



---

**Élelmiszertudományi Kar**

Doktori értekezés tézisei

**TEJSAVBAKTÉRIUMOK SZELEKTÁLÁSA ROMLÁST OKOZÓ ÉLESZTŐK  
SZAPORODÁSÁNAK GÁTLÁSÁRA**

**Zalán Zsolt**

**Készült a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet  
Biológiai Osztályán  
Budapest  
2008.**

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola


**tudományága:** Élelmiszertudományok

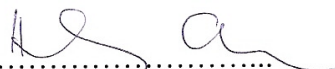
**vezetője:** Dr. Fodor Péter,  
egyetemi tanár, DSc  
Budapesti Corvinus Egyetem

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

**A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

  
.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

  
.....  
A témavezető jóváhagyása

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

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

Farkas József, MHAS

**Tagjai**

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

**Opponensek**

Rezessyné Szabó Judit, PhD  
Sarkadi Lívია, CSc

**Titkár**

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD

## 1. BEVEZETÉS

Az emberek régi vágya, hogy a megszerzett, megtermelt táplálékát mind hosszabb ideig megtartsa fogyasztható állapotában, s e probléma a mai napig foglalkoztatja. Az élelmiszerben bekövetkező kémiai, fiziológiai változások mellett a termék fogyasztásra való alkalmatlanságának fő okai a nem kívánt mikroorganizmusok elszaporodása, az azok által okozott negatív változások. Ezek kiküszöbölése az élelmiszer megfelelő tárolásával részben megoldható, de hosszabb ideig történő tárolás esetén szükséges a termék egyéb módon történő tartósítása. Ez megoldható fizikai (hőkezelés /hőközlés, hőelvonás/, víztartalom-csökkentés, sugárzásos tartósítás), fizikai-kémiai (sózás, pácolás, füstölés, stb.) és kémiai (tartósítószer adagolása) módszerekkel, amelyek közül sok a termék fizikai állagát, ill. kémiai összetételét, ezáltal természetes mivoltát változtatja meg. A fogyasztók körében azonban egyre inkább megnő az igény, a kémiai tartósítószerektől mentes, minimálisan kezelt, azaz úgymond „természetes” élelmiszerek iránt. Az élelmiszertartósítás széles palettájának része a biológiai tartósítás is, amely a termék természetes mikroflóráján, illetve azok antimikrobiális termékein alapul, ezek segítségével növelve a termék élettartamát és biztonságát. E célra leggyakrabban alkalmazott mikroorganizmus a tejsavbaktérium, amely amellet, hogy széles körben megtalálható a természetben, az emberi béltraktus mikroflórájának is fontos tagja. Élelmiszer előállításra, és -tartósításra évezredek óta alkalmazzák, de hogy ezt maguk a tejsavbaktériumok végzik, csak mintegy másfél évszázada tudjuk.

A napjainkban is megjelenő, tejsavbaktériumokkal foglalkozó publikációk nagy száma azt mutatja, hogy még számos újdonságot rejtnek magukban, főleg ha figyelembe vesszük, hogy egy nemzetségen belül az egyes fajok, de azon belül maguk a törzsek is változatos, különböző tulajdonságokat mutathatnak. A tejsavbaktériumok egyik legjelentősebb és legjobban vizsgált nemzetsége a *Lactobacillus*-oké. E nemzetség tagjai amellet, hogy egyes élelmiszereink természetes, hasznos mikroflórájának fontos szereplői és ebből adódóan starter-, illetve védő kultúrák gyakori tagjai, bizonyítottan probiotikus tulajdonságokkal is rendelkeznek. Ezért e nemzetséggel foglalkozó kutatások kiemelt jelentőséggel bírnak.

Élelmiszereink egyik fő romlást okozói a gombák nagyszámú országának tagjai, a -köznapi nevükön- penészek és élesztők. A tejsavbaktériumok együttélését, hatását ezen gombákra már sokan vizsgálták, mindazonáltal ezen hatásokat nagyban befolyásolja a fajok, törzsek változatossága, különböző viselkedése és maga a környezet, amelyben ezen hatásokat vizsgálják.

## 1.1. Célkitűzések

A doktori munkám célkitűzése volt, tíz, korábban már előszelektált *Lactobacillus* törzs szaporodásának, fermentációs tulajdonságának, antimikrobiális metabolit-termelésének (sav, hidrogén-peroxid) meghatározása szintetikus és természetes tápközegben.

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

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

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

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

## 2. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

### 2.1. Kísérletben alkalmazott mikroorganizmusok

*Lactobacillus* törzsek:

*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 154, *Lb. casei* Shirota, *Lb. curvatus* 2768, *Lb. curvatus* 2775, *Lb. paracasei* subsp. *casei* SF1, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 05, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2750, *Lb. plantarum* 01, *Lb. plantarum* 2142, *Lb. rhamnosus* VT1

Élesztő törzsek:

*Candida famata* DMF 1001, *Candida glabrata* CBS 138, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* DMF 1004, *Saccharomyces cerevisiae* 2880

### 2.2. Vizsgálathoz alkalmazott táptalajok

Szintetikus, laboratóriumi: de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) tápleves

Természetes: Csicsóka tápleves

### 2.3. Alkalmazott módszerek

A mikroorganizmusok szaporodását **telepszámlálással**, laktobacillusok esetén lemezöntéssel (MRS agar), élesztők esetén szélesztéssel (PDA agar) és **turbiditásméréssel**, mikrotiterlemezen, 630 nm-en vizsgáltam.

A szerves savak mérését az adott táplevesből, egy éjszakás szaporítást követően lecentrifugált, sejtmentes felülúszóból, **izotachoforézissel** végeztem.

Az adott táptalajon történő előszaporítás után, foszfát-pufferban mértem a sejtek által kiválasztott hidrogén-peroxidot, **enzimes színreakcióval**.

A *Lactobacillus* törzsek által kiválasztott antimikrobiális anyagok közvetlen hatását **telep-teszt** módszerrel, a felülúszóba kiválasztott metabolitok hatását, mind savas, mind neutrális pH értéken, illetve a szerves savak és a hidrogén-peroxid egyedi hatását agardiffúziós **lyuk-teszt**tel, illetve **mikrotiterlemezes módszerrel** vizsgáltam. E módszereket alkalmaztam a laktobacillusok élesztőgátló tulajdonságainak vizsgálatára is.

A fehérjejellegű gátló komponens kivonását, tisztítását a termelő sejtet adszorbensként felhasználó **adszorpciós-deszorpciós módszerrel** végeztem. E komponens fehérjejellegét **vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel** és fehérjebontó **enzimes kezeléssel** is igazoltam. A tisztított anyag molekulatömegének meghatározása **gél-elektroforézissel** történt.

A laktobacillusok által termelt hisztamin meghatározását hisztamin **ELISA kit teszttel** végeztem.

A vegyes kultúrák kialakítása a **kereszt-vonal módszer** és a **lyuk-teszt** eredményei alapján történt, figyelembevéve az egyes törzsek egymásra kifejtett hatását.

A vizsgált törzsek, a kialakított vegyes kultúrák, ezek felülúszóinak, illetve a tisztított fehérjejellegű komponens élesztő szaporodásgátló hatásának élelmiszer-mátrixban történő vizsgálatához csicsóka zöldséglevet használtam, amelybe a gátlás szempontjából vizsgált törzs(ek), felülúszók illetve tisztított komponens mellett élesztőt adtam, s 25 °C-on inkubálva néztem az élesztő sejtszám-változást.

### 3. EREDMÉNYEK

Doktori munkám egyik célja volt megvizsgálni *Lactobacillus* törzsek antimikrobiális metabolittermelését, szerves sav és hidrogén-peroxid kiválasztását laboratóriumi és természetes táptalajon. Az izotachoforézissel mért sav-koncentrációk alapján megállapítható volt a vizsgált törzsek sav-profilja az egyes táptalajokon. Általánosan -nevükből adódóan- tejsavat termeltek legnagyobb mennyiségben mindkét táptalajon, bár egyes törzsek a tejsavhoz képest arányaiban, a csicsóka táplé esetén ezek közül némelyek mennyiségében is több ecetsavat termeltek. Az tejsav:ecetsav arány alapján meghatározható az egyes törzsek fermentatív jellege, ami szerint három törzs, a *Lb. casei* subsp. *casei* 154, *Lb. plantarum* 2142, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2750, mind a szintetikus MRS, mind a természetes csicsóka táptalajon heterofermentatív tulajdonságot mutatott, míg a többi hét törzs homofermentatívot. A sejtek hidrogén-peroxid kiválasztását az egyes táptalajon történő előszaporítás után, foszfát-pufferban mértem, ami alapján megállapítottam, hogy a laboratóriumi táptalajon történő előszaporítást követően mennyiségileg jóval (2-7-szer) több hidrogén-peroxidot termelnek, mint a csicsóka táplé esetén. Ugyanakkor nem találtam összefüggést az egyes törzsek fermentatív jellege és a hidrogén-peroxid termelése között. Eme antimikrobiális metabolitok termeléséről megállapítottam, hogy mennyiségük nagymértékben függ az adott tápközegtől.

A szerves savak (tejsav, ecetsav) és a hidrogén-peroxid egyedi, kizárólagos hatását, a vizsgált törzsek által termelt mennyiség alapján, e metabolitokkal kiegészített tápléval vizsgáltam a teszt élesztők szaporodására, ahol megállapítottam ezek nagyfokú pH függését.

A *Lactobacillus* törzseket élesztőgátló tulajdonságukra vonatkozóan, mind közvetlenül (telep-teszt), mind az általuk, a felülúszóba kiválasztott anyagok alapján (lyuk-teszt) vizsgáltam, és azt találtam, hogy a közvetlen hatás esetén a *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* teszt-élesztő minden esetben jól gátlódott, míg a *Candida* törzsek esetén e gátlás változatos volt, ám a *Saccharomyces cerevisiae*-re egyáltalán nem voltak hatással. Ugyanakkor nem találtam összefüggést a fermentatív jelleg és a gátlás mértéke között. A neutrális pH-jú felülúszó esetén viszont igen változatos, az adott *Lactobacillus* törzstől függő hatás volt megfigyelhető, mindegyik élesztő esetén. Noha a közvetlen hatás vizsgálatánál erőteljesebb gátlást figyeltem meg, a neutrális pH értékre beállított felülúszó is bizonyos mértékben negatívan hatott a teszt-élesztők szaporodására, ami a szerves savakon és a hidrogén-peroxidon túlmutató antifungális anyagra utal, amit megerősített e töményített felülúszó nagyfokú gátló aktivitása is.

A termelő *Lactobacillus* törzs sejteit, mint adszorbenst alkalmazva, adszorpciós-deszorpciós



módszerrel sikeresen tisztítottam a *Lactobacillus plantarum* 2142-es törzs esetén olyan komponenst, amely szaporodásgátló hatást mutatott egyes teszt-élesztőkkel, de kifejezetten a *Candida glabrata* törzssel szemben, s amely anyag fehérjejellegét vékonyréteg-kromatográfiás és enzimkezeléses módszerrel is igazoltam. Továbbá meghatároztam molekulatömegét és így megállapítottam, hogy e komponens egy 11 kDa alatti peptid jellegű antifungális anyag.

Élelmiszerbiztonsági szempontból ugyanakkor fontos az egyes *Lactobacillus* törzsek biogén amin termelése, különös tekintettel a hisztaminra. A vizsgált törzsek hisztamin termelését meghatároztam mind a laboratóriumi, mind a természetes táplé esetén és megállapítottam, hogy összesen négy törzs termelt hisztamint, amelyek közül csak a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2750 mutatta e biogén amin képzését mindkét táptalajon, s viszonylag nagyobb mennyiségben.

A vizsgált tejsavbaktérium törzsek alkalmazásával céлом volt olyan vegyes kultúrák kialakítása, amelyekkel nagyobb élesztőgátló hatást lehet elérni, mint az egyes törzsekkel egyénileg. Ehhez megvizsgáltam az egyes törzsek egymásra kifejtett hatását, mind közvetlenül, mind a felülúszóik, az esetlegesen abban található bakteriocinek tekintetében. Az ebből kapott eredmények alapján 7 vegyes kultúrát alakítottam ki, amelyek élesztőgátló hatását vizsgálva, és összehasonlítva az egyedi törzsek hatásával, azt találtam, hogy a *Lb. curvatus* 2768 és a *Lb. casei* subsp. *casei* 154 törzsek kevert tenyésztete szinergens gátló hatást mutatott egyes élesztőkkel szemben.

Élelmiszer-mátrixként alkalmazva a csicsóka zöldséglevet, megvizsgáltam egyes törzsek egyedi, kevert tenyésztetben mutatott és ugyanezen zöldségleven képzett felülúszóik hatását (savas és neutrális pH esetén is) a teszt-élesztők szaporodására, ezek antifungális tulajdonságainak gyakorlati alkalmazhatóságára vonatkozóan. Megállapítottam, hogy a *Lactobacillus* törzsek közvetlen alkalmazása mellett, az előfermentált zöldséglé, neutrális pH értéken is mutatott élesztőgátló aktivitást, s mindemellett megvizsgálva, a tisztított fehérjejellegű antifungális anyag is kifejtette hatását a zöldséglében.

### 3.1. Új tudományos eredmények

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

#### 4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

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

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

### Publikáció folyóiratban

#### IF-es folyóiratcikk:

BARÁTH, Á., HALÁSZ, A., NÉMETH, E., ZALÁN, ZS. (2004): Selection of LAB strains for fermented red beet juice production. *European Food Research and Technology*, 218 (2) 184-187. p.

ZALÁN, ZS., NÉMETH, E., BARÁTH, Á., HALÁSZ, A. (2005): The influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (3) 219-225. p.

HUDÁČEK, J., ZALÁN, ZS., CHUMCHALOVÁ, J., HALÁSZ, A. (2007): Antifungálny účinky Laktobacilov na plesne rodu *Fusarium* a *Aspergillus* (Antifungal Effect of Lactobacilli on *Fusarium* and *Aspergillus* Molds). *Chemické Listy*, 101 (9) 730–737. p.

### Publikáció konferencia kiadványban

#### Magyar nyelvű (összefoglaló):

ZALÁN, ZS., BARÁTH, Á., HALÁSZ, A. (2003): Romlást okozó élesztőgombák gátlása tejsavbaktériumok törzsekkel. *Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalók*, 174. p.

ZALÁN, ZS., BARÁTH, Á., HALÁSZ, A., NÉMETH E. (2005): A táplé hatása lactobacillusok bakteriocinjeinek aktivitására. *Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalók (Élelmiszertudományi Kar)*, 184. p.

Nemzetközi konferencia (teljes):

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., NÉMETH, E., ZALÁN, ZS. (2004): Selection of LAB strains for breadmaking. *International Congress FLOUR-BREAD '03 Proceeding*, 238-243. p.

Nemzetközi konferencia (összefoglaló):

ZALÁN, ZS., BARÁTH, Á. (2003): Effect of bacteriocin producing certain *Lactobacillus* strains on growth of yeast. *23rd International Specialised Symposium on Yeast Abstracts No. P-3-14*, 120. p.

ZALÁN, ZS., BARÁTH, Á., HALÁSZ, A. (2004): Inhibitory effect of crude and partially purified bacteriocin from *Lactobacillus* strains on yeast. *2nd Central European Congress on Food Abstracts No. P-S-61*, 229. p.

SÁNDOR, E., NÉMETH, E., ZALÁN, ZS. (2004): Selection of Lactic Acid Bacteria for fermentation of root vegetables. *2nd Central European Congress on Food Abstracts No. P-N-64*, 152. p.

ZALÁN, ZS., BARÁTH, Á., HALÁSZ, A. (2004): The influence of *Lactobacillus* growth medium on the inhibitory effect of bacteriocin. *The 19th International ICFMH Symposium FoodMicro 2004 Abstracts No. P09-15*, 219. p.

ZALÁN, ZS., HUDÁČEK, J., NÉMETH, E., HALÁSZ, A., CHUMCHALOVÁ, J. (2006): Growth medium as a parameter for acidic and antifungal metabolite production of *Lactobacilli*. *The SAFE Consortium International Congress on Food Safety*, 17. p.