



ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi- és Technológiai Intézet**

Joghurt kultúrák tejsavbaktériumainak műszeres analitikai módszerekkel történő azonosítása és tipizálása

**Identification and typing of lactic acid bacteria occurring in yogurts by
instrumental analytical methods**

TDK dolgozat

Készítette: **Győrffy Anna**
WJI5K
Élelmiszermérnöki szak, alapképzés
Nappali tagozat
Budai Campus

Témavezető: **Dr. Pomázi Andrea**, egyetemi docens, MATE, ÉTTI,
Élelmiszer-mikrobiológiai, -higiéniai és -biztonsági Tanszék
Dr. habil Kocsis Tamás, adjunktus, MATE, ÉTTI, Élelmiszer-
mikrobiológiai, -higiéniai és -biztonsági Tanszék

**Budapest
2025.**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. A munka célja.....	4
3. Irodalmi áttekintés.....	5
3.1 Mikróbák szerepe a tejtermékek fermentálásában.....	5
3.1.1 Tej, mint alapanyag bemutatása, jellemzése	5
3.1.2 Növényi tejhelyettesítők bemutatása, jellemzése	6
3.1.3 Fermentált tejtermékek bemutatása.....	7
3.1.4 Joghurt fermentálásban résztvevő mikroba fajok bemutatása.....	8
3.2 Mikróbák jellemzésének lehetőségei	11
3.2.1 Telepmorfológiai vizsgálatok.....	11
3.2.2 Sejtmorfológiai vizsgálatok mikroszkóppal	12
3.2.3 Molekuláris biológiai módszerek	14
3.2.4 Mikroorganizmus identifikálása MALDI-TOF MS alkalmazásával	14
3.2.5 Mikroorganizmus tipizálása FT-IR spektroszkópia alkalmazásával.....	15
3.2.6 Szerológiai módszerek	16
3.2.7 Élettani vizsgálati módszerek	16
3.3 Antibiotikum rezisztencia megjelenése az élelmiszeriparban	17
3.3.1 Antibiotikum rezisztencia kialakulása és kockázatai	17
3.3.2 A vizsgálatba bevont antibiotikumok jellemzése	18
4. Anyagok és módszerek	20
4.1 Anyagok.....	20
4.1.1 Vizsgálatba bevont joghurtok.....	20
4.1.2 Tejsavbaktériumok tenyésztéséhez felhasznált tápközeg bemutatása	21
4.2 Vizsgálati módszerek.....	22
4.2.1 Tejsavbaktériumok izolálásának módszertana	22
4.2.2 Izolátumok azonosítása MALDI-TOF MS használatával	23
4.2.3 Izolátumok tipizálása FT-IR használatával	23
4.2.4 Izolátumok antibiotikum érzékenységi vizsgálata	23
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	25
5.1 Tejsavbaktériumok MRS táptalajon történő izolálásának eredményei	25
5.2 Izolátumok MALDI-TOF MS-sel végzett azonosításának eredményei	27

5.3	Izolátumok FT-IR-el elvégzett tipizálási eredményei	30
5.4	Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálati eredményei	33
6.	Összefoglalás.....	35
7.	Köszönetnyilvánítás	37
8.	Irodalomjegyzék.....	38
8.1	Egyéb irodalom.....	42

Rövidítések jegyzéke

Joghurtok:

N: Nádudvari réteges gyümölcsjoghurt

JBL: Jogobella Light gyümölcsjoghurt

JB0: Jogobella 0% cukor gyümölcsjoghurt

MA: Magyar natúr joghurt

C: Cserpes réteges gyümölcsjoghurt

MILM: Laktózmentes Mizo natúr joghurt

T: Tarka görög laktózmentes gyümölcsjoghurt

ZB: Zöldfarm Bio natúr joghurt

MI: Mizo natúr joghurt

D: Danone natúr joghurt

Z: Zott natúr joghurt

G: Greek natúr görögjoghurt

H: Havasi natúr joghurt

K: kecske natúr joghurt

ZK: Zott kókusz alapú natúr joghurt

JS: Joya szója alapú natúr joghurt

A: Alpro szója alapú gyümölcsjoghurt

MM: Mylove-mylife mandula alapú gyümölcsjoghurt

MALDI: Mátrixasszisztált lézerdeszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria

FT-IR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

PLC: polimeráz láncreakció

FISH: flouescens in situ hibridizáció

RFLP: restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

1. Bevezetés

A tej mellett egyre népszerűbbek a savanyított, vagy más néven fermentált tejtermékek, mivel köztudott, hogy fogyasztásuk kedvező élettani hatásokkal jár. Ezen élelmiszerek kialakításáért olyan tejsavbaktériumok felelnek, amelyek igazoltan pozitív hatással vannak szervezetünk egészségére.

A mikrobiológiai kutatások területén folyamatos fejlődés tapasztalható, ami igaz a diagnosztikai módszerekre is. Az 1600-as évekkel összehasonlítva, amikor az első kezdetleges diagnosztikai eljárások, mint a telepmorfológia és mikroszkópia megjelentek, a 21. századra már modern műszeres technológiák állnak rendelkezésre.

Az élőlények, így a mikroorganizmusok tulajdonságát is a génállományuk határozza meg, őrzi. Ezen, vagyis a DNS-en alapuló tulajdonságokat genotípusnak nevezzük. Míg a genotípus DNS szekvencia által meghatározott, külső hatásokra nem változó tulajdonságok halmaza, addig a fenotípus a külső környezeti tényezők hatására folyamatosan változik. A mikrobiológiai diagnosztikai módszerek, a szervezetek ezen két tulajdonságát veszik alapul a vizsgálatokhoz. A modern vizsgálati eljárások között vannak olyanok, amelyek a genotípust vizsgálják, mint pl. a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) analízise, és olyanok is, amelyek a főképp fenotípusos jellemzők vizsgálatára alapoznak, mint a MALDI-TOF MS vagy az FT-IR.

Az új generációknak érdemes a jövő problémáira gondolni és ezekre megoldást keresni, hogy élhető életet tudhassanak maguk után és utódaik helyzetét is biztosítani. Ilyen problémakörökbe tartozik a gyorsuló klímaváltozás, a Föld energiaraktárainak kiszipolyozása, élelmiszerhiány, új betegségek megjelenése és az egészségünk megőrzése. Az egészségre kiterve az utóbbi 50 évben megnőtt az allergiás, emésztőszervi és rákos megbetegedések száma, ami az immunrendszerünk nem megfelelő működéséből adódhat. Immunrendszerünk erősítésére a vitaminok mellett ajánlott probiotikus élelmiszereket fogyasztani, amelyek egészségünkre kedvező hatást gyakorló vegyületet tartalmaznak a fermentáció miatt.

A jövő kihívásai közé tartozik az antibiotikum-rezisztencia egyre nagyobb térnyerése, valamint az, hogy a 21. század polgárai hogyan próbálják ezt megfékezni. Komoly kihívást jelent, hogy az antibiotikumok fogyasztása miatt azok belekerülhetnek az ivóvíz készletekbe és termőtalajokba, azon keresztül pedig az elfogyasztott élelmiszereinkbe. Még inkább hozzájárulva rezisztens törzsek kialakulásához.

Az emberek kezében van a lehetőség a megoldások keresésére, a mi felelősségünk, hogy hogyan használjuk fel ehhez a készségeinket.

Szeretnék dolgozatommal hozzájárulni az egészséges táplálkozás, egészségmegőrzés témaköréhez a tejsavbaktériumok tanulmányozására használható eljárások, valamint ezen baktériumok tulajdonságainak a megismerése révén.

2. A munka célja

A kutatómunkám során lehetőségem nyílt MALDI-TOF-MS és FT-IR (Bruker) készülékek együttes használatára. A műszerek használata az utóbbi egy évtizedben kezdett jobban elterjedni, elsősorban orvosi mikrobiológiai kutatási célokra. Erre például szolgál a COVID-19 kapcsán végzett vizsgálatok (Banerjee és munkatársai, 2021), valamint a különböző patogén mikrobák FT-IR történő tipizálása, például *Klebsiella pneumoniae* (Hu és munkatársai, 2020), vagy *Enterobacter cloacae* (Vogt és munkatársai, 2019).

Az FT-IR berendezést az élelmiszeriparban leginkább élelmiszercsoportok kimutatására használják, a zsír-, fehérje- vagy szénhidráttartalmuk alapján végzett kutatások révén. Kutatási hipotézisem szerint savanyított tejtermékekből, azonos körülmények között kitenyésztett tejsavbaktérium törzsek szénhidráttartalmuk alapján elkülöníthetők, így az eszköz fenotípus alapú mikroba tipizálást tesz lehetővé.

A hipotézisem alátámasztására kutatásom során a kereskedelmi forgalomban beszerezhető joghurttermékek tejsavbaktérium-kultúráit vizsgáltam. Céлом volt a különböző alapanyagokból készült termékekből tejsavbaktériumokat izolálni, majd ezeket a baktériumokat MALDI-TOF MS segítségével faj szinten azonosítani. Az azonosítás után, az azonos fajba tartozó, különböző termékekből származó izolátumokat hasonlítottam össze FT-IR segítségével. A kapott eredmények alapján megpróbáltam összefüggéseket találni egyes gyártók által használt starterkultúrák és a joghurttermékek között.

Továbbá vizsgálni kívántam, hogy a telepmorfológiai különbségek megfeleltethetők-e faj-, illetve törzsszintű különbségeknek. Érdekes és fontos kérdés a tejsavbaktériumok antibiotikumokra adott válasza, ezért vizsgáltam az izolátumok antibiotikumrezisztenciáját négy kiválasztott antibiotikummal szemben. Az így kapott eredményeket is összevettem a műszeres tipizálási eredményekkel.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Mikróbák szerepe a tejtermékek fermentálásában

3.1.1 Tej, mint alapanyag bemutatása, jellemzése

A tej rengeteg pozitív tulajdonsággal bíró élelmiszer, és a belőle készült termékek is a mai napig közkedveltek a fogyasztók körében. Tej alatt általában a szarvasmarhák mirigyváladékát értjük, amit újszülött utódaik táplálása érdekében termelnek, ugyanakkor más patás állatok teje is kisebb százalékban, de feldolgozásra kerül az élelmiszeriparban. Ilyen még a kecske-, juh-, bivaly-, ló-, szamár-, és a teve tej. Ebből is látható, hogy a világ egyes részein, különböző állatok tejének feldolgozása történik, illeszkedve a földrajzi régió kulturális hagyományaihoz. A világon 85%-ban tehéntejet dolgoznak fel, 11%-ban bivalytejet, további 2-2%-ban főleg juh és kecsketejet. Magyarországon eltérőek ezek az arányok, a tehéntej 99%-os népszerűségnek örvend, míg a maradék 1%-ot a kecske és juh tejtermékek teszik ki. Ezek felhasználása leginkább különböző sajtok formájában nyilvánul meg, de napjainkban egyre nagyobb népszerűségnek örvend, ezen páros újjá patás állatok tejének a fogyasztása is. (Kukovics, 2009)

Magyarországon elmondható, hogy sajnos az emberek nem fogyasztanak elegendő tejterméket, pedig számos kedvező élettani hatása van ([http1](#)):

Kitűnő fehérje forrás, 1 dl tej elfogyasztásával minimum 3 g fehérjéhez jut a szervezetünk, amely könnyen fel is szívódik. A tejfehérje emellett teljes értékű fehérjének számít, mivel tartalmazza a metioninon kívül az összes esszenciális aminosavat az emberi szervezet számára. Az esszenciális aminosav hasznosulása sokkal kedvezőbb, ha más, nem esszenciális aminosavak is találhatóak mellettük az élelmiszerben. Ez a kedvező helyzet a tej esetében ugyancsak fennáll (Fenyvessy és munkatársai, 2014).

Számos élelmiszer közül a tejtermékeket tartják a legfőbb kalcium forrásnak. A kalcium a tej és tejtermékek fogyasztásával könnyebben tud hasznosulni, mint a növényi alapanyagokból, amelyekben az egyes szerves molekulákkal komplexet képez, ezzel nehezítve az emberi szervezetben a felszívódását. Ilyen komponens például a fitinsav az olajos magvakban (Harland és Morris, 1995). A kalcium nélkülözhetetlen a csontképzésben, de vérnyomáscsökkentő, izomműködés és bélegészség támogató, inzulin rezisztencia csökkentő hatása van. Kalcium mellett nagy mennyiségben található a tejben még foszfor, kálium, magnézium és szelén is. A kalcium-foszfor arány egészség megőrző szempontból is megfelelő. (Kukovics, 2009)

Ásványianyag tartalma mellett számos vitamin is megtalálható benne, zsírban (D, E, K, A) és vízben oldódók egyaránt (B vitaminok, C-vitamin). A-, D vitamin különösen hasznos, mivel segíti a kalcium felszívódását és beépülését a csontokba. (Kukovics, 2009)

3.1.2 Növényi tejhelyettesítők bemutatása, jellemzése

A tejfogyasztás mellett nagy térnyerésre tettek szert a növényi tejhelyettesítők. Ennek oka lehet, hogy alternatív lehetőséget kínálnak a tejszerű-ital fogyasztására a laktóz-érzékenyeknek, tejfehérje allergiásoknak, illetve vegán életmódot vagy bármilyen más diétát követőknek. Gyakran használják ezekre az élelmiszerekre a növényi tej kifejezést, helytelenül, mivel tej alatt csak az állatok tőgyváladéka érthető (1234/2007/EK rendelet), ezért e termékek esetén javasolt a növényi ital megnevezés használata. A piacon egyre többféle ízvilágú növényi ital és ezek többféle változata megtalálható meg (például csökkentett cukortartalom, hozzáadott ásványi anyagokkal és vitaminokkal ellátott termékek). A legelterjedtebbek a szója-, kókusz-, zab-, rizs- és mandula italok. Ezen növényi italok gyártása hasonló technológián alapulnak: A növényi részeket vízbe áztatják, extrahálják, az extraktumot elválasztják, majd összeállítják a végterméket. A késztermék homogenizálása és hőkezelése szükséges, hogy megmaradjon a szuszpenzió stabilitása, ne következzen be ülepedés, illetve mikrobiológiailag is stabil legyen a késztermék (Mäkinen és munkatársai, 2016).

A növényi italokról általánosságban elmondható, hogy kisebb fehérjetartalommal rendelkeznek, mint a tehéntej (kivétel a szója ital), illetve ezen italok nem alkalmasak a tejfogyasztással bevitt aminosavak helyettesítésére, pótlására. A növényi fehérjék kisebb mértékben tudnak hasznosulni a tejfehérjéhez képest. Mindemellett a növényi italok zsírtartalma is kisebb, leginkább a telített vagy egyszeresen telítetlen zsírsavláncok jellemzőek, a kókusz italok esetén ez inkább eltolódott a telített zsírsavláncok felé, míg szója és mandula italokban inkább egyszeresen vagy kétszeresen telítetlen zsírsavláncok jellemzőek. A tejhez képest a növényi italok koleszterinmentesek, emiatt kedvezőbb fogyasztásuk szív-és érrendszeri problémák esetén. Szénhidráttartalom kapcsán elmondható, hogy a rizs és zabból készült italok szénhidráttartalma sokkal nagyobb, mint a tehéntej vagy más növényi italoknak (Csengeri, 2020). Az 1. táblázat tartalmazza a tehéntej és egyes növényi tejek tápérték összetételének értékeit.

Mindemellett a gyártók próbálják minél inkább fejleszteni a növényi italokat, azáltal, hogy ásványi anyagokat és vitaminokat adagolnak melléjük, hogy tápértékük minél inkább megközelítse, a tehéntej fogyasztásával bevitelhető tápanyagokat. Érdekes azonban figyelembe

venni, hogy a hozzáadott ásványianyagok, például kalcium-karbonát, nem tud olyan mértékben felszívódni és hasznosulni a növényi italok esetén, ezáltal fogyasztásukkal nem viszünk be annyit belőle a szervezetünkbe, mint amennyit a csomagolásokon feltüntetnek.

1. táblázat Tehéntej és növényi italok makro tápanyagainak értékei (Csengeri, 2020).

Ital megnevezése (100 ml)	Energia (kcal)	Fehérje (g)	Zsír (g)	Szénhidrát (g)
Tehéntej (2,8% zsírtartalmú)	60	3,4	2,8	5,3
Rizsital hozzáadott cukor nélkül	45-64	0-0,5	0,8-1,2	9-13
Mandulaital hozzáadott cukor nélkül	13-22	0,5	1,1-2,1	0-0,3
Mandulaital hozzáadott cukorral	19-34	0,2-0,5	0,6-2,1	3-3,3
Zabital hozzáadott cukor nélkül	40-50	0,2-0,7	1,3-1,6	5,6-7,8
Ízesített (kakaós-kókuszos, vaníliás) zabital hozzáadott cukor nélkül	38-48	0,6-0,9	0,6-1,3	6,7-8,5
Ízesített (kakaós) zabital hozzáadott cukorral	62	0,9	1,8	9,8
Kókuszital hozzáadott cukor és rizs nélkül	14-15	0,1-1,7	0,4-1,2	0-1,3
Kókuszital rizsszel, hozzáadott cukor nélkül	19-22	0,1	0,9	2,6-3,2
Kókuszital hozzáadott cukorral	27	0,2	2	1,9
Ízesített kókuszital hozzáadott cukorral	41	0,4	1,1	7
Szójaital hozzáadott cukor nélkül	32-35	2,9-3,4	1,8-2	0,2-1
Szójaital hozzáadott cukorral	39-45	3-3,7	1,7-2,1	2,5-2,6
Ízesített szójaital hozzáadott cukorral	54-61	3	1,7-1,8	6,5-7,8

3.1.3 Fermentált tejtermékek bemutatása

A tej fogyasztás mellett egyre nagyobb népszerűségnek örvend a savanyított vagy más néven fermentált tejtermékek fogyasztása is. Ez köszönhető annak, hogy gasztronómiai élményt nyújt az egyedi ízük és állaguk, valamint, hogy kedvező élettani hatásokkal jár fogyasztásuk. Az emésztőrendszerünk megfelelő működése és egészsége nagyban befolyásolja immunrendszerünk működését, illetve összefüggésben áll, mint „második agy” az agyi működéseinkkel (Aziz és Thompson, 1998). Ez alapján az egészségünk fenntartása érdekében fontos, hogy kellő figyelmet fordítsunk az emésztőrendszerünk egészségére, amit fermentált élelmiszerek fogyasztásával kedvező irányba befolyásolhatunk. Ezen élelmiszerek fő kialakításáért hasznos, a szervezetünk egészségére igazoltan pozitívan ható baktériumok, más néven a probiotikumok felelnek. Fogyasztásuk segíti helyreállítani a bél mikrobióta állományát, antioxidáns hatással is bírnak, hosszú távon csökkentik a szív és érrendszeri betegségek és a 2. típusú cukorbetegség kialakulását. (Wang és munkatársai, 2017, Marco és munkatársai, 2017). Tej alapú fermentált termékek közül az alábbiakat tartjuk számon: tejföl, joghurt és a kefir. Vizsgálataim során a joghurtokkal foglalkoztam.

3.1.4 Joghurt fermentálásban résztvevő mikroba fajok bemutatása

Számos tejtermék ízének, állományának kialakításáért a tejsavbaktériumok felelősek. A tejsavbaktériumokra jellemző, hogy Gram pozitív, nem spóráképző, oxidáz- és a többség kataláz negatív mikrobák. Alakjukra kokkusz vagy pálcika alak jellemző. Csoportjuk nem rendszertani alapokon nyugszik, inkább a csoportosításuk alapja a tejsavas fermentációra való képesség, mint közös tulajdonság (Kosztik, 2021).

A fermentáció lefolyása szerint is meg lehet különböztetni a tejsavbaktériumokat, aszerint, hogy homo- vagy heterofermentatív erjesztés jellemző-e az adott fajra. A homofermentatív mikrobák tejsavas erjesztés során csak tejsavat állítanak elő, míg a heterofermentatív fajok tejsav mellett más vegyületeket képeznek, például ecetsav vagy etanol. Ezek a komponensek fajtól függően különböző arányokban keletkeznek, továbbá gázképződés is megfigyelhető (CO₂). A heterofermentatív fajok két csoportra oszthatók, obligát vagy fakultatív heterofermentatívokra, míg az összes homofermentatív faj, obligát homofermentatív. (Robinson, 1982)

Streptococcus salivarius ssp thermophilus

A *Streptococcus salivarius ssp thermophilus*, a több mint 60 fajt számláló *Streptococcus* nemzetségbe tartozik. A nemzetségen belül egyes fajok patogének (marhák tüdőgyulladásában játszanak szerepet, fogszuvasodás okozói), viszont a *salivarius* csoportba tartozó *S. salivarius ssp. thermophilus* (*S. thermophilus*) éppen ellenkezőleg, ártalmatlan az emberi szervezetre (Deák és munkatársai, 2006). A mikroba fő felhasználási területe a tejipar. Joghurtok egyik fő starterkultúrájának tagja. Általában párban alkalmazzák *Lactobacillus delbrueckii*-vel, kedvező a fajok 1:1 arányban történő felhasználása. A fermentáció kezdetén a *Streptococcus thermophilus* a domináns, a tejsav mellett rendszerint ecetsav, diacetil, hangyasav és acetaldehid is képződik, ezzel kialakítva a natúr joghurt acetiles ízét. Ahogy a pH 4,2 alá csökken a fermentáció vezető szerepét átveszik a *Lactocaseibacillusok*, míg a *Streptococcusok* működése folyamatosan csökken. (Rose, 1982)

A sejtek alakja coccus/gömb, a fajra jellemző, hogy a sejtek láncba rendeződnek, vagy párosával állnak. Méretük kisebb, mint 2 µm. Tejsavas agaron kicsi fehér telepek formájában jelenik meg. Termofil starterkultúrának számít, hőmérsékleti optimuma 37-50 °C. Vizsgálatokat végeztek, hogy hogyan reagál a tej antimikrobás anyagaival és szulfadiazinnal szemben. Aflatoxin rezisztensnek mondható 0,44 µg/ml-ig. (Robinson, 1982)

Lactobacillus delbrueckii

A *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó mikroba, mely a tejsav baktériumok legnagyobb csoportját alkotja. A *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii* és *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* alfajokba tartozó mikrobák pálcá alakúak, termofil tulajdonságúak. Hőmérsékleti optimumuk 40 °C. Obligát homofermentatív mikrobák, tehát a glükózból csak tejsavat képeznek. MRS agaron fehér apró telepeket hoznak létre, a telepek körül halvány körkörös zónával, ez egy megkülönböztethetőségi vizsgálat a *S. thermophilus*-szal szemben. Kombináltan alkalmazva más starterekkel a joghurtok mellett, svájci és olasz sajtok készítéséhez is alkalmazzák. (Robinson, 1982)

Lactobacillus zeae

A *Lactobacillus* nemzetség képviselője, régebben a *Lacticaseibacillus casei*-hez tartozó alfajnak tekintették (Robinson, 1982). A sejtek pálcá alakúak, méretük 0,5-2,4 µm. A telepek (MRS agaron) sima, csillogó felszínűek, fehér színűek, méretük 1-2 mm. A pálcák egyenként, vagy láncokban összekapcsolódva fordulnak elő. Termofil starter, de viszonylag széles, 10-45 °C tartományban képes növekedésére. A fermentáció mechanizmusa szerint fakultatív heterofermentatív (Dicks és munkatársai, 1996).

A *L. plantarum* mellett ezt a fajt gyakran ajánlják az élelmiszeriparban egyes növényi alapú fermentált készítmények startereként, amire egy tamarillo (paradicsomfa, *Cyphomandra bataanensis*) alapú fermentált élelmiszer készítése során mutattak rá (Inayah és munkatársai, 2022).

Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus nemzetségbe tartozó, termofil starter. Hőmérsékleti optimuma 45 °C, obligát homofermentatív. Felhasználási területe a joghurt gyártás, illetve más termofil starterekkel keverve a kefirgyártásban is használják. Indiában egy ottani ételkülönlegesség előállításához is alkalmazzák: a paneerhoz, amely egy bivalytejből készült sajtszerű termék. (Robinson, 1982)

Számos pozitív élettani hatással bír a fogyasztása: megelőzi a székrekedést, csökkenti a vér koleszterinszintjét, probiotikus mikroba révén érdemes fogyasztani antibiotikum kúra esetén, hogy helyreállítsa a bélbióta egyensúlyát. Antimikrobás anyagokat termel, illetve bontja a laktózt, amivel hozzájárul, laktóz érzékenyeknek szánt élelmiszerek előállításához.

Lacticaseibacillus rhamnosus

Lacticaseibacillus nemzetség tagja, korábban a *Lacticaseibacillus casei* egyik alfajának hitték, de kutatások kimutatták, hogy a *L. rhamnosus* egy teljesen önálló faj a tejsav baktériumok között. (Zheng és munkatársai, 2020). A fajra jellemző alak a pálcika, és gyakran

láncokba csoportosulnak a sejtek. Termofil starter, 45 °C -on is képes telepeket képezni. Fermentációs képessége szerint fakultatív heterofermentatív mikrobák közé sorolható. Alkalmazzák joghurtok és más tejtermékek starter kultúrájaként, kiemelten még sajtok készítésénél. (Robinson, 1982)

Az emberi szervezetben probiotikus baktérium révén megtalálható az emésztő rendszerben, számos kedvező hatása van az emberi szervezetre. Antimikrobiális anyagokat képez, ami gátolja a patogén mikrobák elszaporodását (Vanderhoof és munkatársai, 1999). Csökkenti az irritális bél szindróma (IBS) gyakoriságát (Lin és munkatársai, 2009).

Kutatások igazolták továbbá, hogy kedvező hatással van fogyasztása a női hüvely egészségi állapotára. A bélrendszer helyett inkább a hüvelyben telepszik meg ezzel is támogatja a női szerv egészségét (Reid, 1999). A hüvely falat kolonizálva meggátolja a patogének megtelepedését, ezáltal olyan fertőzések ellen is védelmet tud nyújtani, mint például a bakteriális vaginózis (Reid és munkatársai, 1995).

Lactiplantibacillus plantarum

Lactiplantibacillus nemzetség képviselője, pálcika alakú, mezofil mikroba. Hőmérsékleti optimuma 30-35 °C között található. Fermentációs mechanizmusa fakultatív heterofermentatív. Joghurtok mellett sajtok érleléséhez használják fel, vagy más starterekkel kombinálva sós lében pácolt sajtok (pl. Feta) előállítására szeretik alkalmazni.

Napjainkban egyre népszerűbbé válnak a tejalapú készítmények mellett a növényi tejhelyettesítők, illetve abból készült fermentált termékek. Kifejezetten vegán készítmények fermentálására ajánlják a *L. plantarumot*, mivel megfelelő stabilitást és állagot biztosít a készterméknek, illetve, könnyebb egy olyan starter kultúrával dolgozni, amelynek a szaporodására a növényi alapú tápközegek kedvezőbb hatással bírnak (Inayah és munkatársai, 2022).

Bifidobacterium nemzetség

Kezdetben a *Bifidobaktériumok*-at a *Lactobacillus* nemzetségbe sorolták, majd a XX. század vége felé már külön nemzetséggént jellemezte a taxonómia. Jelenleg 30 *Bifidobaktérium* fajt ismertünk, ebből 6-ot használnak a tejiparban (*Bifidobacterium adolescentis*, -*breve*, -*bijidiim*, -*infantis*, -*lactis*, és -*longum*).

Bifidobaktériumok-ról elmondható, hogy anaerob heterofermentatív, nem spóráképző mikrobák. Morfológia szerint a nemzetségen belül változatos szerkezetek jellemzőek. Előfordulnak a kokkoid alakú sejteken túl még, hosszú, elnyúlt, elhajló, egyes esetekben pedig

elágazó sejtek is. A sejtek egyesével is állhatnak vagy láncokban, illetve kisebb csoportokban, amelyek akár „V” vagy „X” alakot is felvehetnek (Turrerini és munkatársai, 2011).

A tejsavbaktériumokra általában jellemző fermentációs mechanizmusok a *Bifidobaktériumok* esetén, más útvonalon megy végbe. A fermentáláshoz felhasznált hexózokat átalakítva, fruktózfoszfát ketoláz enzim segítségével a *Bifidobaktériumok* az etanol vagy CO₂ képzés helyett, kb. 3:2 arányban képeznek ecetsavat és tejsavat.

Szaporodásuk a 37-41 °C között optimális, és még elmondható róluk, hogy a *Lactobacillusokkal* szemben a *Bifidobaktériumok* kevésbé bírják a savas pH-t, 4,5 alatt megáll a szaporodásuk (Poupard és munkatársai, 1973).

3.2 Mikrobák jellemzésének lehetőségei

A mikrobák vizsgálati módszerei fenó- és genotípus vizsgálatokon alapulhatnak. Az általános mikrobiológiai vizsgálati módszerek fenotípusos tulajdonságokra épülnek. Ezek a jellemzők a mikroorganizmus megjelenő tulajdonságaira utalnak pl.: alakjuk, morfológiájuk, oxigén igényük, Gram-festődő tulajdonságuk stb.

A tudomány fejlődésével, szert tettünk új információkra, a fajok genetikai felépítéséről. Genotípus alatt az örökítő anyagon-, DNS-en alapuló tulajdonságok értjük. A genotípus a DNS szekvencia által meghatározott, így a környezeti hatásokra nem változik, ezzel szemben a fenotípus, vagyis megjelenő jellemző vagy tulajdonság változhat, alkalmazkodhat a környezeti hatásokhoz. A genotípus alapú vizsgálatokhoz tartozik pl.: a genom méretének, összetételének vizsgálata, amely a PCR, RFLP technikákon alapuló eljárások.

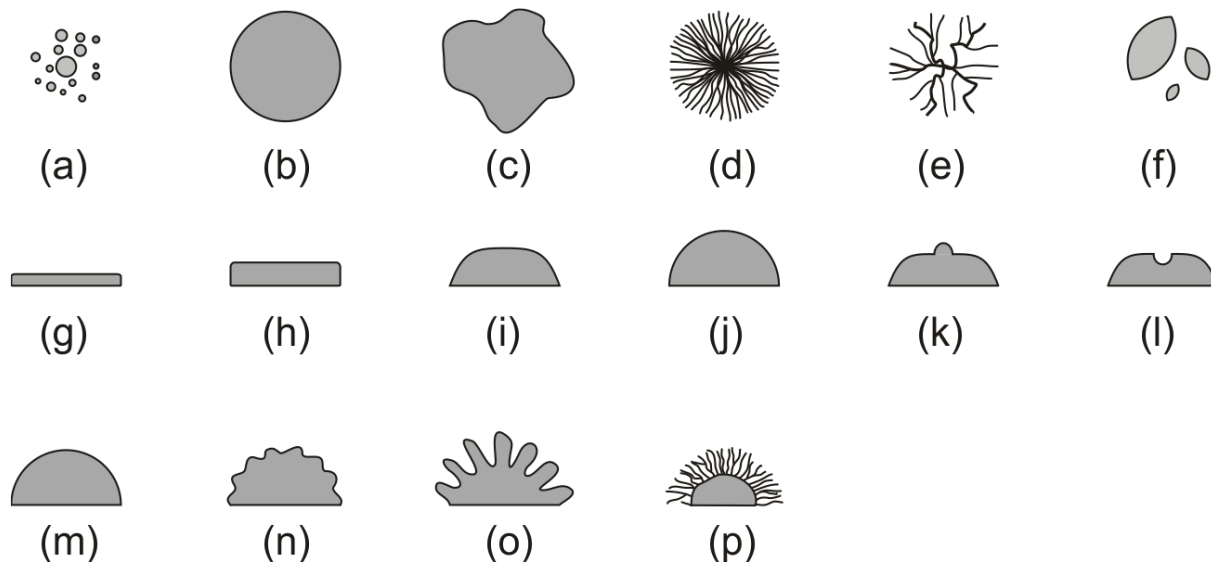
3.2.1 Telepmorfológiai vizsgálatok

A morfológiai megkülönböztetés alapja a sejtek tápagar felületén telepekbe rendeződése, és annak küllemi jellemzői. A telep, más néven kolónia, egyetlen sejtől felszaporodó sejtömeg a táptalaj felszínén vagy belsejében. A sejtömeget alkotó sejtek általában valamilyen kapcsolatban állnak egymással. A különböző fajok kolónia képzés során különböző külső megjelenést vesznek fel, ezáltal is megkülönböztethetők (Tóth és munkatársai, 2018). A makroszkópos morfológia mellett elengedhetetlen a mikroszkóppal megfigyelhető alaktani jellemzők, a mikromorfológia vizsgálata.

A telepalak lehet pontszerű, kör alakú, szabálytalan, fonalszerű, rizoid, orsó alakú. A telep felszíne, kiemelkedése szerint megkülönböztetünk lapos, lapos kiemelkedő, domború,

feldomborodó, csúcsos, bemélyedő kolóniákat. Szegély szerint a telep lehet ép, hullámos, karélyos, fonalas (Tóth és munkatársai, 2018).

1. ábra. Mikróbák morfológiája, forrás: (Tóth és munkatársai, 2018).



3.2.2 Sejtmorfológiai vizsgálatok mikroszkóppal

A mikroszkóp egy látószög növelő optikai berendezés, amelyet a mikrobiológiában rendszeresen használnak mikroorganizmusok jellemzésére. A mikroorganizmusok szabad szemmel nem lennének láthatóak, nagyságuk 0,8-5 μm terjedhet ki, emiatt szükséges a nagyításuk az emberi szem számára.

A legelső és legelterjedtebb mikroszkóp típus a fénymikroszkóp, aminek kifejlesztése Antonie van Leeuwenhoek nevéhez köthető, aki a 17. században élt. Bár első prototípusa közel sem hasonlított a manapság használt mikroszkóp modellekhez, mivel csak egy lencséből állt, azóta sokat fejlődött a mikroszkópok teljesítménye és felépítése (Deák és munkatársai, 2006).

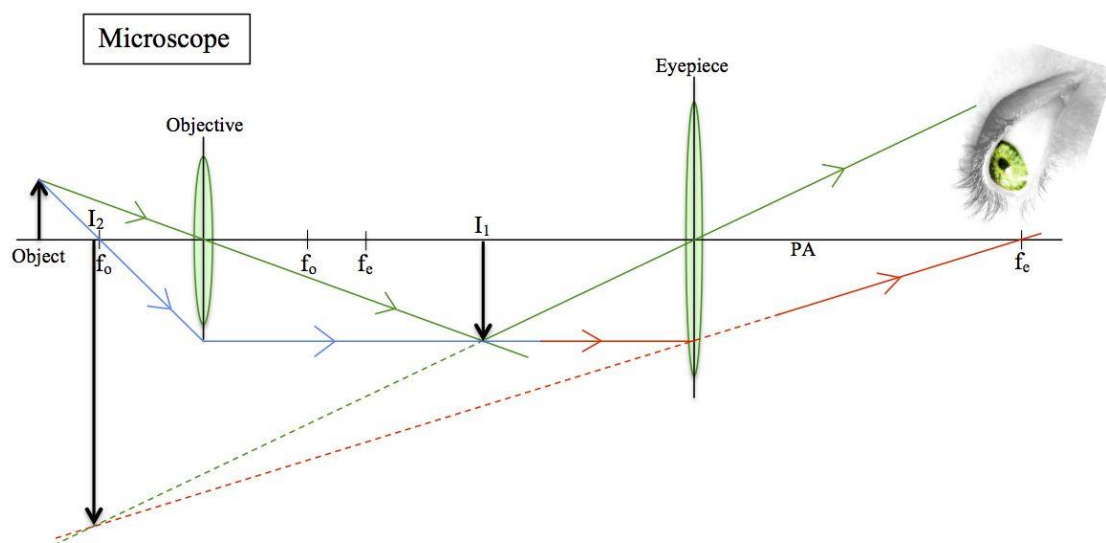
A fénymikroszkópok két fő lencséből állnak, az objektívól és az okulárból, ezáltal egy lencserendszert alkotnak. Az okulárba nézünk bele közvetlenül, egy nagyító és egy gyűjtőlencséből áll, hogy jobban összegyűjtse a szemünkre a fényforrásból származó fényt, további 10-szeres nagyításra képes. Az objektív egy összetett lencserendszer már önmaga, az okulár és a kondenzor között helyezkedik el, pontosan a tárgylemez és a nézendő mikroorganizmus fölött. Fő feladata, hogy amely fénysugarak áthatolnak a tárgylemezen és visszaverődnek, azokat a fénysugarakat illetve a keletkezett képet tovább juttassa az okulárba. Az objektív különböző nagyítási fokú lencségei határozzák meg főleg, hogy mekkora nagyításban láthassuk a keletkezett képet, ez lehet 4x, 10x, 40x és 100x-os.

A világító berendezés részét képezi a fényforrás és a kondenzor. A kondenzor szintén egy gyűjtőlencserendszer, melynek feladata, hogy a fényforrásból juttatott fényt fókuszálja a tárgyasztalon lévő tárgylemezre, és a rajta található vizsgálandó anyagra.

Az okulárt és az objektívet a tubus köti össze, amely 30-45 °-os döntött pozícióban szokott lenni. A mikroszkóp egész szerkezetét az állvány és talpazat tartja stabilan. Az állvánnyal van összeköttetésben vízszintesen a tárgyasztal, ahova csiptetőkkal stabilizálva behelyezhető a vizsgálatokhoz a tárgylemez. A tárgylemez elhelyezkedését különböző mozgató csavarokkal lehet irányítani, illetve a keletkezett kép élességét is beállítani.

A fénymikroszkóp összetett lencserendszere által nagyított, egyenes állású, virtuális képet kapunk, amelyet a 2. ábra szemléltet. Célja, hogy az emberi szem korlátolt látószögét növelje. A mintán áthaladó fény egy része egyenesen áthalad a mintán, ezt direkt fénynek nevezzük, viszont a mintán áthaladó fény nagy része megtörik, ezeket diffraktált sugaraknak nevezzük,

2. ábra A fénymikroszkóp működési elve (Forrás: <http2>)



amelyek a direkt sugarakhoz képest fáziseltolódással jelennek meg. Ahogy a gyűjtőlencse ezeket a sugarakat egy síkba rendezi, egyes sugarak kioltják egymást, elkülönülnek sötét és világos zónák, ezáltal kirajzolódik számunkra a kép. A megalkotott kép minősége függ a mikroszkóp felbontóképességétől. A felbontóképesség megmondja, hogy mi a legkisebb távolság két pont között, amelyeket még két külön pontnak tudunk észlelni. A felbontóképességre hatással van a numerikus aspektúra, amivel jellemezhető, hogy az objektív mennyire sikeresen fogja be a különböző irányba szóródó fénysugarakat. Növelhető a numerikus aspektúra, ha növeljük a tárgylemez és az okulár közti tér törésmutatóját. A nagyobb törésmutatójú térben a fény kisebb szögben törik meg, ezáltal a tárgylencse gyűjtőlencségi is

nagyobb hatásfokkal tudják összegyűjteni a fénysugarakat. A törésmutató növelhető, ha a tárgylemez és objektív közötti részbe immerziós olajat helyezünk (Davidson és Abramowitz, 2002).

3.2.3 Molekuláris biológiai módszerek

A molekuláris módszerek alapja a genotípus meghatározása. A fenotípus, mint ahogy arról már volt szó, könnyen változik, mivel az élő szervezetek képesek a környezet bármely változásához alkalmazkodni, amelynek következtében a fenotípus is átalakulhat. Emiatt a fenotípus alapú diagnosztika és identifikálás esetén standardizálni szükséges a vizsgálati körülményeket. Ezzel ellentétben a genotípus alapú vizsgálatoknál nincs szükség ezen előzetes beállításokra, mivel a genotípus nem változik meg ilyen könnyen. Változás valamilyen mutáció vagy rekombináció következtében léphet fel. (Deák és munkatársai, 2006)

A molekuláris vizsgálatok során általában csak egy gén részletet, vagy a nukleinsav szekvencia egy részletet vizsgálják. Ennek kiválasztása az adott egyed fenotípusos jellemzői alapján történik.

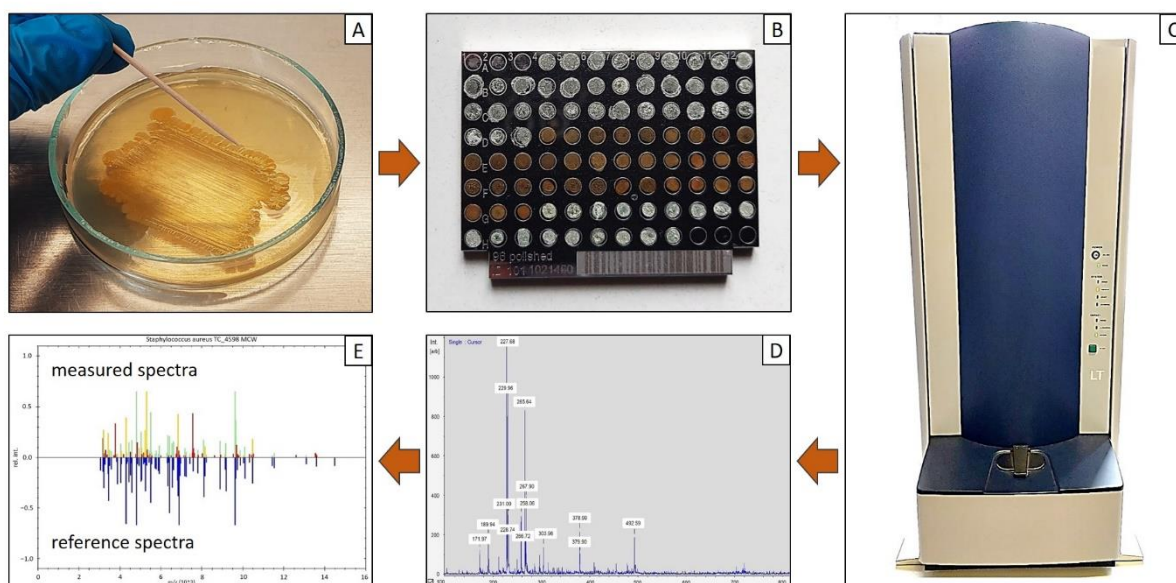
A molekuláris diagnosztika három féle módszeren alapszik, ahol a sejtekből kivont DNS-t vizsgálják, restrikciós enzimes hasítás után (RFLP: restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) vagy próbák alkalmazásával, hibridizációs technikával (pl. FISH: fluorescens in situ hibridizáció), vagy PCR (polimeráz láncreakció) alapú vizsgálatokkal.

3.2.4 Mikroorganizmus identifikálása MALDI-TOF MS alkalmazásával

A MALDI-TOF MS, angolul „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight mass spectrometry” három különböző vizsgálati területet összefogva mikroorganizmusok azonosítására alkalmas módszer. A vizsgálati művelet első szakaszán a minták mátrix asszisztált lézer deszorpciós ionizáción esnek át (MALDI). A mintákra mátrix oldatot felkenve, majd ionizációs sugarat átengedve rajtuk, a mátrix képes elnyelni a sugárzás energiáját, és a mintából a makromolekulák felszabadulnak a mátrixal komplexet képezve. Vákuumot működtetve a berendezésben a komplexből kiszakadó makrokomponenseket eljuttatja a rendszer a tömeganalizátorba (detektor). Az analizátorig való eljutási időt – „repülési időt” (TOF – time of flight) mérve határozza meg a vizsgált molekulákat. A repülési idő arányos a molekula méretével, minél kisebb a molekula, annál rövidebb idő alatt jut el a detektorhoz. A vizsgálatához hozzátartozik még tömegspektrometria is (MS), aminek a funkciója az, hogy a sugárzásos vizsgálat alatt felküldött atomokat és molekulákat tömegspektrumuk (töltésegységre

eső tömegük (m/z) alapján szétválasszon. Az eredmények alapján, a keletkező tömegspektrum egyes csúcsai, különböző fehérjéknek felelnek meg a mintában. A mintában azonosított riboszomális (genetikailag kódolt) fehérjék csúcsoklistájának lehetővé teszi a mikrobák faj szinten történő azonosítását (Nagy és munkatársai, 2014). A folyamat során a minta tömegspektrumát referencia mintákat tartalmazó könyvtári adatbázissal vetjük össze (3. ábra) (Akimowicz és Bucka-Kolendo, 2020).

3. ábra A MALDI-TOF MS készülék, és a vizsgálat lépéseinek bemutatása (Haider és munkatársai, 2023)

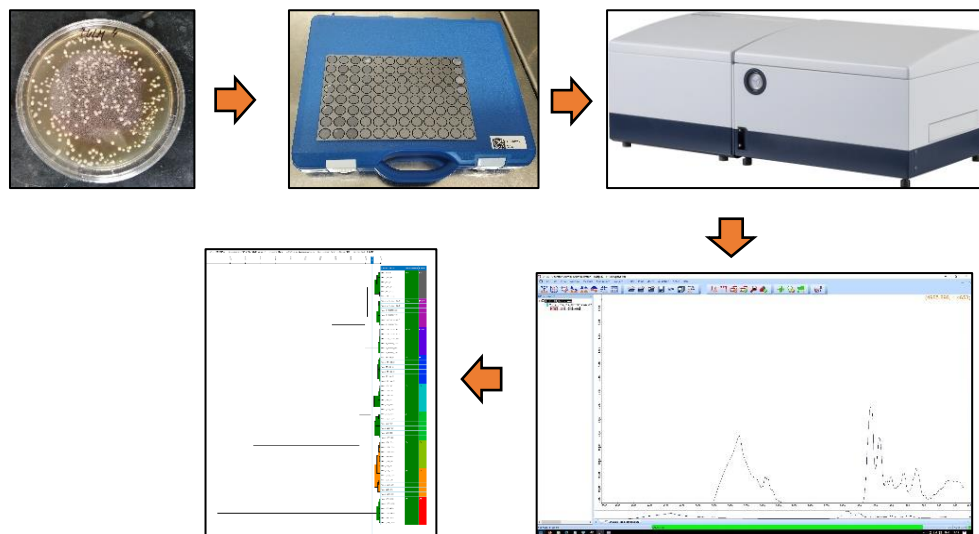


A biológiai minták vizsgálatán túl a MALDI-TOF mára az ipari minőségbiztonság legkülönbözőbb területein alkalmazott technológia (Nagy, 2009).

3.2.5 Mikroorganizmus tipizálása FT-IR spektroszkópia alkalmazásával

Az Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR spektroszkópia), egy fény abszorpción alapuló spektrofotometriás eljárás. A készülék infravörös sugárzást bocsájt ki az előkészített mintára, amiből a mintában lévő vegyületek részecskéi rezgésbe kerülnek és egy magasabb energiaszintre lépnek. A különböző részecskék más-más hullámhossz tartományban nyelik el az infravörös fényt, ezáltal különböző spektrális csúcsokban mutatkozik meg az eltérés. Az adott minta spektrális csúcsait befolyásolja a minta nukleinsav, fehérje, szénhidrát és lipid összetétele. A technikával ezáltal lehetőség nyílik a mikrobák faj szint alatti különbségeinek feltárására (tipizálás) (Novais és munkatársai, 2019). A mintaelőkészítés és feldolgozás lépési, nagyon hasonlóak a MALDI-TOF alkalmazásához (4. ábra).

4. ábra Az FT-IR készülék, és a vizsgálat lépéseinek bemutatása (saját kép)



3.2.6 Szerológiai módszerek

A szerológia vizsgálatok a sejtek immunválaszáján alapulnak. A mikróbasejteken megtalálható antigének ellenanyag, antitest termelésére készítetik a gazdaszervezetet. Az ellenanyag termelést kiváltó vegyületek megjelenhetnek a sejtek felszínén, mint marker vegyületek. Lehet ez a tokanyag, vagy a sejtfelszínen lévő szénhidrátok esetleg fehérjék, extracellurális enzimek, toxinok. Lehetséges, hogy a sejtek belsejében helyezkednek el az antigének, és a sejtek szétesése után kerülnek ki a környezetbe (Deák és munkatársai, 2006).

Szerológiai vizsgálatok egyik fajtája, az agglutináció, ahol teljes sejtek vagy nagyobb sejtrészek antigénjének megfelelő ellenanyag hozzáadását követően kicsapódás jelenik meg. A vizsgálatok leggyakoribb formája a tárgylemez-agglutináció, de az ELISA (enzimhez kötött immunszorbens tesztek) szintén kiváló vizsgálat egyes antigének kimutatására (Deák és munkatársai, 2006). Az ELISA módszer előnye, hogy rövid idő alatt eredményt szerzünk vele (1-3 óra). Használhatják patogének, illetve aflatoxin kimutatására és mennyiségi meghatározására. (Leszczynka és munkatársai, 2018)

3.2.7 Élettani vizsgálati módszerek

Élettani vizsgálati módszernek számít minden olyan vizsgálat a mikroorganizmusok esetében, amely a szaporodásukkal, anyagcsere folyamatukkal összefügg, ami hozzájárul

ahhoz, hogy faji szinten azonosítani, törzsi szinten tipizálni lehessen az adott mikróbákat. Megkülönböztethető a fajok pH-, hőmérséklet tűrési tartományuk, vízaktivitás és oxigén igényük-, illetve a gátlószerekre adott reakciójuk alapján. (Deák és munkatársai, 2006). Minden mikroorganizmus számára van egy tűrési tartomány, amelyen belül szaporodásra és életműködés folytatására képes.

A fajon belül, a törzsek között jelentős különbségeket lehetnek a gátlószerekkel szembeni érzékenységekben, így ennek vizsgálatára alkalmas a törzsek tipizálása. Gátlószereknek számítanak a tartósítószer, antibiotikumok, vagy olyan anyagok is, amelyek pl. a vízaktivitást csökkentve fejtik ki hatásuk, ezáltal csökkentve a mikróbák túlélési vagy szaporodási esélyeit. Vízaktivitás csökkentő anyagok pl. só vagy cukor. A különböző fajokra eltérő só-, cukor- vagy tartósítószer tűrés jellemző. Antibiotikumok esetén ismertek szűk és tág hatásspektrumú vegyületek. Az antibiotikumok hatásmechanizmusuk szerint lehetnek baktericidok (baktérium ölő) vagy bakteriosztatikus (szaporodás gátló) hatásmechanizmusúak lehetnek.

3.3 Antibiotikum rezisztencia megjelenése az élelmiszeriparban

3.3.1 Antibiotikum rezisztencia kialakulása és kockázatai

Az antibiotikum rezisztencia a 21. századra egyre nagyobb problémává nőtte ki magát, mivel a gyakori felhasználás következtében, megnövekedett az antibiotikumra ellenálló mikróbák száma. Az antibiotikumrezisztens kórokozók terjedése rendkívüli problémát okoz mind a humán, mind pedig az állategészségügynek (Daneman és munkatársai, 2006).

Az élelmiszeriparba több úton kerülhet antibiotikum, amely rezisztencia kialakulásának kockázatát hordozza. Elsősorban állati termékek (hús, tej, tojás) révén juthat antibiotikumrezisztens baktérium a feldolgozási láncba, mivel az állatokat szükséges antibiotikummal kezelni baktérium okozta betegség fennállása esetén. Addig nem vágható és dolgozható fel élőállat, illetve termékei, amíg az antibiotikum behatási ideje le nem jár. Mégis gyakori, hogy az állat elpusztulása vagy trágyája által a talajvízbe illetve szennyvizekbe kerülnek antibiotikum maradványok, amelyek rezisztens törzsek megjelenéséhez vezetnek. Szennyezett vízzel történő öntözések során pedig már a termőföldekre is kijuthatnak a rezisztencia gént hordozó törzsek, amik a terményen keresztül bejutnak a táplálék láncba. Emiatt indult a „One Health” nevű kezdeményezés annak elősegítésére, hogy megállítsák a multirezisztens kórokozó mikroba törzsek terjedését, és elkerülhető legyen a 2050-re várható általuk okozott betegségek miatti magas halálozási arány. A program célja, hogy 2030-ra 50%-al visszafogja a világ az antibiotikumok felhasználását (Branduse és Földi, 2022).

A patogén mikrobákhoz hasonlóan starter kultúraként felhasznált probiotikus mikrobák is képesek rezisztenciát kialakítani. Ez lehet eredendően a törzsre jellemző rezisztencia, vagy szerzett. Az előbbi természetes rezisztenciának nevezik, mivel ez az adott probiotikus mikróba törzsre jellemző tulajdonság, ami a genomban van kódolva. Ez alapvetően nem jelent problémát, mivel ezek a tulajdonságok nem vihetők át, nem adhatók át más törzseknek. A nagyobb problémát a szerzett rezisztencia okozza, mivel általa egy korábban adott antibiotikumra nem érzékeny törzs rezisztenssé válik az adott szerre. A jelenség kialakulhat mutáció, vagy horizontális géntranszfer révén. Mutáció esetén szintén úgy alakul át a tulajdonság, hogy az nem továbbadható, míg horizontális géntranszfer esetében minden esetben továbbadható a rezisztencia. A horizontális géntranszfernek három fajtája van, a transzformáció, konjugáció és transzdukción. Konjugáció esetén szükséges ehhez, hogy a baktérium sejtek érintkezzenek egymással, és hogy piluson keresztül átadódjon a gén. Transzformáció során pedig lehetséges, hogy a sejtekből a külső környezetbe jut a rezisztencia kialakításáért felelős gén, más sejtek azt felveszik, és a saját örökítőanyagukba építik be. (Szulczer-Balog és munkatársai, 2022).

Mindemellett elmondható, hogy kereskedelmi forgalomba csak olyan tejsavbaktérium törzsek hozhatók probiotikus starter kultúraként, takarmány-adalékként illetve probiotikumként, amelyek esetében ellenőrizve van, hogy szerzett antibiotikum rezisztencia génje nincsen, legfeljebb csak az adott törzsre jellemző természetes, „belső” rezisztencia, ezzel is elkerülve az újabb ellenálló törzsek kialakulását (Szulczer-Balog és munkatársai, 2022).

3.3.2 A vizsgálatba bevont antibiotikumok jellemzése

A penicillin az aminosav-származékok közé tartozó béta-laktám antibiotikum. A hatásmechanizmusa szerint, a sejtfallszintézis gátló antibiotikumok közé tartozik. Szerkezete miatt a transzpeptidáz enzim szubsztrátként ismeri fel, mivel a peptidoglikán peptid oldalláncában jelenlévő D-Ala-D-Ala strukturális analógja. A transzpeptidáz enzim irreverzibilisen kötődik a penicillinhez, ezáltal az enzim inaktiválódik, így és ezáltal gátolja sejtfallal további szintézisét, valamint abnormális sejthalakok jönnek létre. A sejtfallal meggyengül és a baktériumsejt szétesik (Pécs, 2023). Gram pozitív baktériumok ellen hatásos. A penicillin és más béta-laktám antibiotikumok ellen fokozatosan egyre több baktérium faj jelent meg, amelyek rezisztensek, például *Streptococcus pneumoniae* (Mazel and Davies, 1999). A kulcs amely a rezisztencia megjelenéséhez vezet, az ezen mikrobák béta-laktamáz enzim termelésében rejlik (Uddin és munkatársai, 2021).

Az oxacillin egy félszintetikus, penicillinek csoportjába tartozó béta-laktám antibiotikum. Hatásmechanizmusa hasonló a penicillinéhez. A penicillinnel szemben előnye, hogy a *Staphylococcus*ok által termelt béta-laktamáznak ellenáll (Papich, 2016).

A clindamycin a linkomazinokhoz tartozó fehérjeszintézis gátló antibiotikum. Az 50S riboszóma alegységhez kötődve gátolja a peptidkötések kialakulását, így a fehérjeszintézist. A sejtekben lévő 23S RNS mutációja során képesek a sejtek rezisztenciát szerezni az antibiotikum ellen (Murphy és munkatársai, 2024). Gram pozitív kokkuszok, illetve Gram pozitív vagy negatív anaerob mikrobák ellen egyaránt hatásos (Smieja, 1998).

A tetracycline egy, a kinonok csoportjába tartozó, fehérjeszintézis gátló antibiotikum. A 30S riboszóma alegységhez kötődve gátolja a tRNS-ek megkötődését, ezáltal blokkolva a fehérjeszintézist (Grossman, 2016). Széles spektrumú antibiotikum, hatásos Gram pozitív, Gram negatív baktériumok, köztük a klamidiák, rikettiák és a protozoonok ellen is (Daghrir and Drogui, 2013).

4. Anyagok és módszerek

4.1 Anyagok

4.1.1 Vizsgálatba bevont joghurtok

A kutatásomban 18 db kereskedelmi forgalomból beszerezhető joghurt terméket vizsgáltam. Találhatók közöttük hagyományos tehéntej-, kecsketej-, illetve növényi alapú vegán termékek is. A vegán termékek széles palettáján a különböző növényi alapú fermentált termékeket kerestem úgymint kókusz, szója és mandula alapú termékek. A joghurtok közül feldolgoztam natúr illetve ízesített változatokat. A termékek jellemzőit az 2. táblázat foglalja össze.

A minták jelölését a márkák kezdőbetűjével különböztettem meg, illetve mikrobák izolálása során, ha egy termékből több mikrobát izoláltam azokat a rövidítések után sorszámokkal jelöltem pl. N1, N2, N3.

2. táblázat A kutatáshoz felhasznált kereskedelmi forgalomba kapható joghurtok. (Forrás: saját adat)

<i>Rövidítés</i>	<i>Név</i>	<i>Gyártó</i>	<i>Típus</i>	<i>Alapanyag - tej</i>	<i>Mentesség</i>
N	réteges krémjoghurt	Nádudvari Élelmiszer Kft.	gyümölcsös	tehén	nincs
JBL	Jogobella light	Zott	gyümölcsös	tehén	nincs
JB0	Jogobella 0%	Zott	gyümölcsös	tehén	hozzáadott cukormentes
MA	Magyar joghurt	Alföldi tej	natúr	tehén	nincs
C	natúr joghurt	Cserpes Sajtműhely	natúr	tehén	nincs
MILM	laktómentes natúr joghurt	Mizo	natúr	tehén	laktózmentes
T	Tarka görög joghurt	Naszálytej	gyümölcsös	tehén	laktózmentes
ZB	Zöldfarm bio joghurt	Naszálytej	natúr	tehén	nincs
MI	natúr joghurt	Mizo	natúr	tehén	nincs
D	natúr joghurt	Danone	natúr	tehén	nincs
Z	natúr joghurt	Zott	natúr	tehén	nincs
G	Greek natúr joghurt	Bakoma	natúr	tehén	nincs
H	Havasi joghurt	Ízes Erdély	natúr	tehén	nincs
K	kecskejoghurt	Tebike	natúr	kecske	nincs
ZK	Pure joy kókusztej alapú fermentált termék	Zott	natúr	növényi	vegán, hozzáadott cukormentes
JS	Joghurtkultúrával fermentált szójaspecialitás	Joya	natúr	növényi	cukormentes, vegán
A	fermentált szójakészítmény	Alpro	gyümölcsös	növényi	vegán, hozzáadott cukormentes
MM	fermentált mandulagurt	Mylove-mylife	gyümölcsös	növényi	vegán

Állati eredetű termékek

Állati eredetű termékek közül tehén- illetve kecsketejből készül joghurtokat vizsgáltam. A termékeket úgy választottam ki, hogy széles körben elérhetők legyenek és a gyártók alapján ismertebbek.

Natúr íz terén Mizo (MI), laktózmentes Mizo (MILM), Naszálytej Zöldfarm Bio joghurt (ZB), Zott (Z), Greek görög joghurt (G), illetve Tebike gyártó kecskejoghurtból sikerült tejsavbaktériumok izolálnom. További négy joghurt márka termékeiből nem sikerült élő törzseket izolálni.

Ízesített termékek esetében főleg hozzáadott gyümölcs tartalmú termékeket vizsgáltam, ezek között 0% hozzáadott cukor-, alacsony zsírtartalom-, és laktózmentes termék is található. Vizsgálatba vont termékek közül 2 db Zott gyártótól származó Jogobella; „light” (JBL), és 0% hozzáadott cukortartalmú (JB0) termékek. Megtalálható volt még a Naszálytejtől, a Tarka almás-fahéjas kiszerelésű laktózmentes görög joghurt (T), valamint a Nádudvari áfonyás ízesítésű réteges joghurt (N).

Növényi eredetű termékek

Növényi alapú termékek közül 4 féle terméket vizsgáltam, szintén figyelembe véve, hogy kereskedelmi forgalomban fellelhetők legyenek, illetve a termék paletta rendezése során törekedtem különböző növényi alapanyagú fermentált termékeket összegyűjteni.

A vizsgált minták között megtalálható volt a Zott márka egyik vegán, kókusztej alapú terméke (ZK), két féle szója alapú termék, Joya natúr (JS), illetve az Alpro gyümölcsös változata (A). Különlegességgént még felhasználtam egy mandula alapú terméket is, a Mylove-mylife gyártótól (MM).

4.1.2 Tejsavbaktériumok tenyésztéséhez felhasznált tápközeg bemutatása

A tejsavbaktériumok tenyésztéséhez a VWR International Kft. MRS broth (84613.0500) táptalajt használtam, amely tejsavbaktériumok felszaporításához széles körben alkalmazott tápközeg. Összetételét tekintve (1000g táplevesre kivetítve): 10 g enzimatikus kazein, 5 g élesztőkivonat, 10 g húskivonat, 20 g D-glükóz, 1,08 g TWEEN-80, 5 g nátrium-acetát, 2 g ammónium-citrát, 0,2 g magnézium-szulfát, 0,05 g mangán-szulfát, 2 g dikálium-hidrogénfoszfát.

4.2 Vizsgálati módszerek

4.2.1 Tejsavbaktériumok izolálásának módszertana

Az előkészítések során mindig 500 ml MRS táptalajt készítettem elő egy főzőüvegben. A félkész MRS porból minden üvegbe bemértem 27,6 g tápközeget, majd a közeg megszilárdítása érdekében további 7,5 g agart (BioLab, BAA11000) adtam hozzá. Ezt követően felöntöttem 500 ml desztillált vízzel, majd autoklávoztam a szuszpenziót.

A hígítófolyadéknak, peptonvizet használtam, 1 g por állagú peptont, 8,5 g NaCl-ot oldottam fel 1000 ml desztillált vízben. A hígítófolyadékot 9 ml mennyiségekben kémcsövekbe kiadagoltam, ledugaszolta, majd autoklávban steriliztem.

A joghurt minták feldolgozása során első lépésként stochmaker-zacskókba aseptikus módon mértem ki 1:9 arányban joghurt mintát és a hígító folyadékot, majd homogenizáltam a mintáinkat. A törzsoldatból ezután tizedelő hígítási sort készítettem, hogy minták aktuális élő mikróbaszámát meghatározhasam.

Az utolsó 3 hígítási tagból felületi szélesztést végeztem. A leoltott petricsészéket anaerob környezetben inkubáltam, az anaerob környezetet anerosztátban gyertyával biztosítottam. A petri-csészéket 48 órára 37 °C-os termoszba helyeztem. 48 óra után telepszámlálást végeztem, és meghatároztam a termékekben található mikróbaszámokat, a hígítási fokok figyelembevételével.

A joghurt kultúrákat alkotó mikroba törzsek szétválasztásához, MRS táplevest készítettem, amelyből 1,9 ml-eket mértem ki pipettával steril krio csövekbe.

A táptalajon kinőtt eltérő morfológiájú telepekből steril fogvájó segítségével mintát vettem, (egy-egy petricsészéből több különböző telepből vettem mintát, általában 3-5 darabot), majd a fogvájót az inokulummal együtt egy-egy táplevessel feltöltött Eppendorf csőbe helyeztem. Ezután a felcímkézett csöveket a fentiekben leírt módon anaerob környezetben inkubáltam.

Az inkubálást követően a sejteket 25 °C –on $12000 \frac{1}{perc}$ fordulatszámon 10 percig centrifugáltam a sejteket ülepítés céljából. A centrifugálás után aseptikus körülmények között, pipetta segítségével óvatosan leszívtam az MRS táplevest. A csövekben maradt sejteket ezután azonosítás, és tipizálás céljából preparáltam a MALDI-TOF és FT-IR vizsgálatokhoz.

4.2.2 Izolátumok azonosítása MALDI-TOF MS használatával

Az izolátumok MALDI-TOF MS-el történő azonosításához az MRS táplevesben, 37 °C-on 48 órán át anaerob körülmények között inkubált Eppendorf csöveket lecentrifugáltam (12000 rpm, 10 perc). A csövekben lévő sejtszuszpenzióból 1 µl mennyiséget a MALDI-TOF tárgylemezre helyezte. A tárgylemezre felvitt mintákra a száradást követően 70%-os hangyasavat cseppentettem. Miután újra megszáradt a preparátum A-ciano-4-hidroxi-fahéjsav (HCCA) mátrixal lezártam. A preparált mintákból 2000-20000 Da közötti tartományban tömegspektrumokat készítettem. Ezután ezeket a Bruker mikroba fehérje-referencia könyvtár adatbázisával hasonlítottam össze.

4.2.3 Izolátumok tipizálása FT-IR használatával

A vizsgálathoz a BRUKER IR Biotyper készülékét használtam. Az Eppendorf csövekben lévő izolátumokhoz etanolt és desztillált vizet tettem, majd fel-le pipettáztam az Eppendorf csövön belül, hogy homogenizáljam az izolátumokat tartalmazó oldatokat. Majd 1 ml mennyiségeket pipettáztam a tárgylemezre.

Az izolátumokat három ismétlésben preparáltam a speciális tárgylemezre, majd a szuszpenziók megszáradását követően a preparátumok infravörös spektrumait a 1300 és 800 cm⁻¹ közötti hullámszám-tartományban vizsgáltam. Az így kapott eredményeken lineáris diszkriminanciaanalízist (LDA) végeztem, amelynek eredményei klaszterek formájában kerültek bemutatásra az Eredmények fejezetben.

4.2.4 Izolátumok antibiotikum érzékenységi vizsgálata

A tejsavbaktériumok későbbi antibiotikum érzékenységének vizsgálata céljából az izolátumokat -80 °C-on krio csövekben 10%-os glicerín oldatban tároltam. A 20 db izolátumot szobahőmérsékleten felolvasztottam, majd az automata pipettával 20 µl mennyiséget szélesztettem MRS tápagar felszínére, majd anaerob, 37 °C-os, 48-órás inkubálást követően, a kinőtt friss telepekből 0,3-0,4 McFarland közötti denzitású mikroba szuszpenziókat készítettem. A kémcsövekben így összeállított törzsoldatokból vortexelés után 1 ml mennyiséget szélesztettem szét a petricsészékbe kiöntött MRS táptalajok felszínén a csésze körkörös mozgatásával, majd a folyadékfelesleget pipettával leszívtam. Miután az agar felszíne megszáradt, a mikroba pázsitra antibiotikum korongokat helyeztem, és inkubáltam a petricsészéket 37 °C-on 48 órát. A kiértékelés során az antibiotikum korongok körül kialakult gátlási zónák átmérőjét vizsgáltam Andreevna (2022) és Patel és munkatársai (2015) módszere alapján. A vizsgált antibiotikumok a következők voltak: Penicillin (10 µg), Oxacillin (5 µg),

Clindamycin (10 µg) és Tetracyclin (30 µg). Az alkalmazott antibiotikumok kiválasztásának oka, hogy eltérő hatásmechanizmussal rendelkeznek, így a tejsavbaktériumokat tudtam vizsgálni sejtfal szintézis gátló (Oxacillin és Penicillin) és fehérjeszintézist gátló (Clindamycin és Tetracyclin) antibiotikumokra is.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1 Tejsavbaktériumok MRS táptalajon történő izolálásának eredményei

A kísérletben felhasznált 18 darab termékmintát, amit a kutatás során felhasználtam az 2. táblázatban kerültek bemutatásra.

A vizsgált joghurtok 10^4 - 10^6 hígításaiból kioltva tizenegy esetben izoláltam telepeket az MRS táptalaj felszínén. Egyes minták esetében csak egyféle morfológiájú telep volt jellemző (T, ZB, MM, ZK), míg más mintáknál (A G, JS, MILM és N) az egyes telepek morfológiai tulajdonságai különböztek (5. ábra). A telepmorfológiai jellemzők alapján összesen 47 izolátumot gyűjtöttem (3. táblázat).

Hét minta (JBL, JB0, MA, C, D, H, A) esetében sikertelen volt a tenyésztés, amelynek egyik oka lehetett, az alacsony élő mikrobaszáma a terméknek. Amennyiben a gyártó feltüntette a terméken, hogy „élőflórás” Magyar Élelmiszerkönyv tartalmazza, hogy fogyaszthatósági ideje végéig meg kell őriznie az élő mikroorganizmusok csiraszámának a 10^6 /g értéket (MÉ 1-3/19-1 előírás). Nem élőflórás, natúr vagy ízesített tej- és tejkészítmények a gyártás során, utóhőkezelésen esnek át, amivel a hosszabb eltarthatósági idő elérése a cél. Ennek érdekében az utóhőkezeléssel a romlást okozó mikrobák elpusztítása acél, de emellett a kultúrából származó mikrobák száma és aktivitása is nagy számban csökken. Ezen termékekre bizonyos mennyiségű élőcsíraszám megtartásáról szabály nem vonatkozik (MÉ 1-3/19-1 előírás).

Az MRS egy szabvány szerinti tápközeg a tejsavbaktériumokra, elsősorban a *Lactobacillus*ok kimutatására. A sikertelen tenyésztés oka lehet még, hogy a *Lactobacillus*ok alacsony száma mellett más tejsavbaktériumok pl. *Streptococcus*ok tenyésztésére a táptalaj kevésbé volt alkalmas.

5. ábra „MILM” jelölésű minta, tenyészetek három különböző telepének bemutatása. Piros színnel a legkisebb méretű, sárga a közepes nagyságú és kék színnel a harmadik féle telep bejelölése látható. (Forrás: saját kép)



3. táblázat Eltérő morfológiájú telepek száma (Forrás: saját adat)

Termékek jele	Izolátumok száma
N	4
JBL	0
JB0	0
MA	0
C	0
MILM	4
T	3
ZB	1
MI	5
D	0
Z	4
G	5
H	0
K	1
ZK	3
JS	5
A	0
MM	5
Izolátumok száma összesen:	40

5.2 Izolátumok MALDI-TOF MS-sel végzett azonosításának eredményei

A MALDI-TOF MS műszer alkalmasnak bizonyult a joghurtokban előforduló tejsavbaktériumok azonosítására. A starter kultúrák általában többféle faj keverékéből állnak, a MALDI-TOF által szolgáltatott eredmények alapján, sikeresen izoláltam és azonosítottam *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* fajokat (4. táblázat). Az izolátumok közül azonban hatot nem sikerült azonosítani (JBL, JB0, MA, C, D, A).

Eredményeim alapján a vizsgálat időpontjában egyes termékek tejsavbaktérium állományában, nagyszámban csak egyetlen faj volt jelen. A T, ZB illetve ZK jelölésű termékeknél nagyszámban volt kimutatható *Streptococcus salivarius_ssp_thermophilus*. Az MI, MILM és G jelölésű minták esetében több faj azonosítása is sikeresen megtörtént. Szakirodalomban ismert az élőflórás készítmények probiotikus hatása (Marco és munkatársai., 2017).

A tehéntej és növényi alapú termékeket összehasonlítva, nem találtam különbséget az izolált és azonosított fajok előfordulásában. Az egyik vegán termék esetében (JS) *Lactiplantibacillus plantarum* azonosítása is megtörtént. A termék gyümölcsös vagy natúr íze nem befolyásolja a *Lactiplantibacillus plantarum* kitenyésztődését. A MILM termékben *Lacticaseibacillus rhamnosus* vagy *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* fajok mellett is fellelhető volt, holott ezt a fajt inkább növényi alapú fermentált termékek készítéséhez használják fel, mivel jobb növekedést mutat növényi alapú tápközegben, de tejalapú fermentált termékekben is megállja a helyét (Horácková és munkatársai, 2022).

A gyártók különböző termékeinek izolátum azonosítási eredményei alapján, nem találtam érdemi különbséget a felhasznált starterfajok összetételében, kivéve, hogy a JS vegán termék ajánlásokhoz híven csak *Lactiplantibacillus plantarum*-ot tartalmaz. A MALDI-TOF azonosítás eredményei alapján előfordulhat, hogy ugyanazokba a fajokba tartozó, ám más-más törzsek lehetnek az eltérő alapanyagokból készített termékekben, hiszen *L. rhamnosus*-t sikeresen izoláltam gyümölcs-, natúr- és görög joghurtokból egyaránt.

A H termékből izolált és *Bacillus subtilis*ként azonosított törzs valószínűleg befertőződés eredménye. A K mintából sikeresen megtörtént a telepek izolálása ugyanakkor a MALDI-TOF módszerrel történő azonosítás nem szolgáltatott megbízható eredményt.

Az alaktani eredményeket összehasonlítva a MALDI-TOF eredményekkel a 3. táblázatban megtekinthetők. A MILM minta esetén a MALDI-TOF azonosítási eredmény alátámasztotta a különböző morfológiájú telepek közötti különbséget. Szintén azonos eredményt kaptam több

joghurt minta esetén, ahol egyféle telepmorfológiát találtam, ott a MALDI-TOF is ugyanazt a fajt azonosította, pl. T, ZK minták. Ezzel szemben a JS és N minták esetében a MALDI-TOF ugyanazt a fajt azonosította eltérő morfológiájú telepmorfológia esetén is. Erre az lehet a magyarázat, hogy egy fajon belül is lehet kisebb variabilitás a telepmorfológiában.

4. táblázat Tejsavbaktérium izolátumok MALDI-TOF MS-el történő azonosításának eredményei. Megbízhatósági értékek: magas 2.00-3.00 faj szinten azonosított izolátum; alacsony 1.77-1.99 nemzetség szinten azonosított izolátum.(Forrás: saját adat)

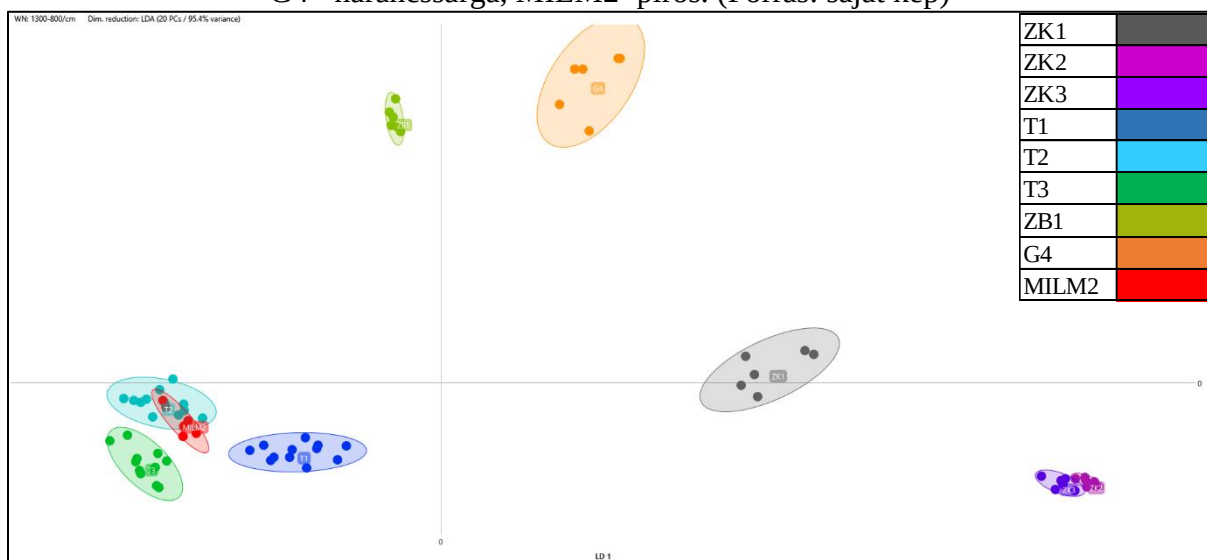
Minta helye	Minta neve	Organizmus-legjobb opció	Megbízhatósági érték
A1	ZK1	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	1,99
A2	ZK2	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	2,06
A3	ZK3	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	1,99
A4	T1	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	2,15
A5	T2	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	2,22
A6	T3	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	2,13
A7	T3	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	1,91
A8	ZB1	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	2,03
A9	Z1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2,21
A10	Z2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1,92
A11	Z3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2,24
A12	Z4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2,34
B1	N1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,82
B2	N2	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,94
B3	N3	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	2,04
B4	N4	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,87
B5	JS1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,18
B6	JS2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,35
B7	JS3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,22
B8	JS4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,20
B9	JS5	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,02
B10	G1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	2,00
B11	G2	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,82
B12	G3	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,84
C1	G4	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	2,28
C2	G5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2,44
C3	MILM1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,84
C4	MILM2	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	2,35
C5	MILM3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,12
C6	MILM4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,28
C7	MM1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,75
C8	MM2	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,85
C9	MM3	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,94
C10	MM4	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,84
C11	MM5	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,88
C12	MI1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,99
D1	MI2	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	2,00
D2	MI3	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1,93
D3	MI4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,10
D4	MI5	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,25

5.3 Izolátumok FT-IR-el elvégzett tipizálási eredményei

Az FT-IR abszorbancia adatok lineáris diszkriminancia analízissel (LDA) történő vizsgálatának értékei a 6-8-as ábrákon kerültek bemutatásra. A kétdimenziós koordináta-rendszerben ábrázolt halmazok egymástól való távolsága alapján sikeresen különböztettem meg a fajszenzen már MALDI-TOF-al azonosított izolátumokat, azok szénhidrát összetétele alapján (6-8 ábra).

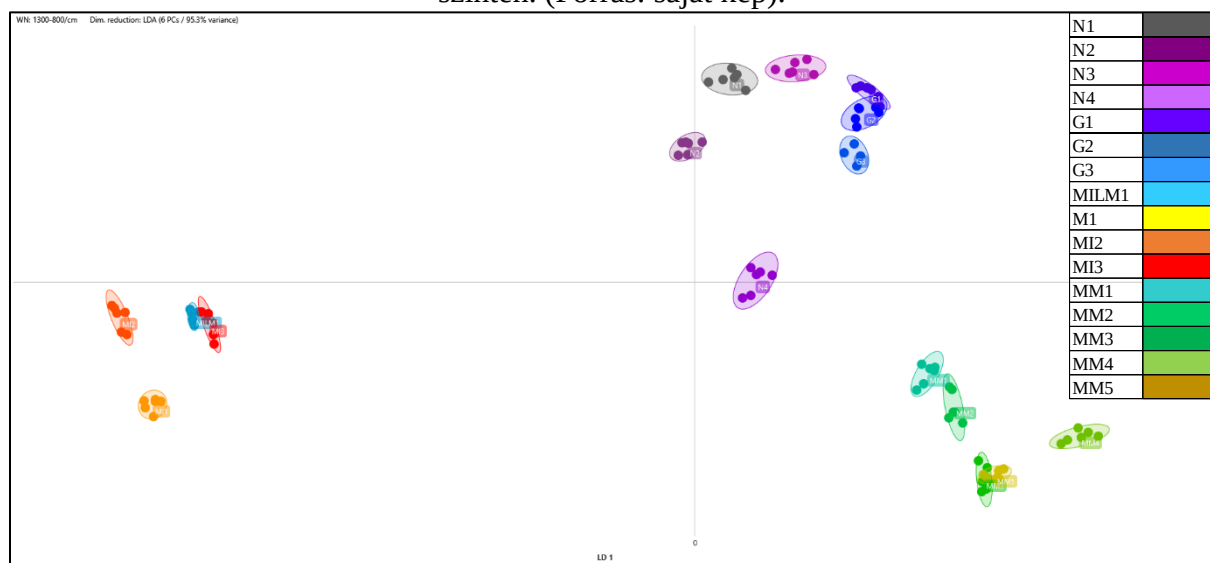
A *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* fajból összesen kilenc törzset izoláltam, melyek a ZK1, ZK2, ZK3, T1, T2, T3, ZB1, G4 és MILM2 (4. táblázat). Az öt különböző joghurtból izolált *Streptococcus salivarius* törzsek Fourier-transzformációs infravörös spektrométerrel vizsgált abszorbancia adatain elvégzett lineáris diszkriminancia analízis eredménye az 6. ábrán látható. Minél közelebb helyezkedik el egymáshoz két izolátum, annál szorosabb rokonságban állnak egymással a vizsgált törzsek. Minden izolátum esetében legalább három párhuzamos előkészítést és mérést követően, egy előfordulási zóna került feltüntetésre az izolátumok (pontok) körül. Ha az egyes zónák egymást átfedik, akkor a két minta ugyanabba a törzsbe tartozik. pl. ZK2 és ZK3; illetve MILM2 és T2 esetén. Ahol a zónák nem fedik egymást, ott szignifikáns különbség van az anyagcsere-termékekben (pl. T1, T2 és T3). Minél nagyobb a halmazok közötti távolság, annál jelentősebbek ezek a különbségek (pl. G4 és T1).

6. ábra LDA készítése a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* mikróbat izolált mintáknál 95,4%-os variancia szinten. Az egyes izolátumok színek kódolása a következő: ZK1= szürke, ZK2= ibolya, ZK3= lila, T1= sötét kék, T2= világos kék, T3= sötét zöld, ZB1= világos zöld, G4= narancssárga, MILM2=piros. (Forrás: saját kép)



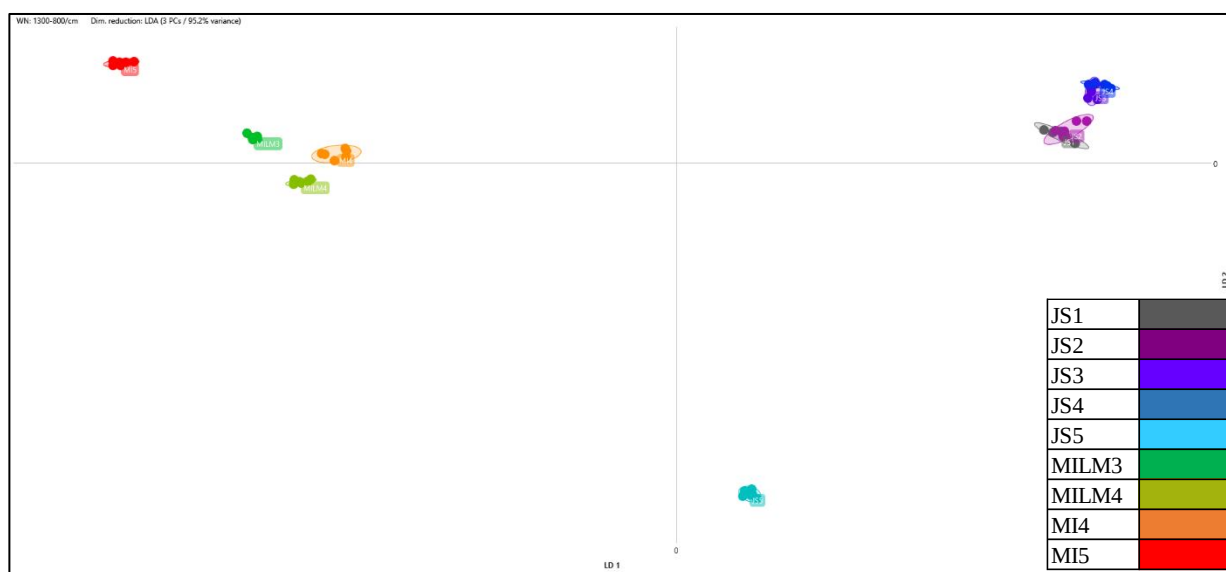
Sikeresen izoláltam a *Lacticaseibacillus rhamnosus* faj tizenhat törzsét: N1, N2, N3, N4, G1, G2, G3, MILM1, MI1, MI2, MI3, MM1, MM2, MM3, MM4 ÉS MM5 (4. táblázat). Az LDA analízis alapján, több különböző minta izolátumának zónája is átfedi egymás. Például az MM3 és MM5; G1 és G2; illetve MILM1 és MI3, MILM1 és MI3 minták esetében. Mivel a tipizálás eredményei elsősorban a gyártók termékcsoportjai alapján különülnek el, valószínűsíthető, hogy az előállítók a vizsgált termékeket azonos starterkultúrával fermentálják. (7. ábra).

7. ábra LDA vizsgálat a *Lacticaseibacillus rhamnosus* izolált mintáknál 95,3%-os variancia szinten. (Forrás: saját kép).



Lactiplantibacillus plantarum fajból kilenc törzs volt kimutatható. Az LDA elemzés alapján az izolátumok három fő klaszterre különíthetők el. Nagy a hasonlóság a JS1, JS2, JS3 és JS4 minták között, míg a JS5 különbözik. A harmadik klasztert a MILM3, MILM4, MI4 és MI5 minták alkották (8. ábra).

8. ábra *Lactiplantibacillus plantarum* fajt kimutatott minták LDA vizsgálata 95,2%-os variancia szinten. Egyes izolátumok színkódolása a következő: JS1= szürke, JS2= lila, JS3= kékes lila, JS4= sötétkék, JS5= világos kék, MILM3= zöld, MILM4= sárgás zöld, MI4= narancssárga, MI5= piros. (Forrás: saját kép)



5.4 Tejsavbaktérium törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálati eredményei

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatot 15 izolátummal végeztem el. Az izolátumokat úgy választottam ki, hogy az azonosított fajokat reprezentálják, és lehetőleg különböző termékekből származzanak. Ezeket a törzseket 4 féle antibiotikumra vizsgáltam, kettő sejtfal szintézis gátló (Oxacillin és Penicillin) és kettő fehérjeszintézist gátló (Clindamycin és Tetracyclin) volt. A gátlási zóna eredmények a 5. táblázatban láthatóak. A tejsavbaktériumokra vonatkozóan még nincsenek elfogadott határértékek, az eredményeket a CLSI-15 ajánlása alapján értékeltem.

Oxacillinre a *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus delbruecki* és *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* fajokba tartozó izolátumok hasonló mértékben voltak érzékenyek, a gátlási zóna átmérője 20-23 mm között szórt. A *Lactocaseibacillus rhamnosus* törzsek között már tapasztalható volt érzékenységbeli különbség. Az N4 minta rezisztens volt az Oxacillinre, összehasonlítva az FT-IR-rel mért eredményekkel, ami a 7. ábrán látható, teljesen különálló törzsként jelenik meg a csoportosulásoktól távol. Az MI2 és MILM1 minták által létrehozott gátlási zónák átmenetinek számítanak, az LDA ábra alapján is külön csoportosulnak a többi Oxacillinre érzékeny törzstől, pl. G2, G3, MM4 és MM5. A G5-ös *Lactobacillus acidophilus* képviselő minta volt a legérzékenyebb erre az antibiotikumra.

Penicillin esetén elmondható, hogy mindegyik általam vizsgált törzs érzékeny volt az antibiotikumra, és az Oxacillinnel végzett vizsgálathoz hasonlóan a G5-ös *Lactobacillus acidophilus* minta volt a legérzékenyebb. A két antibiotikummal végzett vizsgálat alapján az állapítható meg, hogy a *Lactobacillus acidophilus* kifejezetten érzékeny lehet sejtfal szintézist gátló antibiotikumokra, de ennek az állításnak a megerősítése még több vizsgálatot igényel.

Clindamycint alkalmazva a tejsavizolátumokra változatos eredményt kaptam. *Lactocaseibacillus rhamnosus* törzsek eseténben a MILM1 és MI2 izolátumok újfent kevésbé voltak érzékenyek, sőt rezisztensek voltak a többi mintával ellentétben, amelyek a G2, G3, N4, MM4 és MM5 izolátumok. A *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* törzsek mind érzékenyek voltak az antibiotikumra, csak eltérő mértékben. A ZB1-es minta érzékenyebb volt, mint a többi. A *Lactiplantibacillus plantarum* három izolátumon az antibiotikum háromféle nagyságrendű gátlási zónát eredményezett. Érdekeség, hogy a MILM3 (nagyon érzékeny) és MI4 (átmeneti érzékenységű) izolátumok a 8. ábra szerint közelebb állnak egymáshoz, mégis óriási a különbség a Clindamycin által kifejtett érzékenységük terén.

A Tetracyclin által kifejtett gátlási zónák nagysága szintén változatos. Tetracyclinre adott válasz alapján a mikrobákat két csoportba lehet osztani, érzékeny vagy rezisztens, átmeneti gátlási zóna tartományt egyik törzs sem mutatott. A rezisztens (MI2, G2, JS2, MI4, MILM3,

Z2, ZB1, MILM2) és az érzékeny törzsek (G3, N4, MILM1, MM4, MM5, G5, G4) körülbelül fele-fele arányban oszlanak el. Érdekesség, hogy a G2 és G3 törzsek a 7. ábra szerint az FT-IR tipizálás alapján elég hasonlóak, míg a Tetracyclinre mutatott érzékenyséjük teljesen eltérő.

Összességében elmondható, hogy a méréseim alapján a sejtfal szintézist gátló antibiotikumok vonatkozásában egyöntetűbb eredményt kaptam a vizsgált tejsavbaktérium törzseknél, míg a fehérje szintézist gátló antibiotikumok esetén nagyobb volt az eredmények változatossága, több rezisztens, illetve átmeneti érzékenyséű izolátum volt a vizsgáltak között. Továbbá a sejtfalszintézis gátló antibiotikumok esetén tapasztalt fajon belüli változatosság jól korrelált az FT-IR eredményekkel.

5. táblázat. Különböző törzsek antibiotikumokra mutatott érzékenysége antibiotikum korongok vizsgálatával, gátlási zónák átmérője mm-ben kifejezve. Forrás: (saját mérés, Andreevna, 2022)

	(mm)	Oxacillin (5 µg)		Penicillin (10 µg)		Clindamycin (10 µg)		Tetracycline (30 µg)	
<i>L. rhamnosus</i>	MI2	19	I	29	S	7	R	14	R
	G2	22	S	35	S	32	S	0	R
	G3	23	S	32	S	30	S	21	S
	N4	0	R	30	S	28	S	22	S
	MILM1	18	I	30	S	0	R	21	S
	MM4	22	S	32	S	32	S	22	S
	MM5	24	S	32	S	30	S	22	S
<i>L. plantarium</i>	JS2	22	S	31	S	29	S	14	R
	MI4	22	S	20	S	19	I	0	R
	MILM3	22	S	20	S	41	S	13	R
<i>L. delbrueckii</i>	Z2	23	S	22	S	42	S	12	R
<i>L. acidophilus</i>	G5	32	S	40	S	18	I	20	S
<i>Streptococcus s. ssp. t.</i>	ZB1	20	S	20	S	40	S	11	R
	G4	22	S	30	S	30	S	20	S
	MILM2	21	S	34	S	29	S	0	R

Érzékeny a mikroba, ha a gátlási tartomány nagyobb, mint 20 mm. Átmeneti tartomány, ha a gátlási tartomány 19-15 mm között van. Rezisztens a mikroba, ha a gátlási tartomány kisebb, mint 14 mm. (Forrás: (Patel és munkatársai, 2015, CLSI-2015))

Jelölések: R: rezisztens, I: átmeneti, S: érzékeny.

6. Összefoglalás

Kutatásomban 18 különböző, kereskedelmi forgalomban beszerezhető joghurt tejsavbaktérium kultúráját hasonlítottam össze. A különböző alapanyagokból fermentált termékek között növényi (szója, kókusz és mandula), tehén- és kecsketej alapú termék is megtalálható volt, natúr és ízesített változatokban.

A tejsavbaktériumok kitenyésztését MRS táptalajon végeztem. A tenyésztést követően a termékekből telep morfológiai jellemzők alapján összesen 47 tejsavbaktérium izolátumot gyűjtöttem. Egyes joghurtminták esetén egyféle morfológiájú telepek voltak jellemzők (T, ZB, MM, ZK), míg más (A G, JS, MILM és N) minták esetében az egyes telepek morfológiai tulajdonságai nagyban különböztek. Az izolátumokat -80 °C-os krio csövekben 10%-os glicerinnel oldatban tároltam, a későbbi vizsgálatokhoz.

A MALDI-TOF MS mérésekhez az izolátumokból elkészített sejtszuszpenzióból 1 µl mennyiséget preparáltam egy speciális tárgylemezre, majd a preparált mintákról tömegspektrumokat vettem fel. Az azonosítást a Bruker mikroba fehérje-referencia könyvtár zárt adatbázisa alapján végeztem. A MALDI-TOF spektrumok alapján 5 fajt azonosítottam, melyek a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* voltak. Az eredmények alapján nem találtam különbséget a felhasznált starterkultúrák összetételében, a gyártók különböző termékeinek összehasonlításával. A *Lactiplantibacillus plantarum* faj viszont megtalálható volt JS termékben, amely a szakirodalmi ajánlásoknak megfelelően volt jelen.

Az FT-IR mérésekhez az Eppendorf csövekben lévő izolátumokhoz etanolt és desztillált vizet tettem, majd homogenizáltam a sejteket tartalmazó oldatokat. és a mintákat három párhuzamosban preparáltam a tárgylemezre. A preparátumok infravörös spektrumait a 1300 és 800 cm⁻¹ közötti hullámszám-tartományban vizsgáltam. Az így kapott spektrumokon lineáris diszkriminancia-analízist (LDA) végeztem, amelynek eredményeit klaszterek formájában kétdimenziós rendszerben jelenítettem meg. A *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* faj összesen kilenc, míg a *Lactocaseibacillus rhamnosus* faj tizenhat törzsét vizsgáltam, valamint a *Lactiplantibacillus plantarum* esetén is kilenc törzs FT-IR tipizálását végeztem el. A törzsek összehasonlítása során arra a következtetésre jutottam, hogy a legtöbb gyártó ugyanazokat a törzseket alkalmazza a különböző termékek elkészítéséhez.

Az antibiotikum vizsgálatokhoz a kiválasztott izolátumokból 0,3-0,4 McFarland közötti denzitású mikroba szuszpenziókat készítettem, amelyből mikrobapázsitot hoztam létre. Erre helyeztem a vizsgálandó antibiotikum korongokat. A kiértékelés során az antibiotikum korongok körül kialakult gátlási zónák átmérőjét vizsgáltam. A vizsgált antibiotikumok a következők voltak: Penicillin (10 µg), Oxacillin (5 µg), Clindamycin (10 µg) és Tetracyclin (30 µg).

Penicillin esetén elmondható, hogy mindegyik általam vizsgált törzs érzékeny volt erre az antibiotikumra. Oxacillin esetén a legtöbb törzs érzékeny volt kivéve egy rezisztens (N4) és két átmeneti érzékenységgű (MILM1, MI2) *L. rhamnosus* törzset. A sejtfalszintézist gátló antibiotikumok esetén az eredmények korreláltak az FT-IR eredményekkel, míg a fehérje szintézist gátló antibiotikumok esetén nagyobb volt az eredmények változatossága, több rezisztens, illetve átmeneti érzékenységgű izolátumot sikerült elkülönítenem, azonban itt nem találtam összefüggést az FT-IR-rel kapott eredményekkel.

A felhasznált termékek többségén jelezve volt, hogy „előflórások”, amely termékeknél a Magyar Élelmiszerkönyv előírja, hogy fogyaszthatósági ideje végéig meg kell őriznie az élő mikroorganizmusok csiraszámának a 10^6 /g értéket (MÉ 1-3/19-1 előírás). Ennek ellenére voltak termékek, ahol sikertelen volt a tejsavbaktériumok kitenyésztése. Ennek okai lehettek a gyümölcsös termékek esetén a nehézkes mintavétel, a javasolt MRS tápközegben a *Lactobacillus*ok kisebb nagyságrendű szaporodása, amittől a vártnál kevesebb vagy semennyi telep nőtt ki az adott hígítási fokon.

Összességében elmondható, hogy a MALDI-TOF MS készülék alkalmas tejsavbaktériumok azonosítására, míg az FT-IR kitűnően megfelelt a tejsavbaktérium törzsek tipizálására. Érdekes volt ezen eredmények összehasonlítása az antibiotikumokkal végzett kísérletek eredményeivel. Megfigyelhető volt, hogy azok a törzsek, amelyek az FT-IR vizsgálat alapján közel álltak egymáshoz, általában hasonló mértékben voltak érzékenyek az adott antibiotikumra. Ez a megfigyelés az Oxacillin esetén volt a legkifejezőbb.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Pomázi Andrea és Dr. Kocsis Tamás konzulenseimnek, akik a TDK felkészülésemhez és méréseimhez hozzájárultak és ugyan olyan lelkesedéssel várták a kutatás eredményeit, mint jómagam.

Szintén köszönettel tartozom az Élelmiszer-mikrobiológia Tanszék dolgozóinak, akik biztosították a vizsgálati anyagokat és eszközöket, és szívesen fogadtak a kutatás résztvevőjeként. Nagy lehetőségnek tartom a MALDI-TOF és az FT-IR készülékek használatának a lehetőségét, amelyek kombinált alkalmazása a mikrobák azonosítása és tipizálása terén, Magyarországon még nem elterjedt módszer.

8. Irodalomjegyzék

- Akimowicz, M., Bucka-Kolendo, J. (2020): MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochimica Polonica*, 67(3), 327-332. DOI: 10.18388/abp.2020_5380
- Andreevna, T. M. (2022): *Comparison of functional probiotic characteristics of lactobacilli originated from probiotic and dairy products*. [Phd értekezés] Budapest: Élelmiszertudományi Doktori Iskola.
- Aziz, Q., Thompson, D. G. (1998). Brain-gut axis in health and disease. *Special Reports and Reviews*, 114(3), 559-578. DOI: 10.1016/s0016-5085(98)70540-2
- Banerjee, A., Gokhale, A., Bankar, R., Palanivel, V., Saltar, A., Robinson, H., Shastri, J.S., Agrawal, S., Hartel, G., Hill, M.M., Srivastava, S. (2021): Rapid Classification of COVID-19 Severity by ATR-FTIR Spectroscopy of Plasma Samples. *Analytical chemistry*, 93, 10391-10396. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c00596
- Branduse, L., Földi, J., (2022): Az antibiotikum-használat kockázatot jelent. Agrárágazat honlapja. Letöltés dátuma: 2024.10.23. <https://agraragazat.hu/hir/agrar-antibiotikum-elelmiszer-betegseg-bakterium-virus-mezogazdasag/>
- Csengeri, L., (2020). Növényi italok piaci körkép. Új Diéta 17–20.
- Daneman, N., McGeer, A., Green, K., Low, D. E., (2006):. Macrolide resistance in bacteremic pneumococcal disease: implications for patient management. *Clinical Infectious Diseases*, 43(4):432-8. DOI:10.1086/505871
- Davidson, M. W. & Abramowitz, M., (2002): Optical Microscopy. In: Davidson, M. W. - Abramowitz, M.(szerk.): *Encyclopedia of imaging science and technology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.p. 1106-1140.
- Daghrir, R., Drogui, P., (2013) :Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett* 11, 209–227. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
- Deák, T., Kiskó, G., Maráz, A., Mohácsiné Farkas, C., (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Budapest: Mezőgazda kiadó.
- Dicks, L. M. T., Plessis, E. M. D., Dellaglio, F. & Lauer, E., (1996): Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., Designation of ATCC 334 as the Neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and Rejection of the Name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 46(1), 337-340. DOI: 10.1099/00207713-46-1-337.

- Fenyvessy J., Csanádi J., Csapó, J., Csapó-Kiss, Z. (2014): *Tejipari Technológia*. Kolozsvár: Scientia Kiadó.
- Grossman, T.H., (2016): Tetracycline Antibiotics and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a025387. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- György, É. (2021): *Általános mikrobiológia*. Kolozsvár: Scientia Kiadó.
- Haider, A., Ringer, M., Kotroczó, Z., Mohácsi-Farkas, C., Kocsis, T. (2023). The current level of MALDI-TOF MS applications in the detection of microorganisms: a short review of benefits and limitations. *Microbiology Research*, 14(1), 80-90. DOI: 10.3390/microbiolres14010008
- Harland, B. F., Morris, E. R., (1995): Phytate: A good or a bad food component?. *Nutrition Research*, 15(5), 733-754. DOI: 10.1016/0271-5317(95)00040-P
- Horáčková, Š., Vrchotová, B., Koval, D., Omarova, A., Sluková, M., Štětina, J. (2022): Use of *Lactiplantibacillus plantarum* for dairy and non-dairy fermented products. *Czech Journal of Food Sciences*, 5, pp. 392-399. DOI: 10.17221/132/2022-CJFS
- Hu , Y., Zhou, H., Lu, J., Sun, Q., Liu, C., Zeng, Y., Zhang, R. (2020): Evaluation of the IR Biotyper for *Klebsiella pneumoniae* typing and its potentials in hospital hygiene management. *Microbial biotechnology*, 0, pp. 1-10. doi:10.1111/1751-7915.13709
- Inayah, I., Wibowo, M. S., Julianti, E., Suciati, T., (2022): Characterization of *Lactobacillus zae* as probiotic and starter culture for tamarillo. *Food Science and Technology*, 42(1), pp. 42, e54021. DOI:10.1590/fst.54021
- Kosztik, J. (2021): *Egzotikus állatokból izolált tejsavbaktériumok azonosítása és jellemzése biotechnológiai hasznosíthatóság szempontjából*. [Phd értekezés] Budapest: Élelmiszertudományi Doktori Iskola.
- Kukovics, S., (2009): *A tej szerepe a humán táplálkozásban*. Budapest: Melánia Kiadó.
- Leszczynka, J., Masłowska, J., Owczarek, A., Kucharska, U., (2018): Determination of Aflatoxin in Food Products by the ELISA Method. *Czech Journal of Food Science*, 19(1), pp. 8-12. DOI:10.17221/6567-CJFS
- Lin, P.W, Myers, L.E.S, Ray, L., Song, S-C., Nasr, T.R., Berardinelli, A.J, Kundu, K., Murthy, K., Hansen, J.M., Neish, A. (2009): *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Medicine*, 47(8),1205-1211. DOI:10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.07.033
- Mäkinen, O.E., Wanhalinna, V., Zannini, E., Arendt, E.K., (2016): Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>

- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., Hutkins, R. (2017): Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion on biotechnology*, 44., pp. 94-102. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.11.010
- Mazel, D., Davies, J., (1999). Antibiotic resistance in microbes. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 56, 742–754. <https://doi.org/10.1007/s000180050021>
- Murphy, P.B., Bistas, K.G., Patel, P., Le, J.K., (2024): Clindamycin, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Nagy, E., Ábrók, M., Bartha, N., Bereczki, L., Juhász, E., Kardos, G., Kristóf, K., Miszti, C., Urbán, E. (2014): Mátrixasszisztált lézerdeszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén. *Orvosi Hetilap*, 155(38), pp. 1495-1503. DOI:10.1556/OH.2014.29985
- Nagy, L. (2009): *Kis molekulatömegű anyagok szerkezetfelfedezése lágyionizációs tömegspektrometriai módszerekkel*. [Phd értekezés] Debrecen: Debreceni Egyetem TTK Kémiai Doktori Iskola.
- Novais, A., Freitas, A. R., Rodrigues, C., Peixe, L., (2019): Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(3), pp. 427-448. DOI: 10.1007/s10096-018-3431-3
- Papich, M.G., (2016): Oxacillin Sodium, in: Papich, M.G. (Ed.), *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)*. W.B. Saunders, St. Louis, pp. 585–586. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00425-3>
- Patel, J. B., Cockerill, F.R., Bradford, P.A., Eliopoulos, G.M., Hindler, J. A., Jenkins, S.G., Lewis, J.S., Limbago, B., Miller, L.A., Nicolau, D.P., Powell, M., Swenson, J.M., Traczewski, M.M., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L. (2015): *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Pécs, M., (2023): Biotermék technológia. BME VBK Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
- Poupard, J. A., Husain, I., Norris, R. F., (1973): Biology of the Bifidobacteria. *Bacteriological reviews*, 37(2), pp. 136-165. DOI: 10.1128/br.37.2.136-165.1973

- Reid G., Bruce, A.W., Taylor, M. (1995): Instillation of Lactobacillus and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. *Microecology Therapy*, 23, 32-45.
- Reid, G., (1999): The Scientific Basis for Probiotic Strains of Lactobacillus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), pp. 3763-3766. DOI: 10.1128/AEM.65.9.3763-3766.1999
- Robinson, J. K. (1982.): Dairy microbiology, The microbiology of milk. New Jersey: John Wiley and sons, Inc.
- Rose, A. H. (1982): *Fermented foods*. London: Academic Press.
- Smieja, M., (1998): Current Indications for the Use of Clindamycin: A Critical Review. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 9, 538090.
<https://doi.org/10.1155/1998/538090>
- Szulczer-Balog, V., Dr. Salamon, P., Both, E., (2022): A probiotikus baktériumok antibiotikum rezisztenciája. *Műszaki szemle*, 83, pp. 41-44.
- Tóth, E., Borsodi, A., Makk, J., Romsics, Cs., Felföldi, T., Jáger, K., Vajna, B., Ács, É., Palatinszky, M., Márialigeti, K. (2018): *Klasszikus és Molekuláris Mikrobiológiai Laboratóriumi Gyakorlatok*. Budapest: ELTE Eötvös Loránd Tudományegyetem. [Elektronikus kiad.] Budapest: ELTE Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2018. Letöltés dátuma: 2024.10.24.
forrás:https://ttk.elte.hu/dstore/document/1152/KLASSZ_MOL_MIK_LAB_GYAK_2018_ISBN.pdf
- Turroni, F., Sinderen, D. V., Ventura, M., (2011): Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), pp. 37-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.010
- Uddin, T.M., Chakraborty, A.J., Khusro, A., Zidan, B.R.M., Mitra, S., Emran, T.B., Dhama, K., Ripon, Md.K.H., Gajdács, M., Sahibzada, M.U.K., Hossain, Md.J., Koirala, N., (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health, Special Issue on Antimicrobial Resistance* 14, 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Vanderhoof, J. A., Whitney, D.B., Antonson, D.L., Hanner, T.L., Lupo, J.V., Young R.J. (1999): Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *The Journal of Pediatrics*. 135(5), pp. 564-568. DOI: 10.1016/s0022-3476(99)70053-3
- Vogt, S., Löffler, K., Dinkelacker, A.G., Bader, B., Autenrieth, I.B., Peter, S., Liese, J. (2019.): Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Typing of Clinical

- Enterobacter cloacae Complex Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 2582. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02582
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., Li, W. (2017): Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*, 19 Május, 9(5), (521), pp. 3-9. DOI: 10.3390/nu9050521
- Zheng J, Wittouck S., Salvetti, E., Franz, C. M.A.P., Harris, H. M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., Lebeer, S. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107

8.1 Egyéb irodalom

http1: KSH adatbázis. Letöltés dátuma: 2024.10.23.

forrás:https://www.ksh.hu/stadat_files/jov/hu/jov0051.html

http2: Netfizika weboldal. Letöltés dátuma: 2024.10.23. forrás:

<https://www.netfizika.hu/tudas/node/9851>

1234/2007/EK: A Tanács 1234/2007/EK rendelete (2007. október 22.) a mezőgazdasági piacok közös szervezésének létrehozásáról, valamint egyes mezőgazdasági termékekre vonatkozó egyedi rendelkezésekről (az egységes közös piacszervezésről szóló rendelet)
MÉ 1-3/19-1 számú előírása a tejtermékekről