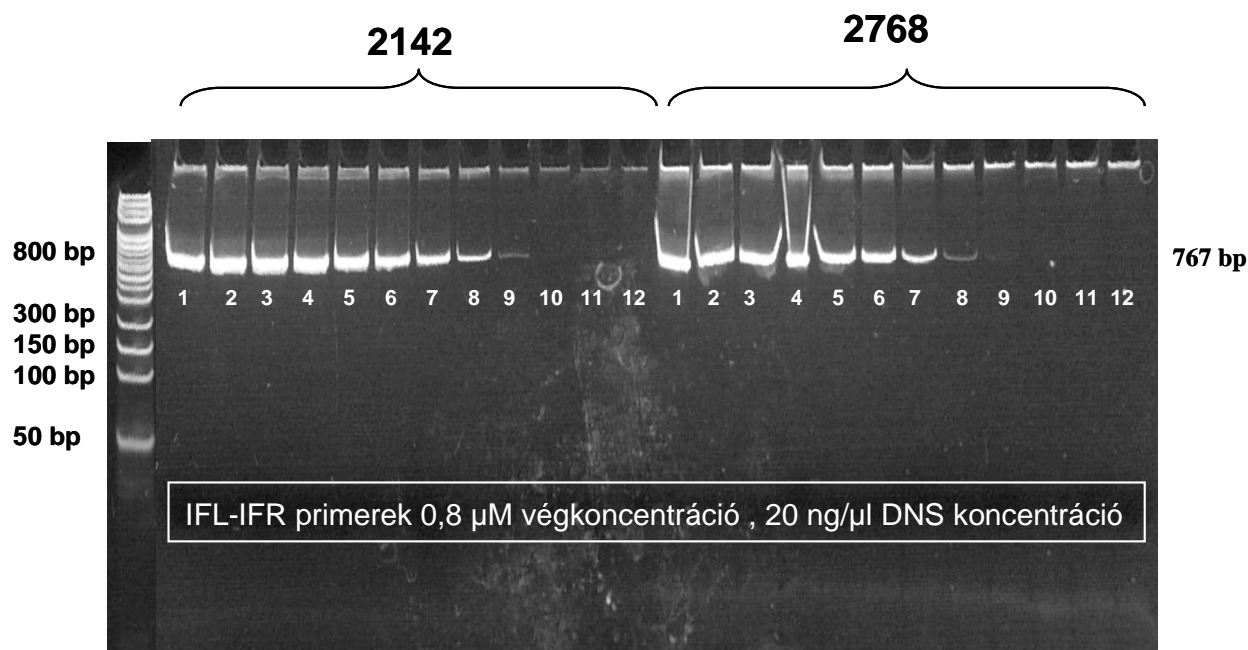
29. ábra: A laktobacillusok szelektív kimutatására alkalmas PCR reakció optimálása 1.

- 1 – 250 ng templát DNS, 0,8 μ M primer koncentráció
- 2 – 250 ng templát DNS, 0,5 μ M primer koncentráció
- 3 – 100 ng templát DNS, 0,8 μ M primer koncentráció**
- 4 – 100 ng templát DNS, 0,5 μ M primer koncentráció

Ezek alapján elmondható, hogy mind a *Lb. plantarum* 2142, mind pedig a *Lb. curvatus* 2768 tejsavbaktérium törzsek vizsgálatakor reakciónként 100 ng templát és 0,8 μ M primer végkoncentráció alkalmazása során kapam a gélelektroforézises kiértékelés során a legélesebb fragmentumokat.

Vizsgálataim során a következő lépés a megfelelő primer-kapcsolódási vagy annealing hőmérséklet kiválasztása volt, amelyhez az előzőekben optimált összetételű reakcióelegyet használtam fel. A PCR sokszorozáshoz ez esetben is a 2142 és 2768-jelű tejsavbaktérium

törzseket alkalmaztam. A vizsgálatokat különböző, 52-68 °C közötti primerkapcsolódási hőmérsékleteken végeztem el. A gélelektroforézises kiértékelést követően kapott eredményeimet a 30. ábra mutatja be.



30. ábra: A laktobacillusok szelektív kimutatására alkalmas PCR reakció optimálása 2.

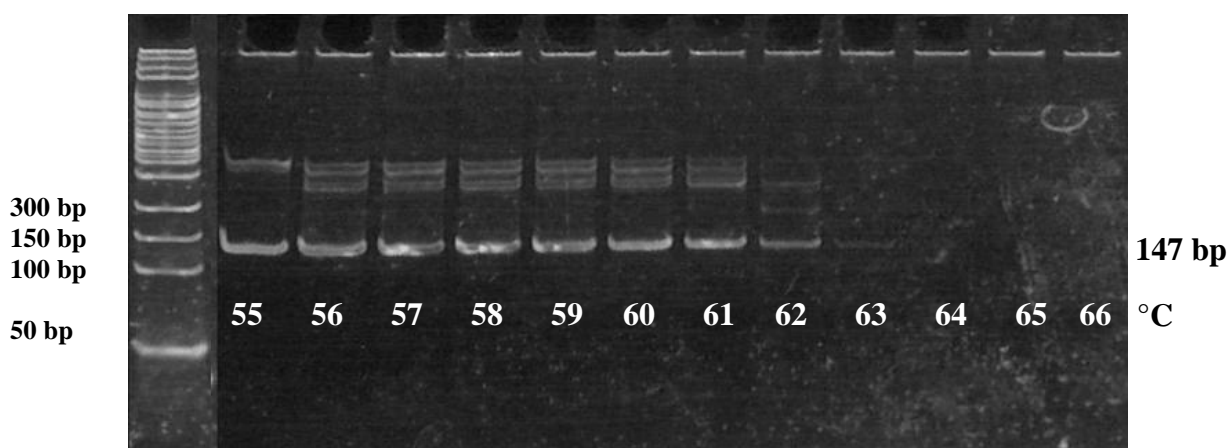
1. 52 °C	5. 56,7 °C	9. 61,4 °C
2. 53,2 °C	6. 57,9 °C	10. 62,6 °C
3. 54,2 °C	7. 59,1 °C	11. 63,8 °C
4. 55,6 °C	8. 60,3 °C	12. 65 °C

Az agaróz gélelektroforézises kiértékelést követően kapott eredményeim alapján, mindkét baktériumtörzs vizsgálatakor a legmegfelelőbb primerkötődési hőmérsékletnek az 59 °C bizonyult.

A továbbiakban a laktobacillusok szelektív kimutatására alkalmas PCR vizsgálatokat az optimált feltételek mellett, vagyis 100 ng templát és 0,8 µM primer végkoncentrációval, valamint 59 °C-os primer kötődési hőmérséklet mellett végeztem. Ezen paraméterek beállítása mellett a kezdeti 35 ciklusos reakció helyett elegendő volt 33 ciklust alkalmaznom.

A plantaricin gén-specifikus reakció optimálása során is elsőként a primer és a DNS templát koncentráció optimálását végeztem el, ahol a fentiekben leírt eredményeket kaptam, vagyis ehhez a PCR reakcióhoz is a 100 ng templát és 0,8µM primer végkoncentráció alkalmazása bizonyult a legmegfelelőbbnek.

A primerkötődési hőmérséklet optimalizálása során 55-66 °C közötti hőmérsékleten vizsgáltam a PCR reakció lefolyását, valamint az agaróz gélelektroforézises kiértékelést követően kapott fragmentumokat. Eredményeimet a 31 ábrán mutatom be. Ez alapján elmondható, hogy a legjobb eredményeket 55 °C-os primerkötődési hőmérséklet alkalmazása mellett kaptam. A továbbiakban tehát a plantaricin-gént tartalmazó tejsavbaktérium törzsek azonosítására alkalmas PCR reakciókhoz 100 ng templát és 0,8 µM primer végkoncentrációt, valamint 55 °C-os primerkötődési hőmérsékletet használtam. Ez esetben is 33 ciklus elegendőnek bizonyult a megfelelő PCR reakció lezajlásához.

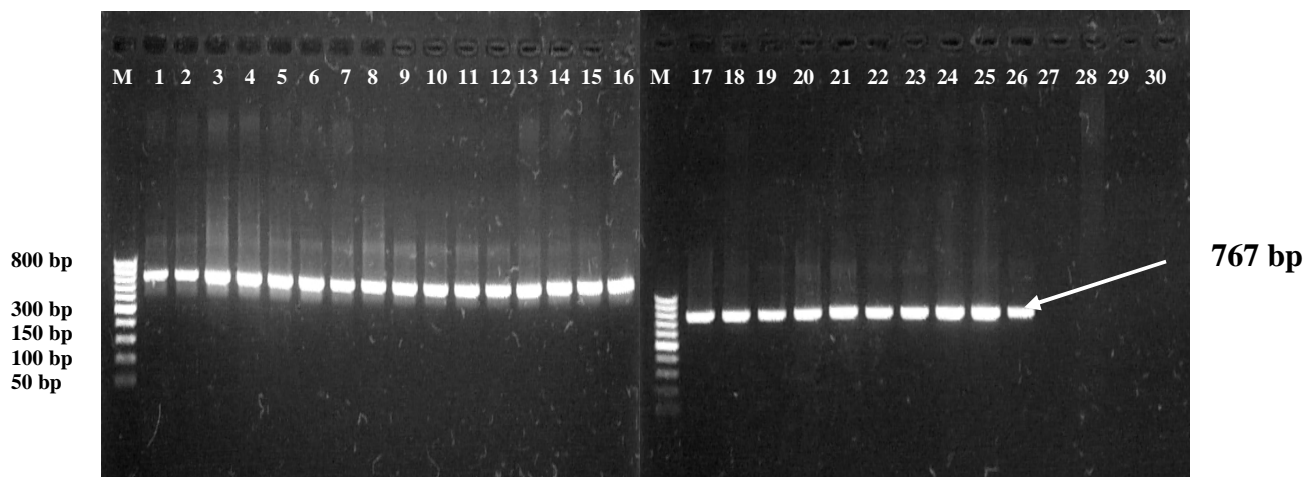


31. ábra: A plantaricin gén jelenlétének kimutatására alkalmas PCR reakció optimalizálása

5.3.3. *Lactobacillus*-ok azonosítása PCR technikával

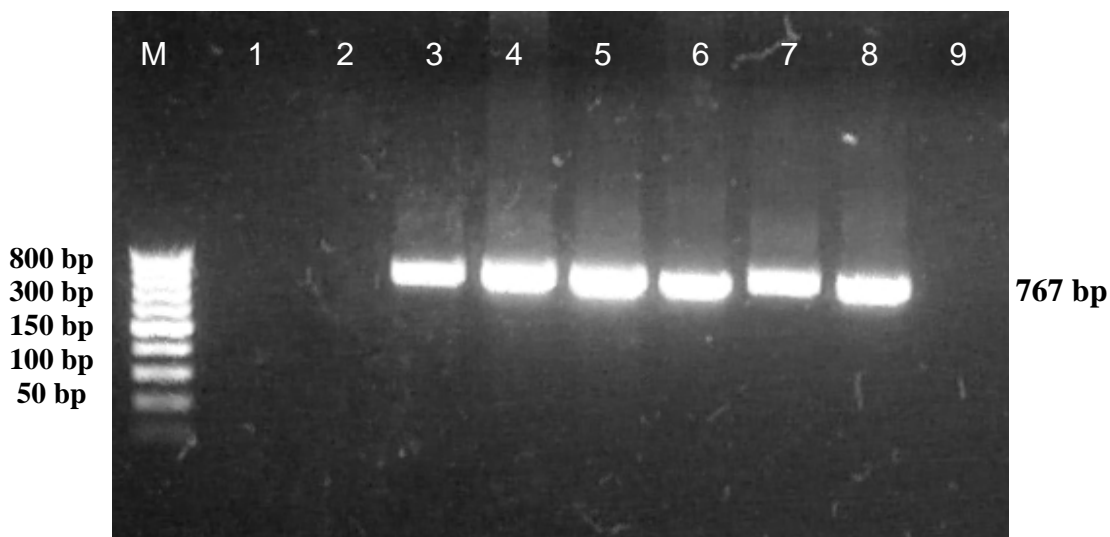
A laktobacillusok szelektív kimutatására alkalmas PCR vizsgálatokat az 5.3.1. bekezdésben felsorolt 26 különböző *Lactobacillus* törzsszel, 3 különböző, negatív kontrollként használt nem-tejsavbaktérium törzsszel, valamint egy a tejsavbaktériumok közé tartozó *Enterococcus* törzs alkalmazásával végeztem el, az előző fejezetben optimalizált reakciókörülmények beállítása mellett. A PCR vizsgálatokhoz a Singh és Ramesh (2008) által tervezett primer párokat használtam.

Az agaróz gélelektroforézises kiértékelést követően kapott eredményeim alapján az adaptált IRL-IFL primerpárok által sokszorozott 767 bp fragmentumot valamennyi tejsavbaktérium törzs esetében megkaptam. A negatív kontrollként alkalmazott *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 és *Thermobifida cellulosilytica* DSM 44535 törzsek esetén a PCR reakcióhoz felhasznált IFL-IRL primerpár nem talált kötőhelyet, vagyis sokszorozásra alkalmas, homológ szekvenciát, így ezen törzsek esetében nem kaptam jelet. Az eredményeket a 32. ábra mutatja.



32. ábra *Lactobacillus*-ok azonosítása PCR technikával

M: molekulatömeg marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 bp), **1.** 01; **2.** 05; **3.** 154; **4.** 2107; **5.** 2108; **6.** 2142; **7.** 2741; **8.** 2749; **9.** 2750; **10.** 2752; **11.** 2756; **12.** 2763; **13.** 2768; **14.** 2770; **15.** 2771; **16.** 2775; **17.** 299v; **18.** 397; **19.** D13; **20.** DT41; **21.** sakei; **22.** SF1; **23.** VT1; **24.** VE56; **25.** Shiota; **26.** N2; **27.** ta wt2; **28.** tb100; **29.** izolálási kontroll; **30.** DV kontroll



33. ábra: IFL-IFR primerpár *Lactobacillus* specifitásának vizsgálata PCR technikával

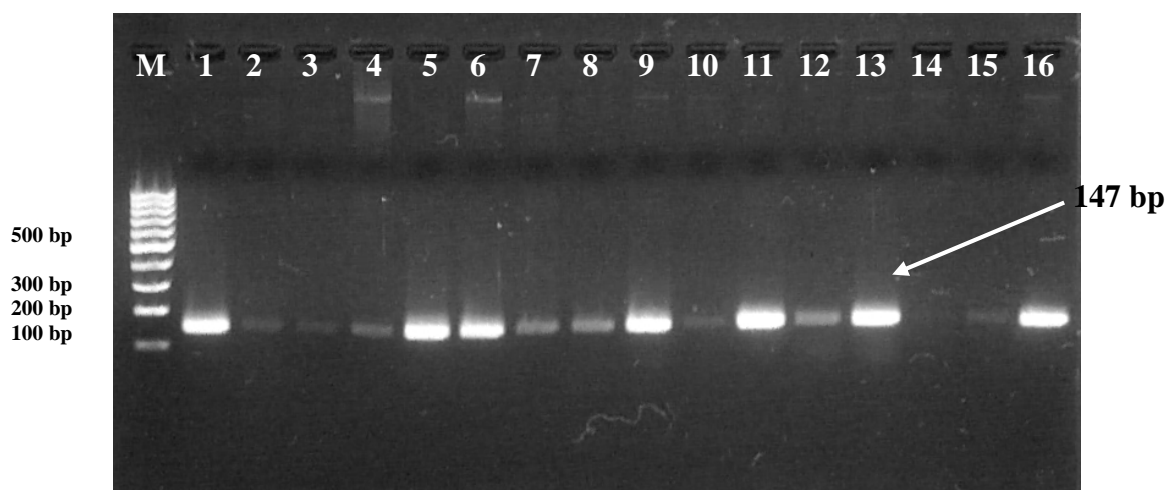
M: molekulatömeg marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 bp), **1.** 1312; **2.** Top 10; **3.** 01; **4.** 05; **5.** 154; **6.** 2107; **7.** 2108; **8.** 2142; **9.** izolálási kontroll

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a bemutatott módszer sikerrel alkalmazható a *Lactobacillus* nemzetség szelektív azonosítására, más tejsavbaktériumoktól és *E. colitól* való megkülönböztetésére.

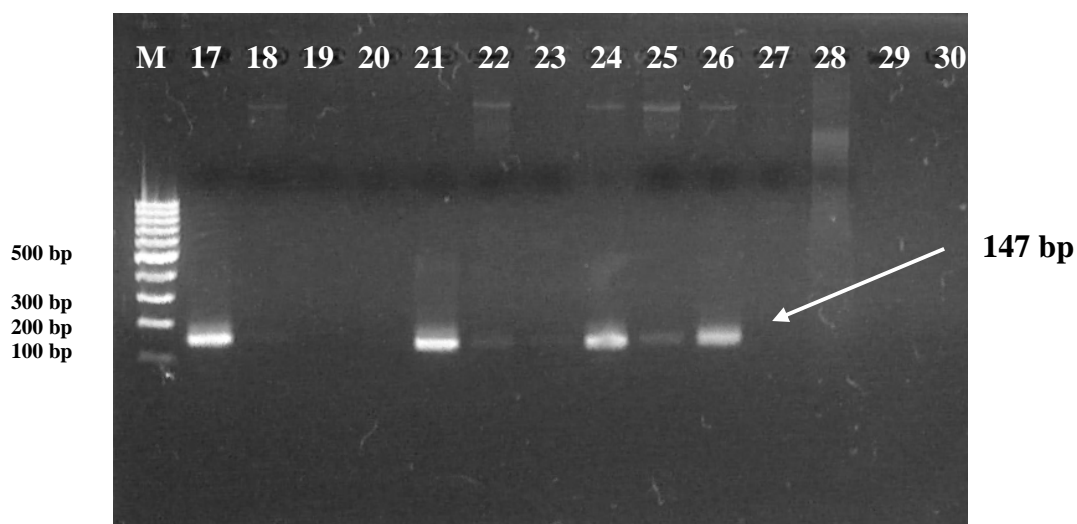
5.3.4. Plantaricin-gén jelenlétének vizsgálata *Lactobacillus* törzsekben PCR technikával

A plantaricin-gént tartalmazó tejsavbaktériumok azonosítására alkalmas PCR vizsgálatokat az 5.3.1. bekezdésben felsorolt 26 különböző tejsavbaktérium törzsszel, valamint 2 különböző, negatív kontrollként használt nem-tejsavbaktérium törzsszel végeztem el, az előző fejezetben optimált reakciókörülmények beállítása mellett. A PCR vizsgálatokhoz a Maldonado et al. (2004) által tervezett PlnA1-PlnA2 primer párokat használtam. A vizsgálat célja az volt, hogy a *Lactobacillus*-ok szelektív kimutatását követően ki tudjam választani közülük a plantaricin-termelő törzseket, vagyis azokat, amelyek hordozzák ezt a gént.

Az agaróz gélelektroforézis kiértékelést követően a PlnA1-PlnA2 primerek által sokszorozott 147 bp fragmentumot az **1.** 01; **5.** 2108; **6.** 2142; **9.** 2750; **11.** 2756; **13.** 2768; **16.** 2775; **17.** 299v; **21.** sakei; **24.** VE56; **26.** N2; jelű tejsavbaktérium törzsek esetében kaptam meg, vagyis ezek tartalmazzák a vizsgált plantaricin gént (34. ábra és 35. ábra).



34. ábra: Plantaricin-gént tartalmazó tejsavbaktérium-törzsek azonosítása PCR technikával
M molekulatömeg marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 bp), **1.** 01; **2.** 05; **3.** 154; **4.** 2107; **5.** 2108; **6.** 2142; **7.** 2741; **8.** 2749; **9.** 2750; **10.** 2752; **11.** 2756; **12.** 2763; **13.** 2768; **14.** 2770; **15.** 2771; **16.** 2775;



35. ábra: Plantaricin-gént tartalmazó tejsavbaktérium-törzsek azonosítása PCR technikával
M molekulatömeg marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 bp), **17.** 299v; **18.** 397; **19.** D13; **20.** DT41; **21.** sakei; **22.** SF1; **23.** VT1; **24.** VE56; **25.** Shirota; **26.** N2; **27.** ta wt2; **28.** tb100; **29.** izolálási kontroll; **30.** DV kontroll

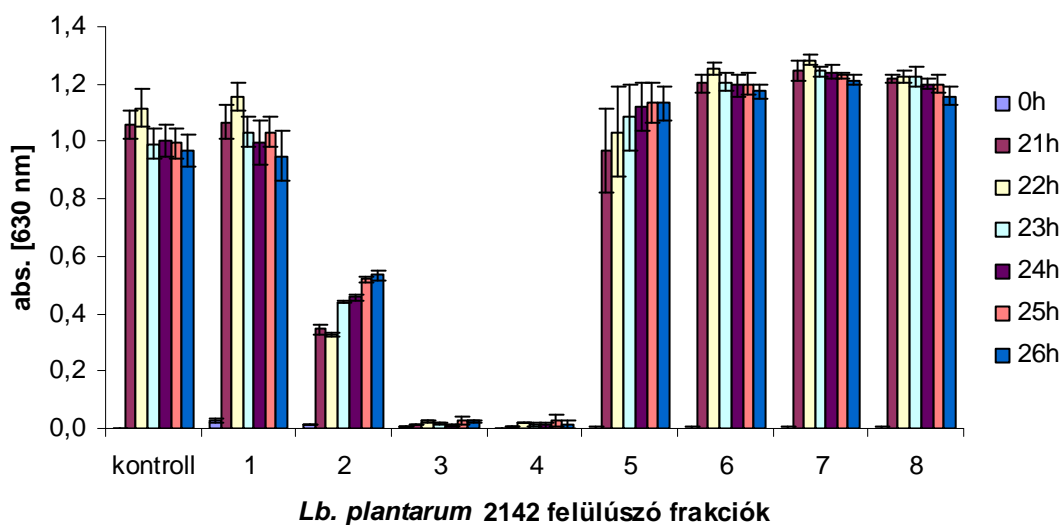
A **14.** 2770; **18.** 397; **19.** D13 és **20.** DT41 tejsavbaktériumok esetében nem kaptam jelet, ezek a baktérium törzsek valószínűleg nem tartalmazzák a vizsgált gént. A **2.** 05; **3.** 154; **4.** 2107; **7.** 2741; **8.** 2749; **10.** 2752; **15.** 2771; **22.** SF1; **23.** VT1 és **25.** Shirota tejsavbaktérium törzsek esetében a PCR sokszorozás eredményeként igen halvány fragmentumot kaptam. Ezek a törzsek valószínűleg a plantaricin-gén valamelyik, néhány bp-nyi eltérést mutató haplotípusát tartalmazhatják, így a néhány nukleotidban mutatkozó szekvencia-eltérés eredményeként a felhasznált PlnA1-PlnA2 primerek illeszkedése, vagyis a PCR sem volt tökéletes, tehát a PCR reakció sem tudott megfelelően végbemenni.

5.4. Gélkromatográfia eredményei

A bakteriocin termelés igazolására a bizonyítottan plantaricin termelést kódoló gént hordozó *Lactobacillus* törzseket tovább vizsgáltam. A szelektált törzseket MRS táplevesben felszaporítottam, majd a sejtmentes felülúszóikat gélkromatográfiás módszer segítségével frakcionáltam (4.3.6. fejezet).

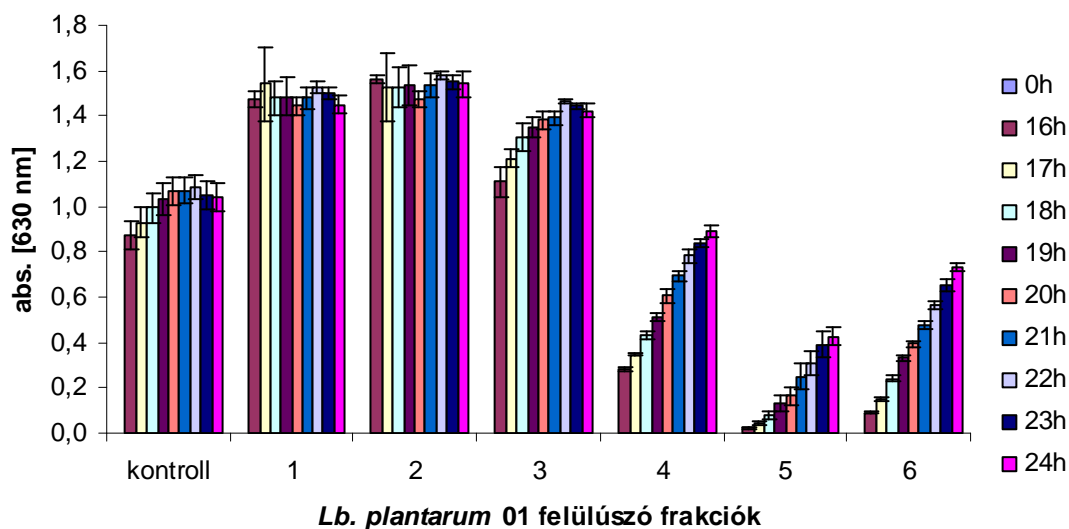
A különválasztott frakciók gátló hatását 96-lyukú mikrotiter lemezen vizsgáltam turbiditás méréssel. Indikátor törzsként *Lb. sakei* DSM20017 törzset alkalmaztam. A mikrotiter lemez lyukaiba 100 µl MRS táplevest, 20 µl sejtszuszpenziót (10^3 sejt/ml induló sejtszám) és 100 µl-t az egyes frakciókból pipettáztam. Kontrollként 100 µl desztillált víz

került a sejtszuszpenziót tartalmazó MRS táplébe. A lemezt 37 °C-os inkubátorba helyeztem és mértem az abszorbaniciát 630 nm-en. Az eredményeket a 36., 37. és 38. ábra szemlélteti.



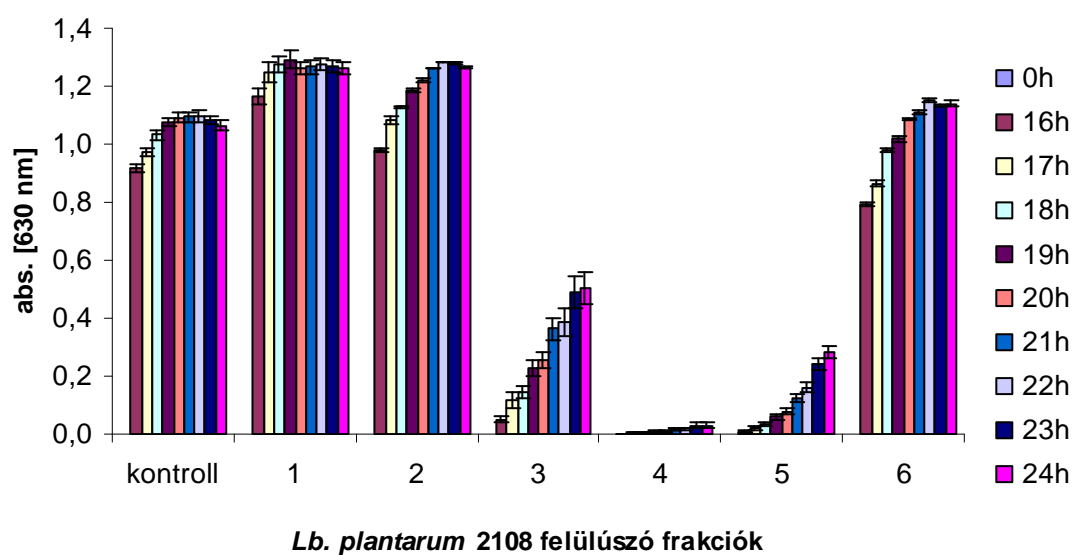
36. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 felülúszó frakcióinak *Lactobacillus sakei* DSM20017 törzs szaporodására kifejtett gátló hatása.

Az eredményekből megállapítható, hogy a 2-es, 3-as és 4-es frakciók gátolták az indikátor mikroorganizmus szaporodását.



37. ábra: *Lactobacillus plantarum* 01 felülúszó frakcióinak *Lactobacillus sakei* DSM20017 törzs szaporodására kifejtett gátló hatása

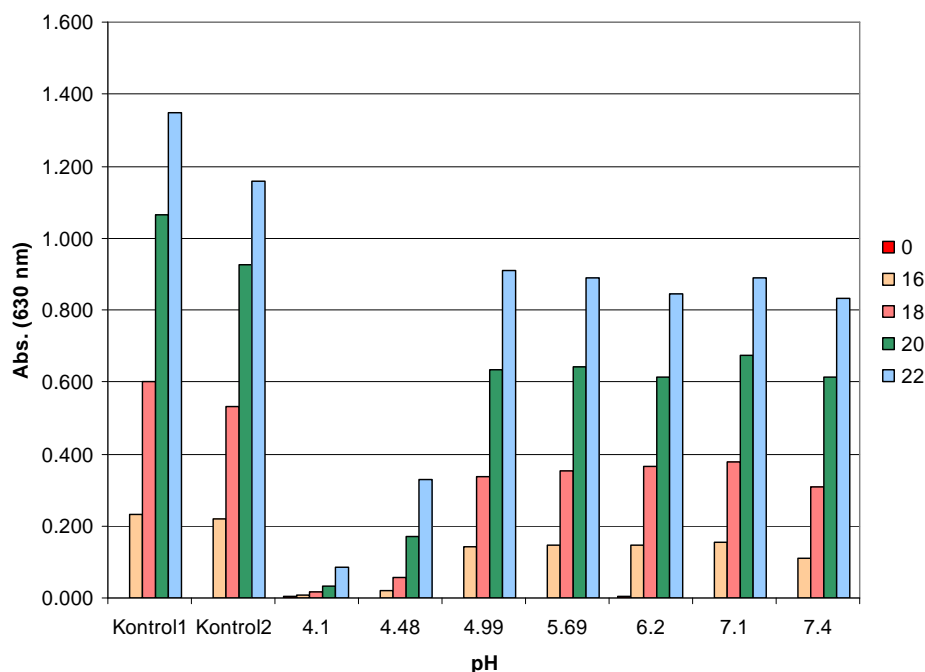
Lactobacillus plantarum 01 törzs felülúszójából elválasztott frakciók közül a 4-es, 5-ös és a 6-os tagok mutattak gátló hatást a *Lb sakei* DSM20017 szaporodására.



38. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2108 felülúszó frakcióinak *Lactobacillus sakei* DSM20017 törzs szaporodására kifejtett gátló hatása

Lactobacillus plantarum 2108 törzs felülúszójából elválasztott frakciók közül a 3-as, 4-es és 5-ös tagok mutattak gátló hatást a *Lb sakei* DSM20017 szaporodására.

A *Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus sakei* DSM20017 törzs szaporodását gátló frakciók pH függését vizsgáltam. A párhuzamos frakciók pH-ját 2 M-os NaOH oldattal állítottam be, majd turbiditás méréssel vizsgáltam, hogy melyik pH-értéken fejt ki gátló hatást a tesztmikroorganizmusra.

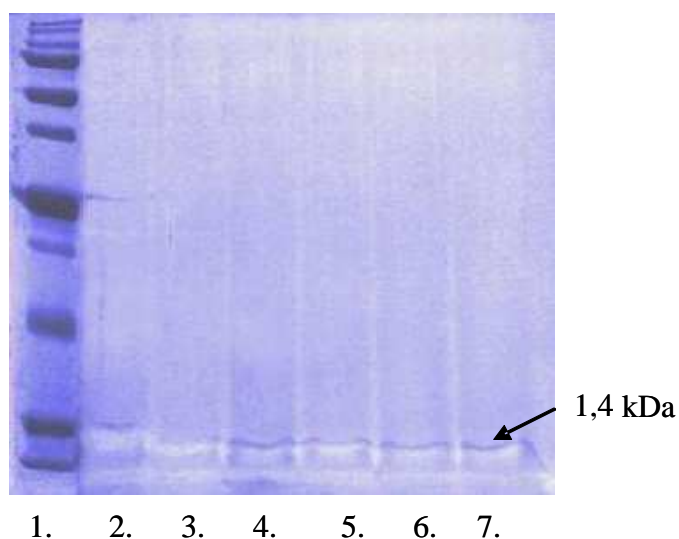


39. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 által termelt, *Lactobacillus sakei* DSM20017 törzs szaporodását gátló frakcióinak pH függése. (Kontrol1: MRS tápleves+*Lb. sakei*, Kontrol2: MRS+fiziológiás sóoldat+ *Lb. sakei*, Minták: MRS+pH beállított frakció+ *Lb. sakei*)

A 39. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy a gátló anyag alacsony pH-értéken fejt ki gátló aktivitását. A bakteriocinek és köztük a plantaricinek is alacsony pH-értéken a legaktívabbak (CAPLICE & FITZGERALD, 1999; KLAENHAMMER, 1993).

5.5. Fehérje kimutatás eredménye

A törzsek felülúszóiból gélkromatográfiával elválasztott gátló frakciókat liofilizáltam, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel megfuttattam. Az eredményeket a 40. ábra mutatja.

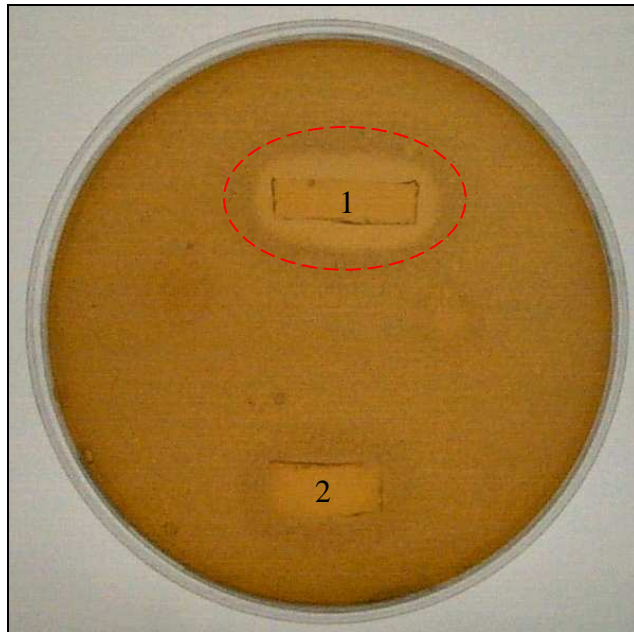


40. ábra: 1. molekula standard (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 10, 2 kDa), 2. Kontroll, *Lb. casei* 2756, 3. *Lb. curvatus* 2775, 4. *Lb. plantarum* 01, 6. *Lb. plantarum* 2142, 7. *Lb. rhamnosus* VTI, 8. *Lb. curvatus* 2768

A 40. ábrán látható, hogy 1,4 kDa molekulatömegnél fehérjefragmenseket detektáltam, amely molekulaméret beleesik a bakteriocinek molekulaméret tartományába.

5.6. A detektált fehérje gátló hatásának igazolása

Annak igazolására, hogy valóban a gátló anyagot detektáltam a *Lactobacillus plantarum* 01 törzsből a *Lactobacillus sakei* DSM20017 törzs szaporodását gátló frakcióban lévő fehérjét SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel történő elválasztás után kivágtam a gélből és *Lb. sakei* DSM20017 törzsszel beoltott (10^4 sejt/ml) MRS agarra helyeztem, amelyből a fehérje bediffundált az agarba és ott kifejtette gátló hatását. Az eredményt a 40. ábra mutatja.



41. ábra: SDS-PAGE-val történő elválasztás után kimutatott fehérje gátló aktivitásának igazolása agarlemez módszerrel. (1: izolált fehérjét tartalmazó gél-rész, 2: fehérjét nem tartalmazó gél-rész)

Az agardiffúziós módszerrel igazoltam a detektált fehérjefragmens gátló aktivitását.

5.7. Új tudományos eredmények

1. Sikeresen adaptáltam Wang és munkatársai (2007), eredetileg Mosman-által (1983) humán sejtekre kidolgozott MTT módszerét *Lactobacillus*-ok élősejtszám meghatározására. Megállapítottam az optimális paramétereket: baktériumsejt koncentrációt, MTT koncentrációt, inkubációs időt, pH hatást, amelyek esetén szoros korreláció áll fenn a sejtszám és a keletkezett formazán koncentráció között. A módszert miniaturizáltam; mikrotiter lemez segítségével (HEGYI et al., 2012).
2. Megállapítottam, hogy a formazán képződés (dehidrogenáz aktivitás) egyes törzseknél jelentősen eltér. Adott törzsnél is jelentősen befolyásolja a szaporító tápleves összetétele. **Igazoltam, hogy azonos szaporodási sebességet eredményező, de eltérő szénhidrát bázisú tápoldat esetén is fenn áll a dehidrogenáz aktivitásban a különbség.**
3. **Igazoltam, hogy a kidolgozott módszer nem érzékeny a holt sejtekre. Adott törzsre felvett MTT-sejtkoncentráció kalibrációs görbe és az adott minta optikai denzitásának ismeretében az élő/holt sejtarány meghatározható.**
4. **A kifejlesztett eljárás alkalmas egyes törzsek mikroba szaporodását gátló komponensekkel szembeni érzékenységeinek vizsgálatára,** illetve a minimális gátlókoncentráció meghatározására, ezt nizin esetre igazoltam.
5. PCR módszert adaptáltam, *Lactobacillus*-ok DNS alapú kimutatására. **PCR technikával igazoltam plantaricin gén jelenlétét, a gént tartalmazó törzsek bakteriocin termelését, illetve vizsgáltam a gén expresszáldását, molekulatömegüket meghatároztam.**

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kutatásaim alapján megállapítottam, hogy 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) kolorimetriás módszer alkalmazható *Lactobacillus*-ok élő sejtszámának megállapítására, gátló anyagok hatásának gyors meghatározására, illetve a különböző környezeti paraméterek sejtek életképességére kifejtett hatásának vizsgálatára. A módszer a laboratóriumi kutatásokban megkérdőjelezhetetlen létjogosultsága mellett a gyakorlatban is hasznosítható számos élelmiszeripari termék, legfőképpen olyan funkcionális termékek gyors vizsgálatához, amelyeknek a fogyasztás pillanatáig meghatározott számú élő sejtet kell tartalmaznia a hozzáfüzött jótékony hatás kifejtése érdekében (probiotikumok), illetve ami még lényegesebb lehet, az élelmiszerekben előforduló romlást okozó és patogén mikroorganizmusok gyors kimutatására, ami a módszer paramétereinek további módosításaival elérhető.

Az emberek változó táplálkozási szokásainak köszönhetően megnövekedett az igény a természetes, kedvező beltartalmi tulajdonságok mellett hosszú minőség megőrzési idővel rendelkező élelmiszerek iránt, amelyek mindemellett kíméletes tartósítási eljárással, illetve természetes tartósító szerekkel kezelnek. A tejsavas fermentáció ideális módszer az ilyen típusú élelmiszerek előállításához, amelynél savnyító hatás mellett antimikrobás anyagok, köztük bakteriocinek képződhetnek, hozzájárulva így az élelmiszerek hosszabb eltarthatóságához, illetve kedvező beltartalmi tulajdonsággal ruházzák fel azt.

Így nagy jelentőséggel bír a tejsavbaktériumok bakteriocin termelés alapján történő szelektálása. Ehhez elengedhetetlen egy megfelelően kidolgozott molekuláris biológiai módszer, aminek segítségével a vizsgált törzsekben kimutatható a termelést hordozó gén jelenléte, illetve annak hiánya. Emellett igen fontos megbizonyosodnunk arról, hogy a bakteriocint kódoló gén expresszálódik is adott technológiai feltételek mellett.

A kutatás folytatásaként fontos a kidolgozott módszerek segítségével azoknak a környezeti tényezőknek a részletes vizsgálata, amelyek a bakteriocin termelést indukálják az egyes törzseknél, illetve fokozhatják azok termelését.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az élelmiszerekben és alapanyagokban lévő mikroorganizmusok elszaporodva rontják a termék minőségét, romlást okoznak, de számos esetben hozzájárulhatnak a termék jellegéhez, sőt javítják annak eltarthatóságát, élvezeti értékét és a fogyasztó egészségére is jótékony hatást fejtenek ki. Az ilyen előnyös tulajdonsággal rendelkező mikroorganizmusok közé sorolhatóak a tejsavbaktériumok - és köztük a *Lactobacillus*-ok –, melyek megtalálhatók többek között a talajtól és természetes vizektől kezdve, a növények felszínén át egészen az emberi béltraktusig.

Az emberiség korán hasznosította a tejsavbaktériumok hasznos tevékenységét, noha ennek nem volt tudatában, s évezredek óta alkalmazta élelmiszerei előállítására és nem utolsósorban tartósítására. Azonban csak az utóbbi 150 évben használjuk a tejsavbaktériumokat tudatosan élelmiszereink megővására, íz-, és állagkialakítására, s amióta felfedeztük e mikroorganizmusokat, máig vizsgáljuk tulajdonságaikat, viselkedéseiket, működésüket. Napjainkban is számos élelmiszer élvezeti-, beltartalmi értékeinek, emészthetőségének javítása céljából alkalmazzák e mikroorganizmusokat, illetve a kevesebb tartósítószer alkalmazása, a kíméletesebb tartósító kezelések, a természetesebb élelmiszer iránti fogyasztói igény hatására a tejsavbaktériumok és az általuk szintetizált antimikrobás anyagok mindinkább előtérbe kerültek.

Az élelmiszeripar fejlődése, a gyártott élelmiszertermékek és a kereskedelmi tevékenység bővülése miatt egyre inkább szükséges az élelmiszerek, illetve azok alapanyagai mikrobiológiai állapotának pontos ismerete.

Számos ma is használt mikrobiológiai vizsgálati módszer több mint száz éve alakult ki. Világszerte a vizsgálatok millióit végzik évente a hagyományos tenyésztési módszerekkel annak ellenére, hogy idő- munka- és anyagigényesek, az eredmény gyakran csak több napos vizsgálatssorozat után értékelhető (DEÁK, 2006a; DEÁK, 2006b). Emiatt a hagyományos tenyésztési élősejt számlálási módszerek nem alkalmasak arra, hogy a proaktív és megelőző jellegű, korszerű minőségsszabályozás igényeinek megfelelően, gyors, hatékony beavatkozást lehetővé tevő módon jussunk a mikrobiológiai eredményekhez. Fontos lehet még a különböző okokból károsodott, szaporítani nem lehetséges, de mégis élő mikroorganizmusok megbízható kimutatása. Mindezek a megváltozott igények azt követelik meg, hogy gyorsabban, több mintából, kevesebb élő munkával, olcsóbban és mégis informatívabban jussunk eredményekhez.

Amennyiben új módszert szeretnénk élelmiszervizsgálatra használni, a módszer validálására van szükség. A validálás azt bizonyítja, hogy az új alternatív módszer technikai

teljesítő képessége összemérhető a szabványos módszerekkel, ezért az alkalmazó bízhat abban, hogy a módszer alkalmas egy adott mikroba vagy mikroba csoport kimutatására és/vagy mennyiségi meghatározására. A validálás során meghatározzák a módszer teljesítési jellemzőit referencia anyagokkal való összehasonlítás segítségével, amit egy laboratóriumon belül, illetve laboratóriumok közötti körvizsgálatokban végeznek. Ehhez az EN ISO 16140:2003 szabvány nyújt útmutatást.

Munkám céljából tűztem ki, hogy a *Lactobacillus* törzsek vizsgálataihoz kidolgozok egy gyors alternatív, dehidrogenáz enzimaktivitás mérésen alapuló módszert, amely alkalmas az élő sejtek sejtszámának, illetve azok különböző gátlóanyagokkal szembeni érzékenységének meghatározására a hagyományos tenyésztésen alapuló módszerekhez szükséges idő töredéke alatt. Az eredetileg emlős sejtek vizsgálatára kidolgozott 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) klorimetriás módszer adaptálása során az első lépés a tetrazólium bromid optimális koncentrációjának (8-9 mg/ml MTT), a vizsgált *Lactobacillus* törzsek mérési tartományba eső sejtkoncentrációjának (10^7 - 10^8 sejt/ml) és az inkubációs időnek a meghatározása volt.

A módszer kidolgozása során azt tapasztaltam - összhangban a szakirodalomban leírtakkal miszerint számos vegyület befolyásolhatja az MTT redukcióját, hogy a tejsavbaktériumok szaporítására alkalmazott MRS, illetve csicsóka tápleves a tetrazólium bromid redukálódását okozza, zavarva így a mérés pontosságát. Ebből következett, hogy minden esetben szükséges a szaporító közeg eltávolítása a baktérium sejtekről a tetrazólium bromid hozzáadása és az ezt követő inkubálás előtt. Az optimalizálás során a 2 órás 37 °C-os inkubáció bizonyult ideálisnak szem előtt tartva, hogy gyorsmódszer kidolgozása volt a cél. A módszer alkalmazása során világossá vált továbbá, hogy a *Lactobacillus* sejtek dehidrogenáz enzimaktivitása az élő sejtszámon és a szaporodási sebességen kívül törzsfüggő, illetve jelentősen befolyásolja a sejtek szaporítására alkalmazott táptalaj összetétele. Tehát megállapítható, hogy a kifejlesztett MTT módszerrel pontos élősejtszám meghatározásához előzetesen minden egyes *Lactobacillus* törzs esetén külön kalibráció szükséges, figyelembe véve a szaporításra alkalmazott táptalajt is. Továbbá a sejtek tetrazólium bromid redukáló képessége a pH esésével csökkenő tendenciát mutat. A meghatározott körülmények és paraméterek mellett a keletkezett formazán kristályok koncentrációja és az élősejtszám között szoros korreláció áll fenn. A kidolgozott kolorimetriás módszer alkalmas *Lactobacillus* törzsek élő sejtszámának meghatározására kevesebb mint 4 óra alatt. A gyorsmódszert kidolgoztam 2 ml-es eppendorf csőre (9 mg/ml MTT koncentráció, 2 óra inkubáció, 37 °C), illetve miniaturizáltam 96-lyukú mikrotiter lemezre (8 mg/ml MTT koncentráció, 2 óra

inkubáció, 37 °C), amely még kevesebb vegyszert igényel, illetve párhuzamosan akár 32 minta (3 párhuzamos) vizsgálatát teszi lehetővé.

További célom volt a törzsgyűjteményünkben lévő *Lactobacillus* törzsek szelektálása bakteriocin termelésük alapján molekuláris biológiai módszer segítségével. A feladat megvalósításához egy új, a *Lactobacillus*-ok DNS-ének kivonására alkalmas izolálási módszert dolgoztam ki, Wizard és a QickGene-mini80 DNS izoláló módszer kombinálásával, amely segítségével megfelelő mennyiségű és tisztaságú örökítőanyag nyerhető ki a baktérium sejtekből. PCR módszert optimalizáltam *Lactobacillus*-ok azonosítására, valamint a plantaricin bakteriocin termelést kódoló gén kimutatására. A vizsgálatok során első lépésként meg kellett határoznom az adott, egyszálú templát DNS sokszorozásához szükséges PCR-reakció optimális paramétereit. Ezek a vizsgálatok kiterjedtek többek között az optimális primer-és templát DNS koncentrációjának meghatározása mellett, az optimális primer-kapcsolódási hőmérséklet és a ciklusszám meghatározására.

Tejsavbaktérium törzsek fajspecifikus kimutatása során (IFL-IRL primerek) reakciónként 100 ng templát és 0,8 µM primer végkoncentráció alkalmazása során kaptam a gélelektroforézises kiértékelés során a legélesebb fragmentumokat. A következő lépés a megfelelő primer-kapcsolódási vagy annealing hőmérséklet kiválasztása volt. Az előzőekben optimált összetételű reakcióelegyet alkalmazva, 52-68 °C közötti primerkapcsolódási hőmérsékleteken végeztem el a vizsgálatokat. Az agaróz gélelektroforézises kiértékelést követően kapott eredményeim alapján a legmegfelelőbb primerkötődési hőmérsékletnek az 59 °C bizonyult. Ezen paraméterek beállítása mellett 33 ciklusos reakciót alkalmaztam.

A plantaricin gén-specifikus reakció optimalizálása során is a PCR reakcióhoz a legmegfelelőbb 100 ng templát- és 0,8µM primer (PlnA1-PlnA2) végkoncentráció alkalmazása bizonyult a legmegfelelőbbnek. Az optimális primerkötődési hőmérsékletet 55 °C, a megfelelő PCR reakció lezajlásához ebben az esetben is elegendőnek bizonyult a 33 ciklus.

Több törzsből (01; 2108; 2142; 2750; 2756; 2768; 2775; 299v; sakei; VE56; N2) sikeresen kimutattam a plantaricin termelést kódoló gén jelenlétét. E gén alapján szelektált törzsek felülúszóit oszlopkromatográfiás módszerrel frakcionáltam, a tesztmikroorganizmus (*Lactobacillus sakei* DSM 20017) szaporodását gátló frakciókból SDS-PAGE módszer segítségével kimutattam a bakteriocin jelenlétét valamint meghatároztam a molekulatömegét (1.43 kDa). Agarlemez módszer segítségével igazoltam, hogy a *Lactobacillus sakei* DSM 20017 törzs szaporodásának gátlásáért valóban a kimutatott fehérje felelős.

8. SUMMARY

Grow of micro-organisms in food and food raw materials can either destroy the quality of the food product causing food deterioration, or in many cases can increase the quality of the food product optimize their shelf life, their enjoyment value, and furthermore microorganisms have positive impact on health status of the consumers.

Lactic acid bacteria including *Lactobacillus* belong to these micro-organisms possessing such good features as mentioned, they can be isolated from soil, natural waters, plant surfaces and human gastrointestinal tract as well.

The positive effect of the lactic acid bacteria was already recognised in early times, even if humans were not aware of their utility. Lactic acid bacteria have been being used for thousands of years to produce and preserve food, only in the last 150 years they are used purposely to preserve food, to improve or modify the taste and consistency. Since microorganisms have been revealed, their characteristics, behaviour and specificity have been continuously studied.

Nowadays these microorganisms are used to improve the enjoyment and the nutritional value, and the digestibility of several food products. Additionally consumers claim, less preservative, temperate preservative treatments, and more natural food products. And this goal can be solved by the application of lactic acid bacteria and their self-synthesized antimicrobial agents.

The development of the food industry and the spread of produced food stuffs and commercial activities, the exact knowledge on the microbiological status of the food and their raw materials becomes more important.

Several current microbiological methods are more than hundred year old. Millions of analyzes are executed worldwide by the traditional plate count techniques even if they are time-, work- and material consuming and their results are usually available only within few days (DEÁK 2006a, DEÁK 2006b).

Therefore the count plate techniques are not suitable for obtaining quick and effective microbiology results as it the proactive, preventive and even modern quality control need. It is also important to have reliable data of damaged by different impacts, growing-incapable, but viable microorganisms. All these changed requirements demand more informative results in shorter time and less manual work, and less sample size.

If a new method is used for food analyzes, its validation should be done. The validation justify that the new alternative method is comparable (commensurate) with the standard one and the method is suitable for the detection and quantitative measurement

special microba or group of microbas. Performance factors of the new method are determined against reference materials by in-house laboratory and interlaboratory studies according to the EN ISO 16140:2003 standard.

My research aim was to develop a quick, alternative method based on the measurement of dehydrogenase enzyme activity for analyzes of the *Lactobacillus* species, which is suitable to measure the number of viable cells and to determine the sensitivity of cells against different inhibitors. It should need less time in comparison to the traditional plate count techniques.

For the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide MTT colorimetric assay originally developed for mammalian cells studies, the first step was to determine the optimal concentration of the tetrazolium bromide (8-9 mg/l MTT), the cell concentration range of the analysed *Lactobacillus* species (10^7 - 10^8 cell/ml) and the incubation time.

In my experimental work I confirmed similar to the literatures data that several chemicals may influence the reduction of MTT. The applied MRS broth for lactic acid bacteria causes tetrazolium bromide reduction by itself and therefore it disturbs the accuracy of the method. So I concluded that in every case it was necessary to remove the broth from the surface of the bacteria cells before adding tetrazolium bromide and the following incubation. During optimization of the incubation 2 hours and 37 °C temperature were the best, as my aim was to develop a quick method. During the use of this method it has been discovered that the dehydrogenase activity of the *Lactobacillus* cells depends on not only the number of viable cells and the growth rate, but it also depends on the strain, and even the composition of the applied cell-grow medium also has an influence on it. So it can be declared that special calibration curve is needed for the developed MTT method to evaluate the accurate viable cell number and separate for each *Lactobacillus* strain and the applied broth as well.

Furthermore the reductive ability of the tetrazolium bromide showed decreasing tendency as the pH decreased. Under controlled circumstances and parameters, there is close correlation between the concentration of the created formazan crystals and the number of viable cells.

This developed colorimetric method is suitable to determine the viable cells of the *Lactobacillus* in less than 4 hours.

I developed a quick method, which can be carried out in 2 ml eppendorf tubes (9 mg/ml MTT, 2 hour-incubation, 37 °C) and in 96-well microtiter plates (8 mg/ml MTT, 2 hour- incubation, 37 °C), which needs less chemicals and it is also preferable that it can be used for 32 samples in three parallels at the same time.

My further aim was to select *Lactobacillus* strains from strain-library base on their bacteriocin production by the means of molecular biology methods. I improved the DNA isolation method to obtain the DNA of the *Lactobacillus* strains. The combination of the Wizard and the QickGene-mini80 DNA isolation assay is the novelty of this developed method, which improved the efficiency in quantity and purity of the DNA isolated from the bacterium cells. I optimized the PCR method for identifying *Lactobacillus* strains and detecting the plantaricin bacteriocin coding gene. In the first step I had to determine the optimal parameters of the PCR reaction (optimal concentration of the primer and the template DNA, optimal primer-annealing temperature, PCR cycle number), which is necessary for the single template DNA amplification.

100 ng template and 0.8 μ M primer concentration resulted in the strain-specific detection of lactic acid bacteria (IFL-IRL primers) gave the sharpest DNA fragment bands on gels of electrophoretic measurements. The next step was to choose the proper temperature of the primer binding or annealing. Applying the previously optimized reaction mix composition, the analyzes were achieved on 52-68 °C primer annealing temperature. Results showed that the most acceptable primer annealing temperature was 59 °C. Under these adjusted parameters, I used 33 cycle-reaction period.

For the plantaricin gene-specific PCR reaction, the 100 ng template and 0.8 μ M primer concentration (PlnA1-PlnA2) was the most suitable. The optimal primer annealing temperature was 55 °C, and the 33 cycle –reaction period was also usable.

I selected successfully several strains (01; 2108; 2142; 2750; 2756; 2768; 2775; 299v; sakei; VE56; N2), which coded plantaricin gene. The supernatants of the selected species were investigated for the inhibitory activity against the test organism (*Lactobacillus sakei* DSM 20017). Supernatants were fractionated by column chromatographic method. The individual fractions were further investigated for growth inhibiting activity and the bacteriocin containing ones were separated by SDS-PAGE to determine the molecular weight (1.43 kDa) of the peptid.

By the means of agar plate technique, I confirmed that the detected protein was the responsive for the growth inhibitory effect of the *Lactobacillus sakei* DSM 20017 strain.

9. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

ABATE, G., MSHANA, R. N., MIÖRNER, H. (1998): Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2 (12) 1011-1016. p.

ADAMS, M. R. & NICOLAIDES, L. (1997) Review of the sensitivity of different food borne pathogens to fermentation. *Food control*, 8 (5/6) 227-239. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(97\)00016-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00016-9)

ALLEY, M. C., SCUDIERE, D. A., MONKS, A., HURSEY, M. L., CZERWINSKI, M. J., FINE, D. L., ABBOTT, B. J., MAYO, J. G., SHOEMAKER, R. H., BOYD, M. R. (1988): Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research* 48 589-601. p.

ALTMAN, F. P. (1976): Tetrazolium salts and Formazans. Gustav Fischer Verlag Stuttgart-New York.

AUSUBEL F. M., BRENT R., KINGSTON R. E., MOORE D. D., SEIDMAN J. G., SMITH J. A., STRUHL K. (1989): Short protocols in molecular biology. *Greene Publishing Associates and Wiley Interscience*, New York, N.Y

AXELSSON, L. (1998): Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. pp. 1-72. In: Salminen, S. és von Wright, A. (Szerk.): Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker, Inc., 617 p. ISBN: 0-203-02673-X Master e-book ISBN

AVONTS, L., VAN UYTVEN, E., DE VUYST, L. (2004): Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal*, 14 947–955. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.003>

BARÁTH, Á., NÉMETH, E., HALÁSZ A. (2001): Experiments for production of lactofermented red beet juice 528-532. In: Pfannhauser, W., Fenwick, G. R., Khokhar, S.

(Szerk.): Biologically-active Phytochemicals in Food Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 616 p. ISBN 0-85404-806

BELÁK, Á., DEÁK, T. (2007): A molekuláris módszerek újabb lehetőségei. *Alkoholmentes italok*, 2 24-26. p.

BELÁK, Á., KISKÓ, G., KOVÁCS, M., MARÁZ, A., MOHÁCSINÉ FARKAS, CS., POMÁZI, A. (2011): Gyors és molekuláris biológiai módszerek alkalmazása élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálatára. Gyakorlati kézikönyv. Digitális tankönyv. *Nemzeti Tankönyvkiadó*.

BERRIDGE, M. V., TAN A. S. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303 (2) 474-82. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. (1996): The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4 14-19. p.

BREDHOLT, S., NESBAKKEN, T., HOLCK, A. (1999): Protective culture inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157: H7 in cooked, sliced vacuum. And gas packaged meat. *International Journal of Food Microbiology*, 53 43-52. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00147-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00147-6)

CAMPLING, B.G., PYM, J., BAKER H.M., COLE S.P.C., LAM Y. M. (1991): Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *British Journal of Cancer*, 63 75-83. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.1991.16>

CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W. G., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D., MITCHELL, J. B. (1987): Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Research*, 47 936-942. p.

CAPLICE, E & FITZGERALD, F. (1999): Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50 131–149. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)

CESARI, I. M., RIEBER, M., IMAEDA, T. (1969): Localization and Properties of Enzymes Involved with Electron Transport Activity in Mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 98 (2) 767-773. p. <http://jb.asm.org.sci-hub.org/content/98/2/767.full.pdf+html>

CHEN, H., & HOOVER, D. G. (2003): Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 2(3) 81-100. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>

CLEVELAND, J., MONTVIK, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS, M. L. (2001): Bactriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71 1-20. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)

COLLIER, A. C., PRITSOS, C A. (2003): The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochemical Pharmacology*, 66 281–287. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00240-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00240-5)

DIAS, N., NICOLAU, A., CARVALHO, G. S., MOTA, M., LIMA, N. (1999): Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *Journal of Basic Microbiology*, 39 (2) 103 –108. p.

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

DEÁK, T. (2006a): Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest. ISBN: 9789632866345

DEÁK, T. (2006b): Mikrobiológiai vizsgáló módszerek. Budapesti Corvinus Egyetem, Mezőgazda Kiadó, Budapest.

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

DE BOER, E., BEUMER, R. R. (1999): Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50 119–130. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00081-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00081-1)

DELVES-BROUGHTON, J., BLACKBURN, P., EVANS, R. J., HUGENHOLTZ, J. (1996): Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie Van Leeuwenhok*, 69 193-202. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00399424>

DE MARTINIS, E. C. P., FRANCO, D. G. M. (1998): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork prod by a *Lactobacillus sakei* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 42 119-126. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00059-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00059-2)

DENIZOT, F. & LANG, R. (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of ImmunologicalMethods*, 89 271-277. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561\(88\)90526-7](http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561(88)90526-7)

DE VUGST, L., VANDAMME, E. J. (1994): Bacteriocins of lactic acid bacteria. *microbiol Genet Appl*. London : Blackie Acad and professional. ISBN- 75 140174-9.

DIAS, N., NICOLAU, A., CARVALHO, A. G., MOTA, M., LIMA, M. (1999): Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *Journal of Basic Microbiology*, 39 2 103-108. p. DOI : [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4028\(199905\)39:2<103::aid-jobm103>3.0.co;2-d](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-4028(199905)39:2<103::aid-jobm103>3.0.co;2-d)

DOOLEY J. J., SAGE H. D., BROWN H. M., GARRETT S. D. (2005): Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. *Food Control*, 16 601–607. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.022>

EN ISO 16140:2003. *Microbiology Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods*.

ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHZAKI, A. (2000): Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 85-106. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x>

FARKAS, J. (1998): Korszerű mikrobiológiai vizsgálati módszerek. *Konzervújság*, 1 9-10. p.

FISCHER, J., PROSENC, M.H., WOLFF, M., HORT, N., WILLUMEIT, R., FEYERABEND, F. (2010): Interference of magnesium corrosion with tetrazolium-based cytotoxicity assays. *Acta Biomaterialia*, 6 1813-1823. p. DOI: <http://dx.doi.org/0.1016/j.actbio.2009.10.020>

FREIMOSER, F. M., JAKOB, C. A., AEBI, M., TUOR, U. (1999): The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Applied and environmental microbiology*, 65 3727-3729. p.

Fung D. Y. C. (2002): Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1 3-22. p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. (2002): Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London (Ontario, Canada), 1–11. p.

GABRIELSON, J., HART, M., JARELO, A., KÜHN, I., MCKENZIE, D., MÖLLBY, R., (2002): Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50 63-73. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00011-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00011-8)

GERLIER, D., THOMASSET, N. (1986): Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 57 57-63. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2)

GERMINI, A., ZANETTI, A., SALATI, C., ROSSI, S., FORRÉ, C., SCHMID, S., MARCHELLI, R. (2004): Development of Seven-Target Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Transgenic Soybean and Maize in Feeds and Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 3275-3280. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf035052x>

GIRAFFA, G., CHANISHVILI, N., WIDYASTUTI, Y. (2010): Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161 480-487. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>

GONZALEZ, B., ERWIN GLAASKER, E., EDMUND R. S. KUNJI, E. R. S., DRIESSEN, A. J. M., SUAREZ, J. E., KONINGS, W. N. (1996): Bactericidal Mode of Action of Plantaricin C. *Applied And Environmental Microbiology*, 2701–2709. p.

GUDER, A., WIEDEMAN, I., SAHL, H. G. (2000): Post translationally modified bacteriocins the lantibiotics. *Biopolymers*, 55 62-73. p.

HEGYI, F., ZALÁN, ZS., HALÁSZ, A. (2012): Improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay for measuring the viability of lactic acid bacteria. *Acta Alimentaria*, 41 (4) 506-512. p.

HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJÖRKROTH, J., SCHILLINGER, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 365–373. p.

HUAMIN, J., HUI, Z. Ci. S., YONG, L., HUIJUN, Q., BINGYAN Z. (2002): Determination of Pretransplant Viability of Leydig cells by MTT Colorimetric Assay. *Transplantation Proceedings*, 34 3419–3421. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-1345\(02\)03678-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-1345(02)03678-3)

ISHIYAMA, M., MIYAZONO, Y., SASAMOTO, K., OHKURA, Y., UENO, K. (1996): A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44 1299-1305. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140\(97\)00017-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140(97)00017-9)

JACK, R.W., JUNG, G. (2000): Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chem diversity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 310-317. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00094-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00094-6)

JASSON, V., JACXSENS, L., LUNING, P., RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., (2010): Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27 710-730. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>

JÁMBOR, B (1956): A tetrazólium-vegyületek enzimológiája. *Agrokémia és talajtan*, 5 (1) 147-152. p.

KANDLER, O. (1983): Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49 209-224. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00399499>

KIEV S. GRACIAS AND JOHN L. MCKILLIP (2004): A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, 50 883–890. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/w04-080>

KING, A. D., JR., & NAGEL, C. W. (1975): The influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Food Science*, 40 362-366. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb02202.x>

KISS, I. (1977): Mikrobiológiai vizsgálati módszerek az élelmiszeriparban. Mennyiségi vizsgálatok. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

KLAENHAMMER, T. R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 39-86. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90057-g](http://dx.doi.org/10.1016/0168-6445(93)90057-g)

KUSHARYATI, D. F., HENDRATI, P. M., SUKANTO. (2011): Diversity of local probiotic *lactobacilli* in tomato juice and its potential as functional food. Proceeding of The 3rd International Conference of Indonesian Society for Lactic Acid Bacteria (3rd IC-ISLAB).

KREMMER, T., BOROSS, L. (1974): Gélkromatográfia. Műszaki Könyvkiadó, Budapest.

LAAKSONEN, T., SANTOS, H., VIHOLA, H., SALONEN, J., RIIKONEN, J., HEIKKILÄ, T., PELTONEN, L., KUMAR, N., MURZIN, D.Y., LEHTO, V.P., HIRVONEN, J. (2007): Failure of MTT as a toxicity testing agent for mesoporous silicon microparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 20 1913-1918. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/tx700326b>

LAVERMICOCCA, P., VALERIA, F., EVIDENTE, A., LAZZARONI, S., CORSETTI, A., GOBBETTI, M. (2000): Purification and characterization of novel antifungal compounds by

sourdough *Lactobacillus plantarum* 21 B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 4084-4090. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>

LINDGREN, S. E. & DOBROGOSZ W. J. (1990): Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7 (1-2) 149-63. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90703-s](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(90)90703-s)

LIU, Y., PETERSON, D. A., HIDEO KIMURA, H., SCHUBERT, D. (1997): Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69 581-593. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>

LÓPEZ, G.; MARTÍNEZ, J. V., AGUADO, M., LÓPEZ, V. (2012): Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens. *SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*, DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3250-0_2

LUCKOW, T., & DELAHUNTY C. (2004): Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International*, 37 805–814. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.003>

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

MALDONADO, A., JIMÉNEZ-DÍAZ R., RUIZ-BARBA, L. (2004): Induction of Plantaricin Production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after Coculture with Specific Gram-Positive Bacteria Is Mediated by an Autoinduction Mechanism. *Journal of Bacteriology*, 1556-1564. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.186.5.1556-1564.2004>

MANIATIS, T., FRIRSCH, E. F., SAMBROOK, J. (1989): Molecular cloning, New York: Cold Spring Harbor.

MCAULIFFE O ROSS, R. P., HILL, C. (2001): Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25 285-308. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>

- MESSENS, W. & DE VUGST, L. (2002): Inhibitory substances produced by Lactoacilli isolated from sourdoughs - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 72 31-43. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00611-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00611-0)
- MEYER, R., CHARDONNENS, F., HÜBNER, P., LÜTHY, J. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A*, 203 339-344. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf01231072>
- MOSMANN, T. (1983): Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 55-63. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- NES, I. F., HOLO, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55 50-61. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<50::aid-bip50>3.0.co;2-3](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<50::aid-bip50>3.0.co;2-3)
- NETTLES, C. G., BAREFOOT, S. F. (1993): Biochem and genet characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56 338- 356. p.
- NINEHAM, A. W. (1955): The chemistry of formazans and tetrazolium salts. *Chemical Reviews*, 55 355-483. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/cr50002a004>
- NUALKAEKUL, S., & CHARALAMPOPOULOS, D. (2011): Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 146 111–117. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.040>
- ORLA-JENSEN, S. (1919): The Lactic acid bacteria. Host and Son, Copenhagen 118 p.
- OUWEHAND, A. C. (1998): Antimicrobial components from lactic acid bacteria. 139-159. p. In: SALMINEN, S. és VON WRIGHT, A. (Szerk.): Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker, Inc., 617 p.

PECK, R. (1985): A One-Plate Assay for Macrophage Bactericidal Activity. *Journal of Immunological Methods*, 82 131-140. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90232-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(85)90232-7)

PEDERSON, C. S. (1971): Microbiology of Food Fermentations. AVI Westport, CT.

PENG, L., WANG, B., REN, P. (2005): Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45 108-111. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.014>

PLUMB, J. A., MILROY, R., KAYE, S. B. (1989): Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. *Cancer Research* 49 4435-4440. p.

ROLFE, D.R. (2000): The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130 396–402. p.

SARAVANAN, B. C., SREEKUMAR., C., BANSAL, G. C., RAYA, D., RAOA, J. R., MISHRA, A. K. (2003): A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology*, 113 211-216. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00062-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00062-1)

SCHLEIFER, K. H. & LUDWIG, W. (1995): Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 461-467. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80404-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80404-2)

SCUDIÈRE, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURRENS, M. J., SENIFF, D., BOYD, M. R. (1988): Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 48 4827-4833. p.

SENOK, A. C., ISMAEEL, A. Y., AND BOTTA, G. A. (2005): Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*, 11 958–966. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01228.x>

SHERIDAN, G. E. C., MASTERS, C. I., SHALLCROSS, J. A., MACKEY, B. M. (1998): Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. *Applied And Environmental Microbiology*, 1313-1318. p.

SINGER V. L., JIN X., JONES J. L., YUE S., HAUGLAND R. P. (1994): Sensitive fluorescent stains for detecting nucleic acids in gels and solutions. *BioProbes*, 20 12. p.

SINGH, A. K., RAMESH, A. (2008). Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: Insights from a PCR-based approach. *Food Microbiology*, 25 278-287. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.010>

SLOVER, C. M. (2008): *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*, 30 (4) 23-27. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006>

SMITH, F. G.(1951): The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. *Journal of Iowa*, 445-456. p.

STENELAIRE, C., ANTOINE, N., CABROL, C., FERON, G., DURAND A. (2001): Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. *Enzyme and Microbial Technology*, 29 560–566. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00432-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00432-X)

STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36 1-29. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01233-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01233-0)

STOWE, R. P., KOENIG, D. W., MISHRA, S. K., DUANE L. PIERSONB, D. L. (1995): Nondestructive and continuous spectrophotometric measurement of cell respiration using a tetrazoliumformazan microemulsion. *Journal of Microbiological Methods*, 22 283-292. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00009-A](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(95)00009-A)

TABAJDINÉ PINTÉR, V., (2002): Mikróbaszám meghatározási módszerekkel szemben támasztott újabb követelményel. *Konzervújság*, 4 95-97. p.

TALORETE, T. P. N., BOUAZIZ, M., SAYADI, A., ISODA, H (2006): Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology*, 52 189-198. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-007-9057-4>

TAKAHASHI, S., ABE, T., GOTO, J., FUKUUCHI, Y. (2001): Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry International*, 40 441–448. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00097-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00097-3)

TALARICO, T. L., CASAS, I. A., CHUNG, T. C., DOBROGOSZ, W. J. (1988): Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 1854-1858. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.32.12.1854>

TENGERDY, R.P., NAGY, J.G., MARTIN, B., (1967): Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. *Applied Microbiology*, 15 954– 955. p.

TSUKATANI, T., SUENAGA, H., HIGUCHI, T., AKAO, T., ISHIYAMA, M., EZOE, K., MATSUMOTO. K., (2008): Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*, 75 109–116. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.016>

TWENTYMAN, P. R., LUSCOMBE, M. (1987): A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56 279-285. p.

VIGNOLO, G., FADDA, S., DEKAIRUZ, M. N., DE RUIZ HOLGDO, A. A. P., OLIVIER, G. (1996): Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by Lactocin 705, a bacteriocin prod by *L. casei* CRL 705. *International Journal of Food Microbiology*, 27 397-402. p.

WADHAWAN, T., MCEVOYA, J., PRÜB, B. M., KHAN, E. (2010): Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 47 166-173. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.05.003>

WALSER, P.E. (2000): Using conventional microtiter plate technique for the automation of

microbiology testing of drinking water. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 8 193–208. p.

WANG, F., CAO, L., HU, S. (2007): A rapid and accurate 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with nisin as an example. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8 (8) 549-554. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2007.B0549>

WANG, H., CHENG, H., WANG, F., WEI, D., WANG X. (2010): An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82 330-333. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.06.014>

WOLF, C., RENTSCH, J., HÜBNER, P., (1999): PCR–RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (4) 1350–1355. p.

WONG, M. L., MEDRANO, J. F. (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39 (1) 1-11. p.

ZACHAROF, M. P., LOVITT, R. W. (2012): Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A Review Article. *Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society Procedia*, 2 50-56. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Halász Annának, hogy munkám során mind emberileg, mind szakmailag támogatott. Kitartó ösztönzése átsegített az elém gördülő akadályokon, iránymutatásai és tanácsai új lendületet adtak a folytatáshoz.

Szeretném megköszönni a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet egykori igazgatójának, Dr. Bánáti Dianának, valamint a Biológia Osztály egykori vezetőjének, Dr. Gelencsér Évának, hogy lehetőséget biztosítottak kísérleteim elvégzésére.

Külön köszönettel tartozom Dr. Zalán Zsoltnak a kísérletek elvégzésében és a dolgozat írásában nyújtott segítségéért, tanácsaiért, melyekkel nagymértékben hozzájárult doktori dolgozatom elkészüléséhez.

Köszönöm Dr. Jánosi Annának, Koppányné Dr. Szabó Erikának és Dr. Újhelyi Gabriellának a PCR technika elsajátításában és a kísérletek elvégzésében nyújtott gyakorlati, szakmai segítségét.

Köszönet illeti a KÉKI Biológia Osztályának valamennyi munkatársát, Kissné Valentin Évát, Molnár Mihálynét, Takács Krisztinát, Gyebróczki Józsefet, Maczó Anitát, Szerdahelyi Emőkét, Háderné Sólyom Katalint, Horváthné Dr. Szanics Enikőt, Dr. Szamos Jenőt és Nagy Andrást, munkám elkészítésében nyújtott segítségükért, valamint, hogy családias vidám környezetet teremtettek, amelyben öröm volt dolgozni.

Köszönöm szüleimnek, hogy mindenben támogattak és biztosították számomra a megfelelő háttérrel. Köszönöm testvéremnek az idegennyelvű fordítások elkészítésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban barátnőmnek köszönöm a türelmét, szünni nem akaró ösztönzését és támogatását.