



**Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék**

TDK dolgozat

**PROBIOTIKUM ALAPÚ PARABOTIKUMOK
ELŐÁLLÍTÁSA ÉS ANTIMIKROBÁS HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA**

Production and antimicrobial activity of probiotic-based parabiotics

Készítette: **Liebl Rebeka**
IMKWZV
Élelmiszerbiztonsági és -minőségi mérnöki,
mesterképzés
Nappali tagozat
Budai Campus

Témavezető: **Dr. Bujna Erika**, egyetemi docens, MATE,
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet,
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék
Dr. Nguyen Duc Quang, egyetemi tanár,
MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai
Intézet, Biomérnök és Erjedésipari Technológia
Tanszék

**Budapest
2024.**

Tartalom

1. Bevezetés.....	1
2. Célkitűzések	2
3. Szakirodalmi áttekintés	3
3.1 Probiotikumok	3
3.1.1. Alkalmazási kritériumok.....	4
3.1.2. <i>Lactobacillaceae</i> család	5
3.2. Prebiotikumok	8
3.2. Parabiotikumok.....	9
3.2.1 Parabiotikumok előállítási lehetőségei.....	12
3.3. Posztbiotikumok	16
4. Anyagok és módszerek.....	17
4.1. Anyagok.....	17
4.1.1. Mikroorganizmus törzsek	17
4.1.2. Felhasznált tápközegek, oldatok	18
4.2. Módszerek	19
4.2.1. Tenyésztési módszerek.....	19
4.2.2. Fermentáció.....	19
4.2.3. Sejtfeltárás.....	19
4.2.3. Sejtek életképességének vizsgálata.....	21
4.2.4. Centrifugálás	21
4.2.5. Agardiffúziós módszer	21
4.2.6. Spektrofotometriás sejtnövekedés követés	21
5. Eredmények és értékelésük	23
5.1 A tápközeg szénhidrát tartalmának hatása	23
5.1.1 Trehalóz koncentrációjának változtatása	25
5.1.2 A sejttömeg tartalom hatásának vizsgálata.....	26
5.2 Sejtfeltárási módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata parabiotikum előállítására	27
5.2.1 Fizikai módszerek	27
5.2.2 Kémiai módszerek	30
5.3. Különböző sejtfeltárási módszerek egymásra gyakorolt hatása	32
5.4 Különböző probiotikum eredetű parabiotikumok gátló hatásának vizsgálata.....	33
6. Összefoglalás.....	36
7. Szakirodalom.....	38

1. Bevezetés

A probiotikumok élő, nem patogén mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva jótékony hatásúak a gazdaszervezetre (Vallejo-Cordoba et. al., 2020). A hatásukat különböző mechanizmusok által fejtik ki, ilyen például a bél pH értékének csökkentése, melynek következtében a patogén baktériumok szaporodási és megtapadási esélye csökken (Williams, 2010). Ezenkívül egyfajta versengést is folytatnak a bélben jelen lévő tápanyagokért, vitaminokért a kórokozókkal szemben, így is limitálják a túlélési esélyeiket, ezáltal a betegségek kialakulásának lehetőségét (Markowiak és Slizewska, 2017). A jótékony hatással rendelkező törzsek és ezáltal a probiotikumok potenciális forrásai a leggyakrabban a *Bifidobacterium* és a *Lactobacillus* nemzetségbe tartoznak. Alkalmazásuk feltételeként számos kritériumnak meg kell felelniük, hogy a feldolgozás, a tárolás, a fogyasztás és az emésztőrendszeren való áthaladás során életképes formában éri el a bélrendszert. Alkalmazásuk során a tejsavbaktériumok kedvezőtlen körülményeknek vannak kitéve, - ezek közé tartozik az alacsony hőmérséklet, savas pH, enzimek, limitált tápanyag – melyek csökkentik a baktérium túlélési képességeit (Feng és Wang, 2020). Mivel a probiotikus hatás sokszor nem az élő sejtekhez, hanem inkább a sejtalkotókhoz vagy poszt-metabolitokhoz kötődik, így terelődött a kutatók figyelme a nem életképes mikroorganizmusok vagy mikrobiális sejtkivonatok felé (Taverniti és Guglielmetti, 2011). Az utóbbi időben egyre nagyobb figyelmet kap a parabiotikumok használata, amelyek elhalt/inaktivált baktériumsejtek, sejtalkotók, sejttörmelékek vagy sejtlizátumok lehetnek és egészségügyi előnyökkel rendelkezhetnek, stabilak, valamint biztonságos a felhasználásuk (Aguilar-Toalá et. al., 2018). A parabiotikumok hatásukat nemcsak Gram-pozitív baktériumok ellen fejtik ki, így kétségtől nagy potenciális előnyük van a jelen gyakorlatban is elterjedten alkalmazott bakteriocinek képviselőivel szemben. A tanulmányaim alatt végzett előzetes vizsgálataim alapján (Liebl, 2023) a probiotikus tejsavbaktérium alapú parabiotikumok antimikrobás hatást mutattak a Gram-negatív baktériumok ellen is. Ez az előzetes eredmény számos kérdést vet fel és különböző kutatási irányokat jelöl meg. Ide sorolható, az antimikrobás hatás mechanizmusának felderítése, hogy milyen kórokozókkal, patogénekkal és/vagy egyéb mikroorganizmusokkal szemben, milyen körülmények között vagy közegben fejt ki a legnagyobb hatást, mik lehetnek a korlátjai vagy legjobb potenciális előállítási módjuk. Mindezek alapján kutatási munkám folytatásaként a probiotikum alapú parabiotikumok előállítása és antimikrobás hatásának vizsgálata című témát választottam.

2. Célkitűzések

A probiotikumok alkalmazhatóságának és jótékony élettani hatásuk biztosításának egyik feltétele, hogy életképes formában kerüljenek a vastagbélbe, mely speciális törzseket igényel és technológiai kihívásokkal jár. Ezzel szemben a parabiotikumok olyan nem életképes bakteriális sejtalkotók, melyek szintén jótékony hatást fejtenek ki a szervezet számára. Felhasználásuk sokszínű lehet, antimikrobás tulajdonságuk miatt élelmiszer tartósítás területén is szerepet kaphat.

Mindezek alapján kutatásom céljául tűztem ki probiotikus tulajdonságú tejsavbaktérium törzsek (*Ligilactobacillus fermentum* HA-179, *Lactobacillus helveticus* R-52, *Ligilactobacillus salivarius* HA-118 és a *Lactobacillus crispatus* LCR01) parabiotikus tulajdonságának feltárását, a különböző patogén törzsek ellen kifejtett antimikrobás hatásnak vizsgálatával.

A vizsgálatok kiválasztásánál különböző sejtfeltárási módszerek alkalmazhatóságát céloztam meg annak érdekében, hogy olyan módszert találjak a tejsavbaktériumok előlésére, amellyel optimális antimikrobás hatás érhető el, valamint a már korábbi kutatásaimból megállapított sejtfeltárások optimalizálását is célul tűztem ki.

Vizsgálataim során az alábbi részfeladatokat terveztem megvalósítani a probiotikus tulajdonságú sejtek antimikrobás hatásának bizonyítására:

- Fermentációs tápközegekben lévő szénforrás minőségi és mennyiségi optimalizálása
- Kiindulási sejt tömeg hatásának vizsgálata az antimikrobás hatásra
- Különböző sejtfeltárási módszerek alkalmazása parabiotikum előállítására és a módszer hatékonyságának ellenőrzése
 - o kémiai feltárás
 - o fizikai kezelések
- Fizikai és kémiai sejtfeltárás együttes alkalmazása
- Parabiotikumok szaporodás gátló hatásának vizsgálata

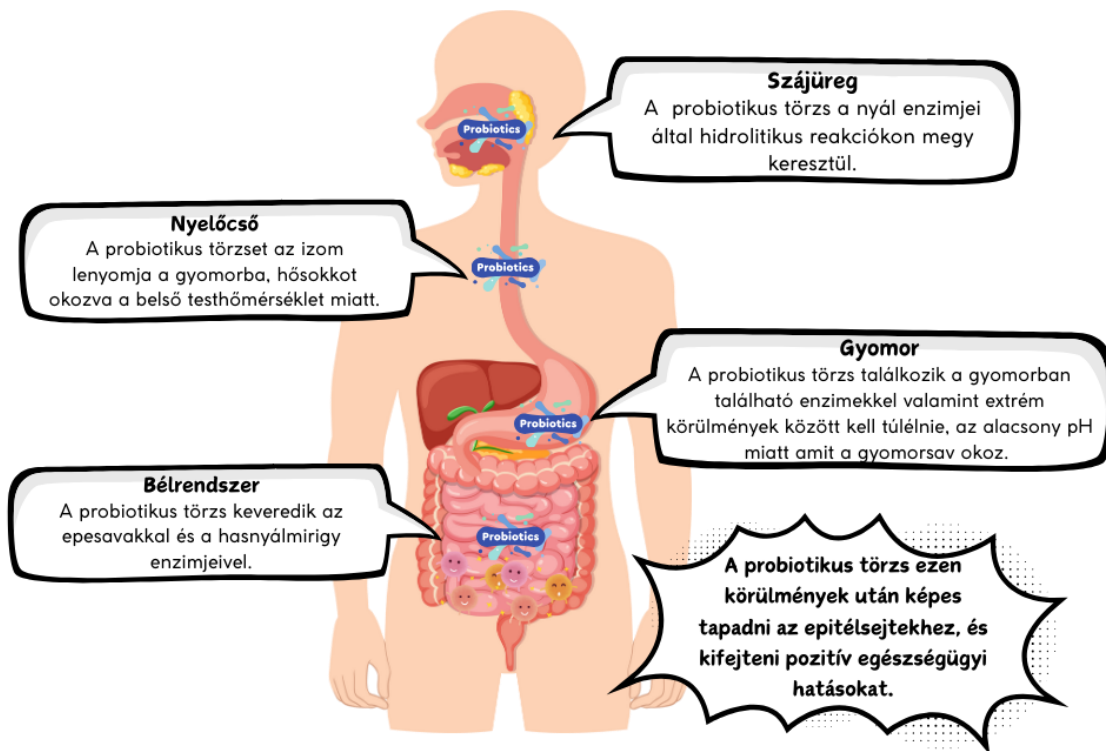
3. Szakirodalmi áttekintés

3.1 Probiotikumok

A probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben adagolva egészségügyi előnyöket biztosítanak a szervezet számára. A probiotikumok a bélhámhoz és a nyálkahártyához tapadva versenyeznek a kórokozókkal, csökkentve a kórokozók invázióját, és olyan antimikrobiális anyagokat termelnek, mint a szerves savak, a bakteriocinek vagy a hidrogén-peroxid ezáltal antimikrobiális hatást fejtenek ki. A bakteriocinek az egyik legszélesebb körben használt tejsavbaktériumok által termelt természetes antimikrobiális metabolitok. A bakteriocinek élelmiszerekben való felhasználásának fő korlátja azonban a Gram-negatív baktériumokkal szembeni szűk antimikrobiális spektrum. A probiotikumok szisztémás hatásai, mint például a szabályozó T-sejtek termelésének indukálása és az allergénekre adott válasz irányítása, reményt adtak az allergiás betegségekben való felhasználásukra. Ezért is a probiotikumok emberi egészségre gyakorolt hatása az elmúlt évtizedekben a kutatás középpontjába került, számos olyan kutatás folyik különböző betegségekkel kapcsolatban -főleg a gyomor-bélrendszeri betegségek megelőzésére és kezelését érintő kérdésekben, amelyekben a probiotikumokat terápiás céllal alkalmazzák (Önata et al., 2024). Mindez összhangban van az ipar és a fogyasztók e mikroorganizmusok iránti fokozott érdeklődésével, mivel becslések szerint a probiotikumok piaca 2027-re világszerte mintegy 85,4 milliárd USD-t fog mozgatni. Az élelmiszeriparban a probiotikus törzseket széles körben alkalmazzák, technológiai adalékanyagként az erjesztett termékek esetében, az élelmiszerek tartósítására, az élelmiszer eredetű megbetegedések vagy élelmiszerromlást okozó kórokozók gátlására is (de Luna et al., 2024).

3.1.1. Alkalmazási kritériumok

A probiotikus mikroorganizmusok alkalmazása számos nehézséggel jár. A probiotikumok esetében technológiai, funkcionális és biztonságossági elvárásokat kell teljesíteniük, annak érdekében, hogy sikeresen kifejtsek jótékony hatásait (1. ábra).



1. ábra: Probiotikumoktól elvárt túlélési képességek (Pereira et al., 2018 nyomán)

Amennyiben az 1. ábrán felsorolt összes szélsőséges körülményt képesek túlélni, méghozzá megfelelő mennyiségben, csak abban az esetben lehetséges az alkalmazásuk. Ezek mellett nem rendelkeznek negatív tulajdonságokkal (Pereira et al., 2018). A probiotikus mikroorganizmusok értékelésekor megvizsgálják, hogy mennyire képesek megbirkózni a stresszhelyzetekkel, amit az emberi test okozhat. Fontos, hogy a probiotikum ellenálló legyen a szájban lévő enzimekkel szemben, mint például az amiláz és a lizozim. A lenyelést követően a probiotikus sejtek a gyomorban (alacsony pH, gyomornedv és pepszin) és a belekben (pankreatin és epesók) antimikrobiális tényezőkkel, valamint a belső testhőmérséklet okozta enyhe hő sokkkal szembesülnek. A gasztrointesztinális rezisztencia fajonként változik, a legtöbb probiotikus mikroorganizmus nehezen él túl az alacsony pH és az epesavak mellett. Az adhéziónak a következő lépés a probiotikumok értékelésében, és azt jelzi, hogy képesek-e a probiotikus törzsek kolonizálni az emésztőrendszer epitélisejtjeit. A mikrobiális adhéziónak két membrán

közötti komplett kontaktusfolyamat, amely függ a probiotikus törzs sejtfelületének összetételétől és a célfelületen lévő kölcsönhatásoktól (Durary et al., 2011). A bélben a probiotikumok extracelluláris antimikrobiális komponenseket - szerves savak, enzimek, hidrogén-peroxid, bakteriocinek és kis molekulatömegű peptidek - termelnek, amelyek képesek elpusztítani a patogén baktériumokat. A probiotikus antagonizmus további mechanizmusai közé tartozik a tápanyagokért való versengés, a kórokozókkal való koaggregáció és az immunrendszer stimulálása (Lebeer et al., 2008). Amennyiben ezen feltételek mindegyikét hibátlanul teljesítik, még mindig további kritériumnak kell megfelelniük, mégpedig az életképességükhöz szorosan kötődő antibiotikum-rezisztencia kérdésében. Ugyanis az élő mikrobák étrendbe való bevitelével járó fertőzésveszélyt fel kell mérni, és nem szabad teljes mértékben figyelembe venni azt a következtetést, hogy „a probiotikumok biztonságosak” (Culligan et al., 2009). Az európai közösség (Az Európai Unió új élelmiszer-szabályozása, QPS és PROSAFE), az Egyesült Államok (FDA és WHO), valamint Kanada (Health Canada: NHPR) néhány kezdeményezése az emberi felhasználásra szánt probiotikumok biztonságosságának értékelésére vonatkozó kritériumok meghatározására irányult. A közös ajánlások közé tartozik az izolálási előzmények nyilvántartása, a rendszertani azonosítás, valamint a virulencia, fertőzőképesség, toxicitás és az átvihető antibiotikum-rezisztencia gének hiánya (Sanders et al., 2010). Az EFSA (Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság) először 2007-ben mutatta be az antimikrobiális rezisztenciát, mint a probiotikumok fogyasztásával kapcsolatos biztonsági aggályt (Barlow et al., 2007). Ezt a jótékony baktériumokból a gazdaszervezet bélrendszerében megtalálható patogén baktériumokba történő horizontális génátvitelre vonatkozó bizonyítékok miatt támogatták. Következésképpen 2012-ben felvették ezt a kritériumot a probiotikumok GRAS-státusának meghatározásához.

3.1.2. *Lactobacillaceae* család

A laktobacillusok olyan tejsavbaktériumok, melyek a *Firmicutes* törzsbe a *Bacilli* osztályba, *Lactobacillales* rendbe, *Lactobacillaceae* családba tartoznak. A *Lactobacillaceae* a tejsavbaktériumok családja, amely az emberek és számos állat bélmikrobiótájának alkotója. Ezek a baktériumok jótékony hatást gyakorolnak a bélrendszer egészségére, többek között modulálják az immunrendszert és védelmet nyújtanak a kórokozókkal szemben, ezért számos fajukat gyakran használják probiotikumként (Huynh & Zastrow, 2023). A *Lactobacillaceae* családot többnyire nem patogén, Gram-pozitív baktériumok alkotják, amelyek tápanyagban gazdag környezetben, élelmiszerekben, takarmányokban, növényekben, gerinctelen állatokban

is megtalálhatóak. Legnagyobb számban azonban az emberi és állati bélmikrobiótában fordulnak elő. A különböző törzsek jellemzően eltérő helyeken jelennek meg, mint például a bőrön, vagy a vastagbélben. Ezek a baktériumok nem spóráképző fakultatív vagy szigorúan anaerob baktériumok, kokkoid vagy pálca alakú sejtek, amelyek párokat vagy láncokat alkothatnak. Nagy gazdasági jelentőségűek, mivel központi szerepet játszanak az élelmiszer- és takarmánygyártásban, a biotechnológiában, a bioremediációban (komposzt) és a terápiás alkalmazásokban is felhasználják őket. A *Lactobacillaceae* családdal kapcsolatos kutatások során ezért az élelmiszer-fermentációs eljárásokban, a biológiai anyagcserében betöltött szerepük, valamint a biotechnológiai alkalmazásuk dominált. A mai *Lactobacillaceae* család nagy része 2020-ig a korábbi *Lactobacillus* nemzetség volt, amely több mint 260 baktériumfajt tartalmazott. A genomikus szekvenálás széles körben elterjedt alkalmazásával felmerülő bizonyítékok azonban gyorsan megerősítették, hogy a korábbi *Lactobacillus* nemzetség ismert fenotípusos diverzitása egy rendkívül magas szintű genomikus diverzitásban tükröződött, amely nagyobb volt, mint egy baktériumcsaládé. Egy polifázisos megközelítés alapján - amely az alapvető genomfilogenitást, a páros átlagos aminosav-azonosságot és a kládspecifikus szignatúragéneket vizsgálta, fiziológiai kritériumok és a szervezetek ökológiájának összefüggésében -, a korábbi *Lactobacillus* nemzetséget nemrégiben 25 nemzetségre osztották fel. Ezek a nemzetségek a *Paralactobacillus* nemzetséggel, más olyan nemzetségekkel, amelyek már 2020 előtt is jelen voltak a *Lactobacillaceae* családban (pl. *Weisella*, *Pediococcus* és *Oenococcus*), valamint a *Leuconostocaceae* családdal együtt egyetlen családban, a *Lactobacillaceae* családban egyesültek, amely jelenleg 33 nemzetségből és mintegy 300 fajból áll (Walter & O'Toole, 2023). A laktobacillusok mikroaerofil, katalázal és citokrómmal nem rendelkező baktériumok, melyeknek aerob oxidatív anyagcseréjük van. A tejsavbaktériumok (LAB) anyagcseréje során ismert, hogy nagy mennyiségű tejsavat és más anyagcseretermékeket állítanak elő különböző szénforrásokból, többek között glükózból, fruktózból, laktózból és galaktózból. A glükóz anyagcsere során a homofermentatív tejsavbaktériumok, kizárólag tejsavat termelnek az Embden-Meyerhof-Parnas útvonalon keresztül, míg a heterofermentatívok a tejsav mellett számos más metabolitot, többek között etanolt, ecetsavat és szén-dioxidot termelnek a pentóz-monofoszfát útvonalon keresztül (Carr et al., 2002). Másodlagos metabolitokat is termelhetnek, beleértve a bakteriocineket, exopoliszacharidokat és enzimeket, amelyeket az erjesztett élelmiszerek minőségének és eltarthatóságának növelésére használnak fel. A laktobacillusok támogatják a gazdaszervezet immunrendszerét, így számos patogén mikroorganizmussal szemben ellenállóvá teszik a gazdaszervezetet. Az emésztőrendszerben a burkoló epitélium csillangós hámsejtjei fizikai gátat képeznek, a bélcsatorna emésztőnedvei is

védelmet nyújtanak, valamint a gyomorban uralkodó savas pH is ellenállóbbá teszi a gazdaszervezetet (Deák et al., 2006). Az egyes *Lactobacillus* törzsek különböző jótékony hatásokért is felelősek lehetnek.

A *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) tejsavbaktériumról szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy erősítik az immunológiai választ, valamint megelőzik a gyomorbélrendszeri és felső légúti fertőzéseket. Ezenkívül az *L. fermentum* törzsek változatos és hatásos antimikrobiális peptideket termelnek, amelyek élelmiszer tartósító anyagként vagy az antibiotikumok alternatívájaként alkalmazhatók. A probiotikus *L. fermentum* törzseknek tulajdonított további jótékony hatások közé tartozik, hogy képesek csökkenteni a vér koleszterinszintjét és a vastagbélrákot az emberek körében.

A *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) a tejsavbaktériumok egy típusa, amelyet az élelmiszeriparban széles körben alkalmaznak. A *L. helveticus* számos bélrendszerben előforduló probiotikummal összehasonlítva jobb alkalmazkodóképességet mutat az ipari fermentációs körülményekhez, ami annak köszönhető, hogy képes szélsőséges környezetben, többek között magas hőmérsékleten és savas pH-jú közegben is életben maradni (Taverniti & Guglielmetti, 2012). Egyre több ismeret van arra vonatkozóan, hogy a *L. helveticus* és az általa termelt metabolitok egészségmegőrző tulajdonságokkal rendelkeznek (Giraffa, 2014). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a *L. helveticus* több potenciális probiotikus funkcióval rendelkezik, mint például a bélmikrobióta és metabolitjainak szabályozása a bél-máj tengelyen keresztül, ezáltal mérsékelheti a máj oxidatív stresszét. Továbbá egerekkel végzett kísérletekben is bizonyították, hogy hatékonyan enyhíti a hasmenést és a bélmikrobióta modulálásával fokozza az immunrendszer működését (Bian et al., 2016).

A *Ligilactobacillus salivarius* (*L. salivarius*) a tejsavbaktériumok azon típusa, mely általában a gasztrointesztinális traktusban (GT) található. Probiotikus és funkcionális tulajdonságai, valamint különböző egészségmegőrzésben betöltött szerepe miatt jelentős figyelmet kapott. Pozitív hatással van a bélmikrobióta összetételére, ezáltal javítja a bélmikrobióta metabolikus profilját, elősegítve az egészséges és kiegyensúlyozott bélrendszer kialakulását. A *L. salivarius* törzsek erős ellenálló- és tapadási képességet mutatnak a GT-ben, valamint kiemelkedő antioxidáns és antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkeznek. Emellett számos *L. salivarius* törzs képes antagonistá hatású bakteriocint termelni (Yang et al., 2024).

A *L. crispatus* fajjal kapcsolatban széles körű irodalom foglalkozik, amely a gazdaszervezettel való kölcsönhatáson vagy az (opportunistá) kórokozókval való versengésen keresztül az emberi egészségben betöltött szerepük feltárására összpontosít, beleértve a humán hüvelyi epitélsejtekkel való kölcsönhatást és a bakteriocin-termelést. A *Lactobacillus crispatus* (*L.*

crispatus) M247 jó bél- és hüvelyi tapadási képességgel rendelkező törzs, amely helyi antibakteriális és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezik. A *L. crispatus* bizonyítottan nem-átvihető rezisztenciával rendelkezik a női nemi szervi fertőzésekben gyakran használt antibiotikumokkal, például a metronidazollal szemben. A *L. crispatus* M247 a hüvelyi traktus fertőzésekben az antibiotikumok potenciális kiegészítő terápiájaként alkalmazható, a kedvező mikrobióta helyreállítása céljából (Bertuccioli et al., 2022).

3.2. Prebiotikumok

A prebiotikum meghatározás szerint „olyan nememészthető élelmiszer-összetevő, amely a vastagbélben lévő egy vagy korlátozott számú baktérium növekedésének és/vagy aktivitásának szelektív serkentésével jótékonyan hat a gazdaszervezetre” (Gibson & Roberfroid, 1995). A probiotikumok és prebiotikumok együttes alkalmazása szinbiotikumként ismert, amelyről úgy vélik, hogy kedvezőbb a bélrendszer egészsége és működése szempontjából, mintha csak a probiotikumot alkalmaznánk magában (Gharajalar et al., 2021). A frukto- és galakto-oligoszacharidok (GOS) mellett, a trehalóz is a prebiotikumok között említendő.

A trehalóz (α -D-glükopiranozil-(1-1)- α -D-glükopiranozid) egy a természetben előforduló, két glükóz-monoszacharidból álló, nem redukáló diszacharid, amely megtalálható rovarokban, növényekben, gombákban és baktériumokban is. Ez a szénhidrát édesítőszerként, stabilizátorként és nedvesítőszerként hasznosul az élelmiszeriparban, a kozmetikumokban és a gyógyszeriparban (Chen et al., 2022). A trehalózt, mint nem mérgező szénhidrátot kezdetben úgy tekintették, hogy elsősorban tárolt energiaforrásként működik, hasonlóan a glikogénhez (Becker et al., 1996). Manapság már bebizonyosodott, hogy prebiotikumként is kifejti hatását, például a β -Gal-(1-4)-trehalóz [DP3(1-4)] a *Bifidobacterium* számának növekedéséhez vezet, míg a β -Gal-(1-6)-trehalóz [DP3(1-6)] a *Lactobacillus* növekedését serkenti. Másrészt a Trehalóz-GOS tetraszacharid-keverék (DP4), amely mindkét glükózegységben újszerű trehalóz-galaktozilációt tartalmaz, elősegíti a *Parabacteroides* növekedését. Ezen értekezések alátámasztják az új Treh-GOS-ok képességét a humán bélmikrobióta modulálására. Következésképpen ezek az innovatív galakto-oligoszacharidok az új prebiotikus alkalmazások ígéretes jelöltjeiként jelennek meg (Calvete-Torre et al., 2024). Az évek során azonban kiderült, hogy a trehalóz speciális biológiai funkciókat is betölthet, például védi a fehérjéket és a membránokat a különböző stresszhatásokkal szemben, mint a hő, fagy, oxidáció, kiszáradás, mint stresszre szintetizálódó vegyület. Amikor az alacsonyabb rendű szervezetek stressznek vannak kitéve, hatalmas mennyiségű trehalóz szintézisével alkalmazkodnak, ami segít nekik a

sejtek integritásának megőrzésében. Ez feltehetően úgy történik, hogy a trehalóz megakadályozza a fehérjék denaturálódását, amelyek egyébként stressz hatására lebomlanának. Már kimutatták, hogy a trehalóz egy aggregációra hajlamos modellfehérje stabilizálásával lassítja a poliglutamin-mediált fehérjeaggregáció és az ebből eredő patogenezis sebességét (Jain & Roy, 2009). Emellett számos kutatás bizonyította, hogy a trehalóz más biológiai tevékenységek mellett a mikrobiális patogenezisben és a sejtciklus progressziójában is fontos szerepet játszik (Vanaporn & Titball, 2020). Ez a vegyület figyelemre méltó stabilitást mutat magas hőmérsékleten (90 percig 120 °C-ig kitart), továbbá a savas körülményekkel szemben. Ezenfelül védő tulajdonságokkal rendelkezik a lipidek oxidációjával szemben a melegítés és az aerob expozíció során (Ohtake & Wang, 2011). A trehalóz intracelluláris felhalmozódása az egyik legismertebb válaszreakció, amely a probiotikus mikroorganizmusok termotoleranciájához kapcsolódik (Martins et al., 2008). Chen és munkatársai (2007) kísérletükben négyfajta szénhidrátforrást (dextróz, frukto-oligoszacharidok, raffinóz, trehalóz) alkalmaztak a táplevesben egyedüli szénforrásként, s vizsgálták a különböző közegekben felszaporított baktériumok bakteriocin termelését agardiffúziós módszerrel. Öt bakteriocin termelő törzset használtak, amelyek között volt nizint, enteriocint és más bakteriocinokat termelő törzs is. Kutatásuk eredményeként leírták, hogy az oligoszacharidok, valamint a trehalóz hatékonyan fokozza az általuk vizsgált baktériumok bakteriocin termelését.

3.2. Parabiotikumok

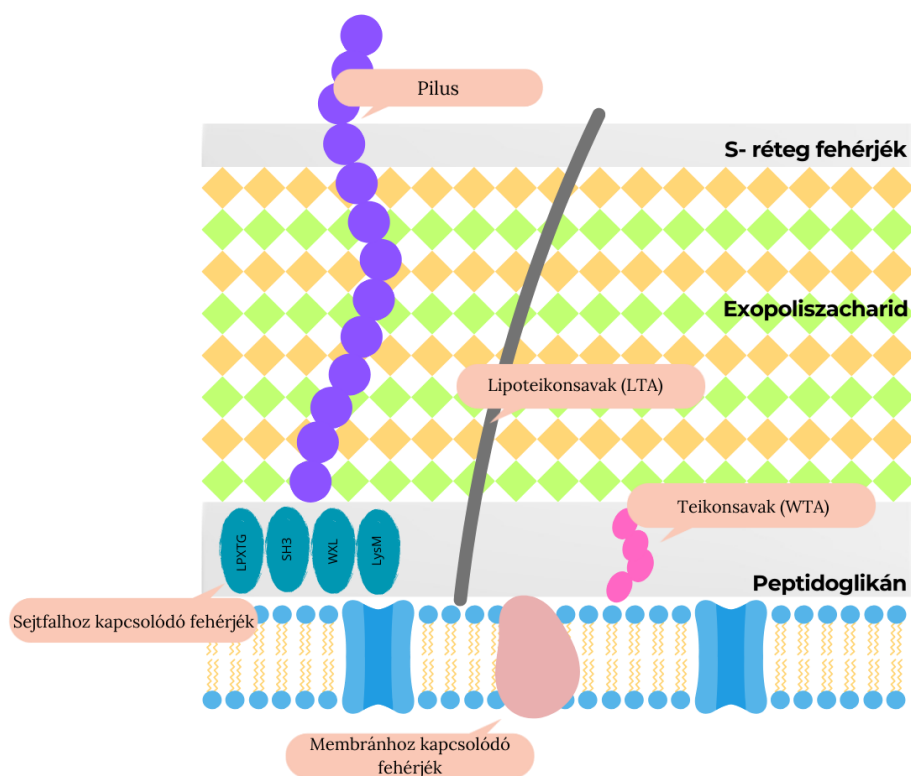
Annak ellenére, hogy a probiotikumok különböző egészségügyi állapotok megelőzésében vagy kezelésében rejlő lehetőségek miatt széles körben elterjedtek, vannak velük kapcsolatban felmerülő aggályok, mint a beadott élő mikroorganizmusok okozta fertőzések, a hosszú távú immunválaszok megváltozása, az antibiotikum-rezisztencia kialakulása és terjedése, valamint a megfelelő élősejtszám alkalmazása (10^9 telepképző egység (TKE) alsó határértéket alkalmaznak dózisonként). Ezen problémák mindegyike a probiotikumok életképességéhez kapcsolódik. A lehetséges megoldás az inaktivált probiotikumok, más néven parabiotikumok alkalmazása. A parabiotikumok (vagy paraprobiotikumok) meghatározás szerint „nem életképes mikrobiális sejtek (ép vagy törött), vagy nyers sejtkivonatok (összetett kémiai összetételűek), amelyek megfelelő mennyiségben (szájon át vagy helyileg) beadva előnyös hatást gyakorolnak az emberi vagy állati szervezet számára” (2. ábra).



2. ábra: Parabiotikum és posztbiotikum

Előnyeik közé tartozik a probiotikus szepszis és az antibiotikum-rezisztencia csökkent kockázata, valamint a hosszabb eltarthatóság, mivel nincs szükség a hűtőlánc fenntartására a probiotikus organizmusok életképességének megőrzése érdekében (Shripada et al., 2020). Az utóbbi években egyre több kutatás fókuszál probiotikum eredetű posztbiotikumok és paraprobiotikumok vizsgálatára. Az eredmények arra utalnak, hogy a nem életképes mikroorganizmusok vagy baktériummentes kivonatok is mutatnak többek között gyulladáscsökkentő, immunmoduláló, antiproliferatív és antioxidáns aktivitásokat, melyek előnyöket biztosíthatnak a gazdaszervezet számára (Vallejo-Cordoba et al., 2020). Míg a probiotikum meghatározás szerint a mikroorganizmusoknak élők/életképesnek kell lenniük ahhoz, hogy jótékony hatásukat kifejthessék, a legújabb bizonyítékok szerint a mikrobák életképessége nem szükséges az ilyen hatások eléréséhez (de Almada et al., 2018). Ezt a feltevést figyelembe véve a poszt- és parabiotikumok számos területen, elsősorban az élelmiszerekben és a funkcionális élelmiszerekben (pl. étrend-kiegészítők, takarmány-adalékanyagok stb.) potenciálisan alkalmazhatók (Ramkrishna et al., 2019). A parabiotikumok hatékonysága az inaktivált sejtekben található mikrobiális metabolitokon vagy komplex molekulákon alapul (Konstantinov et al., 2013). Az elmúlt években néhány tanulmány leírta a parabiotikumok fogyasztásának a gazdaszervezet egészségére gyakorolt hatásait. Például az alkohol okozta májbetegségek, hasmenés, vastagbélgyulladás és bélrendszeri elváltozások kezelésére használhatók, továbbá az immunrendszer, a bélmikrobióta és a baktériumtranszlokáció modulációjára, valamint koleszterinszint csökkentésre és a laktózintolerancia kezelésében is sikerrel alkalmazták (Vallejo-Cordoba et al., 2020).

Parabiotikus komponensek legfőképp a sejtfal alkotói lehetnek, mint a peptidoglikán, teikonsav, sejtfal-poliszacharidok, sejtfelszíni fehérjék és egyéb fehérjék (Lee et al., 2023). A legtöbb tejsavbaktérium sejtfala egy vastag peptidoglikán réteget foglal magába, amelynek keresztkötésű glikánlánc β -1,4 kötésű N-acetil-muramin-diszacharid és N-acetilglükózamin váltakozó egységeit tartalmazza (3. ábra).



3. ábra: *Lactobacillus* sejtfal felépítése (Lee et al., 2023 nyomán)

A teikonsavak (TA) szintén a LAB sejtfalának részét képezik. Anionos polimer jellegének köszönhetően a TA kovalensen kapcsolódhat peptidoglikánhoz vagy a citoplazmamembránhoz (Teame et al., 2020). Az exopoliszacharidok (EPS) antipatogén hatásuk és adhézión tulajdonságaik révén segíthetik a környezet és a baktériumok közötti kölcsönhatásokat (Chen et al., 2014). A probiotikus törzsekből származó EPS modulálhatja a bélrendszeri egyensúlyt és a nyálkahártya immunválaszait (Dinić et al., 2018). A felszíni fehérjék a LAB sejtburkának értékes összetevői. Egy tanulmány arról számolt be, hogy a LAB törzsek többféle felszíni fehérjét termelnek, amelyek moonlightfehérjéket, LPxTG fehérjéket, pili fehérjéket és S-réteg fehérjéket tartalmaznak (Hynönen & Palva, 2013). A moonlightfehérjék számos fehérjét foglalnak magukban, köztük riboszómális fehérjéket, metabolikus enzimeket, transzlációs elongációs faktorokat és molekuláris chaperonokat (Saad et al., 2009).

Incili és munkatársai (2023) megállapították, hogy a *P. acidilactici*-ből nyert liofilizált parabiotikumban (LP) számos bioaktív vegyület, köztük egyedi fenolok, szerves savak, szabad zsír- és aminosavak találhatók. Ezek a vegyületek nemcsak nagy antioxidáns kapacitást mutattak, hanem részt vettek a parabiotikum antimikrobiális hatásában is. Ebben az összefüggésben a liofilizált parabiotikum MIC-értéke 6,25 mg/ml volt *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* és *L. monocytogenes* ellen. A korábban élelmiszerpatogén törzsekkel szennyezett húsgombócok vizsgálatakor az LP (6%) és az EDTA (0,02 M) kombinációja 3,11, 2,45, illetve 1,32 log₁₀ CFU/g-mal csökkentette az *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 számát a kezeletlen húsgombócokhoz képest. Eredményeik azt mutatták, hogy az élelmiszerek mikrobiológiai biztonságának javítása elérhető liofilizált parabiotikumok alkalmazásával.

3.2.1 Parabiotikumok előállítási lehetőségei

A poszt- és parabiotikumok előállításához inaktivált mikroorganizmusokra van szükség, melyek többféle technológiai stratégiával érhetők el. Ezen módszerek megváltoztathatják a mikroba sejtstruktúráját és/vagy fiziológiai funkcióját (Ramkrishna et al., 2019). Mindazonáltal fontos, hogy a poszt- és parabiotikumok előállítására alkalmazott inaktiválási módszernek biztosítania kell, hogy megőrizze az életképes forma által nyújtott jótékony hatásokat (De Almada et al., 2016). A parabiotikumok kémiai vagy mechanikai stresszt követően inaktivált mikroorganizmusokból keletkeznek: a sejtek a sejtburkot ért mechanikai/kémiai károsodást szenvednek, ami a sejtmembrán felbomlásához vagy a DNS-szálak degradációjához vezet (Siciliano et al., 2021). A sejtfeltárás módszereit tekintve a szakirodalomban sokfajta megoldás fellelhető, melyek mindegyike a mikrobák életképességének elvesztésére összpontosít a sejtmembránon okozott sérülés révén (Cuevas-González et al., 2020). A sejtfeltárási módszerek közül megkülönböztetünk mechanikai (nyíróerő alkalmazása) és nem-mechanikai módszereket (kémiai, fizikai, enzimátikus), ezt foglalja össze az 1. táblázat.

1. táblázat: Sejtfeltérési módszerek és hatásmechanizmusuk

	Módszer	Hatásmechanizmus	Hivatkozások
Fizikai módszerek	Hőkezelés	Membrán károsodása	Ou et al., 2011
	Szonikálás	Intracelluláris kavitáció, sejtes szerkezet károsítása	Shin et al., 2010
	Fagyasztás-felolvasztás	Sejtfelszíni struktúrák károsodása a jégkristályok kialakulása miatt	Murga et al., 2001
Kémiai módszerek	CTAB oldat	Membrán permeabilizálása	Tiwari et al., 2020
	SDS oldat	Fehérje- fehérje kölcsönhatások bontása	Springer et al., 1977
	Triton X-100 oldat	Bejut a sejtmembránok lipid kettősrétegébe, ezáltal a membrán áteresztőképesebbé válik.	Mattei et al., 2015

3.2.1.1. Fizikai módszerek

3.2.1.1.1. Hőkezelés

A hőkezelés a legnépszerűbb módszer a probiotikumok inaktiválására. A kezelést befolyásolja a hőmérséklet, a közeg, a pH-érték, a melegítés módja és a sejtek típusa, például vegetatív sejtek vagy spórák. A hőkezeléssel történő inaktiválási mechanizmusok a DNS-filamentumok felbomlásához, riboszóma aggregációhoz, a tápanyagok és ionok kimerüléséhez, a membránok károsodásához, a fehérjék koagulációjához és az enzimek inaktiválásához kapcsolódnak. A hőkezelés körülményei széles skálán mozognak (60-100 °C 5-30 percig) és törzsfüggőek (Ou et al., 2011). Sañudo és munkatársai (2017) hőinaktiválással (121 °C-on 20 percig) életképtelen *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 sejteket állítottak elő, és vizsgálták antimikrobiális hatásukat a fogszuvasodás kialakulásával összefüggő kórokozókra, különösen a *Streptococcus mutans*-ra. Az eredmények azt bizonyították, hogy az *in vitro* vizsgálatban a gátló hatás fennmaradt, miután hőinaktivált CECT 5713 (36 hónapos tárolás) került alkalmazásra. Míg a *S. mutans* koncentrációja az önkéntesek nyálában (*in vivo*) a kezelés harmadik napjától kezdve 2 hétig jelentősen csökkent.

3.2.1.1.2. Szonikálás

A szonikálás egy olyan módszer, amely ultrahangot használ a molekulák közötti kölcsönhatások megbontására. Ez a technológia az intracelluláris kavitációnak köszönhetően kémiai és fizikai változásokat idéz elő a sejtfali struktúrákban. A kavitáció a DNS-károsodás, a sejtmembránok elvékonyodása és károsodása, valamint a szabad gyökök képződése révén a sejtfal felszakadása miatt mikrobiális inaktiválódást eredményez (Birmipa et al., 2013).

3.2.1.1.3. Fagyasztás-felolvasztás

Souzu már 1989-ben megállapította, hogy a logaritmikus fázisú sejtek membránjának permeabilitása a lassú fagyasztás során változást szenvedtek, ami később alacsony sejtelétképességet eredményezett. A gyors fagyasztás során a sejtek csak enyhe károsodást szenvedtek a membránfunkcióban, és megőrizték magasabb életképességüket. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a sejtek fagyasztása következtében bekövetkező károsodás elsődleges helye a sejtmembrán, és ez a pusztulás a membránokban lévő lipidekben a fagyasztás által előidézett változásnak köszönhető. Továbbá ismeretes, hogy bár a fagyasztás széles körben alkalmazott eljárás a baktériumtenyészetek tárolására, a fagyasztás és az azt követő kiolvasztás egy adott populáció nagy hányada számára halálos, a fagyasztás és a kiolvasztás során mind a membrán, mind a sejtfal károsodik. Azt is megállapították, hogy a sóoldatban történő fagyasztás és felolvasztás a sejtre nézve halálos membránkárosodást eredményez (Calcott & MacLeod, 1975). Ez a letális károsodás a kettősréteg konformációjának és az ionokkal szembeni permeabilitási tulajdonságainak hidratációs vagy stressz által kiváltott változásaiból eredhet. Így a sejtek sikeres fagyasztva tartósításának érdekében figyelembe kell venni a lipidkomponensek koncentrációjának arányát a növekedés közben. A sejtek fagyasztásra és felengedtetésre adott válaszát a fagyasztást megelőző növekedési körülmények, például a hőmérséklet is módosíthatják (Murga et al., 2001). Ezen, membrán károsító hatása miatt lehetséges az alkalmazása sejtfeltárási módszerként.

3.2.1.2 Kémiai módszerek

A kémiai módszerek lízispuffereket használnak a sejtmembrán megbontásához. A sejt-lízispufferekhez detergens is adhatók a membránfehérjék szolubilizálása és a sejtmembrán felszakítása érdekében, mely a sejt tartalmának felszabadulását eredményezi. A kémiai lízist lúgos és detergens lízisre lehet osztani. Az első típusban az OH⁻ ionok a célsejtek líziséhez használt fő komponensek. A módszer mindenféle sejt típusra alkalmas, a folyamat azonban nagyon lassú, és akár 12 órát is igénybe vehet. A kémiai lízis másik típusa detergenset (más néven felületaktív anyagokat) használ a sejtmembrán megbontására.

Általában az enyhébb, nem ionos detergenset részesítik előnyben, mivel ezek károsítják a legkevésbé a fehérjéket és az enzimeket, például a Triton-X (Grigorov et al., 2021).

3.2.1.2.1 Cetil- trimetil- ammónium- bromid oldat

A nem-mechanikai, azon belül kémiai sejtfeltárás megvalósítható cetil-trimetil-ammónium bromiddal (CTAB), mely egy a mindennapi életben gyakran használt felületaktív vegyi anyag, széles körű ipari alkalmazással, például a mosószerekben, gyógyszerekben, kozmetikumokban és textíliákban is elterjedten alkalmazzák (Tiwari et al., 2020). Mindezek mellett sejtfeltárássra is kiválóan alkalmazható, többek közt intracelluláris enzimek esetén.

3.2.1.2.2 Nátrium-dodecil-szulfát

A nátrium-dodecil-szulfát (SDS) egy anionos felületaktív anyag, amely 12 szulfátcsoporthoz kapcsolt szénatomból áll, és nagyszerű habképző képességgel rendelkezik. Az SDS egy példa az erős ionos detergensre. Erősen denaturál, és nagyon hatékonyan bontja a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, különösen, ha hővel kombinálják. Feltéve, hogy nem melegítik őket, a fehérjék, például a II. osztályú hisztokompatibilitási antigének alegységei SDS jelenlétében is egymáshoz kapcsolódnak (Springer et al., 1977). Kevés fehérje nem szolubilizálható nátrium-dodecil-szulfátban; azok közé tartoznak a keratinok és más fehérjék, amelyeknek az alegységei között kiterjedt kovalens keresztkötések vannak. A sejtek SDS-ben történő oldása a sejtmag lízisét és a DNS felszabadulását eredményezi, ami a mintát nagyon viszkózussá és nehezen kezelhetővé teheti (Goulding, 1996).

3.2.1.2.3 Triton X-100

A Triton X-100 egy nemionos detergens (nem töltött felületaktív anyag), amely micellákat képez. Biokémiai kutatások számos területén alkalmazható. Ezek közé tartozik a fehérjék tisztítása és extrakciója, a membránfehérjék aktiválása és többek között sejtfeltárássra is használják. A *Streptococcus faecalis* ATCC 9790 exponenciális fázisú tenyészetének lízisét anionos (nátrium-dodecil-szulfát, SDS) és nemionos (Triton X-100) felületaktív anyagokkal történő exponálással idézték elő. A nátrium-dodecil-szulfátra adott lízis csak egy korlátozott koncentrációtartományban volt hatékony, míg a Triton X-100 által kiváltott lízis a felületaktív anyag koncentrációinak széles tartományában következett be. A növekvő sejtek Triton X-100-ra adott válasza alapján elmondható, hogy a sejtfeltárás hatékonysága nem a kémiai detergens koncentrációjával függött össze, hanem a sejtek mennyiségétől függött. Ebből következett, hogy a sejtek lizálása valószínűleg a felületaktív anyagnak az autolitikus rendszer citoplazmamembránhoz kapcsolódó összetevőire gyakorolt hatásának volt köszönhető (Cornett & Shockman, 1978). A Triton X-100 a növekvő *S. faecalis* sejtek autolízisét a lipoteichonsav

vagy lipid inhibitorok felszabadításával, a sejtmembrán roncsolásával, vagy esetleg egy inhibitor-autolitikus enzim-komplex destabilizálásával idézheti elő, ahogy azt Tomasz és Waks megállapította (1975).

3.3. Posztbiotikumok

A parabiotikumok mellett fontos megemlíteni a posztbiotikumokat is, melyek a mikroorganizmusokból származó, a gazdaszervezetben biológiai aktivitással rendelkező, nem életképes baktériumtermékekre vagy metabolikus termékekre utalnak (Aguilar-Toalá et al., 2018). Ilyen termékek/komponensek lehetnek a rövid szénláncú zsírsavak (SCFA-k), mikrobiális frakciók, funkcionális fehérjék/enzimek, szekretált és/vagy extracelluláris poliszacharidok (EPS), sejtízátumok, teichon és lipoteichonsavak, valamint peptidoglikánból származó muropeptidek. A közelmúltban megjelent jelentések (Gill et al., 2018; Bedford et al., 2018) szerint ezek az anyagcseretermékek élettani előnyöket kínálhatnak, amelyek valószínűleg a bélgát funkciójának és a nyálkahártya immunitásának fokozásához kapcsolódnak, daganatellenes és gyulladáscsökkentő hatásokkal a vastagbélhámra, védelemmel az immunbetegségek kialakulásával szemben, a bélmikrobióta összetételének és aktivitásának modulációjával, a kórokozók egyidejű gátlásával, az elhízás és a glükóz homeosztázis szabályozásával (Vallejo-Cordoba et al., 2020). Xin és munkatársai (2024) szintén egér kísérletekben azt találták, hogy a *L. helveticus* posztbiotikuma képes volt modulálni a T-sejtek differenciálódását, helyreállította a Th17/Treg egyensúlyt (amely az immunrendszer homeosztáziséért felelős), és csökkentette a TGF- β gyulladásgátló citokin szintjét (a TGF- β képes gátolni a pro-inflammatorikus citokinek, például az IL-1, IL-6 és TNF- α termelését, ezzel csökkentve a gyulladásos folyamatokat). Ezek a hatások hozzájárultak mind a celluláris, mind a humorális immunitás kiegyensúlyozott szabályozásához, az immunszervi károsodások helyreállításához, a bélrendszeri immungát megerősítéséhez és az immunfunkció fokozásához.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok

4.1.1. Mikroorganizmus törzsek

Vizsgálataim során a 2. táblázatban bemutatott *Lactobacillus* törzseket, illetve a 3. táblázatban található tesztorganizmusokat alkalmaztam.

2. táblázat: Probiotikus hatású baktériumok és származásuk

Probiotikus hatású baktériumok	Származás
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> HA-179	Lallemand Health Solutions
<i>Lactobacillus helveticus</i> R-52	Lallemand Health Solutions
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> HA-118	Lallemand Health Solutions
<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR01	Probiotal S.p.A.

3. táblázat: Felhasznált tesztörzsek

Tesztmikroorganizmusok
<i>Enterococcus faecalis</i> NCAIM B01312
<i>Escherichia coli</i> 8739
<i>Escherichia coli</i> O157:H7
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
<i>Enterobacter cloacae</i> NCAIM B02073

Ezen törzsek mindegyike az Élelmiszer- mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék törzsgyűjteményéből származik.

4.1.2. Felhasznált tápközegek, oldatok

MRS tápleves

A kísérlet elvégzéséhez, valamint a törzsek fenntartásához is MRS tápközeget (De Man Rogosa és Sharpe) használtam (4. táblázat) alapnak, melyben a glükózt a kísérleti tervnek megfelelően 0,5%, 1% és 2% trehalózzal helyettesítettem.

4. táblázat: MRS tápközeg összeállítása

Összetevők	Mennyiség
Mangán-szulfát	0,05 g
Magnézium-szulfát	0,2 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	2 g
Triammónium-citrát	2 g
Élesztőkivonat	4 g
Húskivonat	8 g
Nátrium-acetát	5 g
Proteóz-pepton	10 g
Glükóz	20 g
Tween 80	1 g
Desztillált víz	1000 ml

Továbbá, a kontrollként vizsgált törzsek fermentációja 1% glükózt tartalmazó tápközegben történt.

A kiindulási sejtszám megállapításához MRS agart alkalmaztam, melyhez MRS tápközeget egészítettem ki 15g/l bakteriológiai agarral.

TSB tápleves

Törzsfenntartás céljából TSB táplevest készítettem. Ennek összetételét az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: TSB tápleves összetétele

Összetevők	Mennyiség
Tripton	15 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Desztillált víz	1000 ml

A TSB agar összeállításához a TSB levest 13 g/l agarral egészítettem ki.

Fiziológiás sóoldat

A 6. táblázat tartalmazza a fiziológiás sóoldat összetételét, melyet a sejtszám meghatározásához használtam, tizedelő hígítási sor elkészítéséhez.

6. táblázat: Fiziológiás sóoldat összetétele

Összetevők	Mennyiség
NaCl	8,5 g
Desztillált víz	1000 ml

Az elkészített tápleveseket és agarokat ezt követően autoklávvval steriliztem 121 °C-on 15 percig.

4.2. Módszerek

4.2.1. Tenyésztési módszerek

A *Lactobacillus* törzseket MRS táplevesben szaporítottam fel 10 ml-es kémcsövekben, 37°C-os termosztálás és aerob körülmények mellett. A kísérletek lebonyolítása előtt két alkalommal oltottam át a törzseket, a másodikat mindig a vizsgálat tervezett napja előtt 24 órával.

A patogén tesztörzseket TSB táplevesben szaporítottam fel a tejsavbaktériumokkal megegyező körülmények mellett.

4.2.2. Fermentáció

A fermentáció a szűkebb értelmezés szerint olyan energia nyerés, mely szerves vegyületek lebontásához kapcsolódik. Tágabb értelmezés szerint a mikroorganizmusok alkalmazása a szerves anyagok lebontására, valamint az enzim katalizálta átalakítása céljából. A fermentáció során a tejsavbaktériumokat MRS táplevest tartalmazó lombikokban szaporítottam aerob körülmények mellett. Az mintát 18 óra fermentációs idő eltelte után vettem le a 37°C-os termosztátorban tartott lombikból.

4.2.3. Sejtfeltárás

Sejtfeltárási módszerek lényege, hogy különböző behatásokkal a sejtek membránját roncsoljuk, ezzel a sejtben található összetevők kiszabadulnak. Kutatásom során kémiai, illetve fizikai módszereket alkalmaztam, hogy megtaláljam a sejtfeltárás optimális körülményeit.

4.2.3.1. Kémiai detergensek

A spektrofotometriás denzitásmérés során mindegyik detergens esetében 140 µl élő tejsavbacillus szuszpenzió mellé 70 µl oldatot adtam. A sejtnövekedést 20 órán keresztül követtem 30 perces mintavételezéssel.

CTAB oldat

A kémiai sejtlyízishez 0,45 g/l koncentrációjú cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB) oldatot használtam, amit 1:2 arányban adtam az összegyűjtött sejtekhez, majd erős vortexelés után 10 percig hagytam hatni. A hatóidő letelte után 3-szoros desztillált vízzel való átmosás segítségével távolítottam el.

SDS oldat

A nátrium-dodecil-szulfát 1 %-os oldatát alkalmaztam, melyhez 1 g SDS-t mértem ki és 100 ml desztillált vízben oldottam fel.

Triton x-100 oldat

Ehhez 1%-os oldatot készítettem, melyhez 1 ml Triton X-100 oldatot oldottam fel 100 ml desztillált vízben.

4.2.3.2. Fizikai módszerek

Hőkezelés

Ezen módszer során a sejtszuszenziót különböző időközökre 60°C-os vagy 80°C-os vízfürdőbe helyeztem, s meghatározott időközönként (10, 30, 60, 90, 120, 150 perc) mintát vettem. A hőmérséklet kiválasztásánál figyelembe vettem, hogy a fehérjék 60-100°C között denaturálódnak, a sejtmembrán ezen a hőmérsékleten „megolvad”. Ennél a módszernél a magas hőmérséklet volt a sejtroncsolódás okozója.

Szonikálás

A szonikáláshoz ultrahangos vízfürdőt használtam, jéggel feltöltve, 5 másodperces hatóidővel, melyet 5 másodperc szünet követett, ezt 10 percen keresztül ismételtam.

Fagyasztás felolvasztás

A mintákat teljes fagyásig -18°C-os fagyasztószekrénybe helyeztem, majd szobahőmérsékleten hagytam kiolvadni. Ezt a folyamatot hatszor ismételtam meg.

4. 2. 3. Sejtek életképességének vizsgálata

A feltárt sejtek esetében megvizsgáltam, hogy a feltárási módszer eredményeként a sejtek elhaltak-e. Ehhez a feltárt sejtekből 200 µl mennyiséget MRS táplevesbe oltottam vissza, majd 37°C-on inkubáltam őket 4 napon keresztül. A mintákat szemrevételezéssel értékeltem az első és a negyedik napon. Amennyiben az utolsó nap sem volt látható jele a szaporodásnak, a sejtfeltárási módszert sikeresnek könyveltem el.

4.2.4. Centrifugálás

A fázisokat a sejtörmékek kinyerése céljából centrifugával választottam szét. 10 percen keresztül centrifugáltam minden mintát 4 °C-on, 10000 rpm fordulatszám mellett. Ezt követően a felülúszót leöntöttem, majd a sejtörmeléket desztillált vízbe oldottam, erős vortexeléssel homogenizáltam.

4.2.5. Agardiffúziós módszer

Az agardiffúziós módszer alapja, hogy TSB agarral lemezöntést követően a még folyékony, 45°C-ra visszahűtött agarba elkevertem a kórokozó törzseket. Az agar megszilárdulása után egy speciális 8 mm átmérőjű lyukvágóval bemélyedéseket készítettem az agarba, melyekbe 100µl feltárt tejsavbaktérium szuszpenziót pipettáztam. A Petri-csészéket a beoltást követően egy órára hűtőszekrénybe helyeztem, majd 24 órán keresztül inkubáltam 37°C-on. Az egy napos inkubálási idő lejárta után a lemezeken az általam vájt lyukak körüli feltisztulási zónák jelezték az antimikrobás hatást a lemezre oltott kórokozóval szemben.

4.2.6. Spektrofotometriás sejtnövekedés követés

Az UV/Vis spektrofotometriás optikai denzitás (OD) mérés gyakran használt technika a sejtkoncentráció becslésére folyadékkultúrában. A sejtömeg növekedésével arányosan növekszik az optikai denzitás is, melyet 600 nm-en követtem 20 órán keresztül, 30 perces mintavételezéssel, 37°C inkubációs hőmérséklet mellett Multiskan Sky UV/Vis mikrolemez olvasó segítségével. A mintákat 3 párhuzamosban vizsgáltam, az ezekből származó eredmények átlagával dolgoztam. A szaporodási/ gátlási görbéket diagrammokon ábrázoltam, mint az abszorbancia változása az idő függvényében. A vizsgálatokat három csoportba osztottam:

Szaporodási görbék

Ezek esetében a megfelelő tápközegből 200 µl mennyiséget pipettáztam a zsebekbe, majd 10 µl kiindulási sejtsuszpenzióval oltottam be mindegyiket.

Gátlás nyomonkövetése

Ezen vizsgálatoknál a parabiotikumok patogén baktériumok ellen kifejtett gátló hatására voltam kíváncsi. Ezért 200 µl tápközeghez 25 µl patogén baktériumszuszpenziót, valamint 25 µl parabiotikumot adtam.

Sejtfeltárási módszerek hatása

A sejtfeltárási hatékonyságának vizsgálatánál 140 µl élő sejteket tartalmazó sejtszuszpenzióhoz adtam 70 µl kémiai detergenst (CTAB, SDS, Triton X-100).

Fajlagos szaporodási sebesség és generációs idő számítása

A sejtek szaporodását a generációs idővel (t_{gen}) is jellemeztem, melyet az adott mikroorganizmus szaporodási görbéjének exponenciális szakaszára illesztett egyenes alapján határozzam meg. Az egyenes meredeksége a fajlagos szaporodási sebességet adta (μ), majd az alábbi kinetikai képlet hasznáival kaptam meg a generációs időt percben:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\log x_2 - \log x_1}{t_2 - t_1} = \frac{\log \Delta x}{\Delta t} = \frac{\mu}{2,303}$$

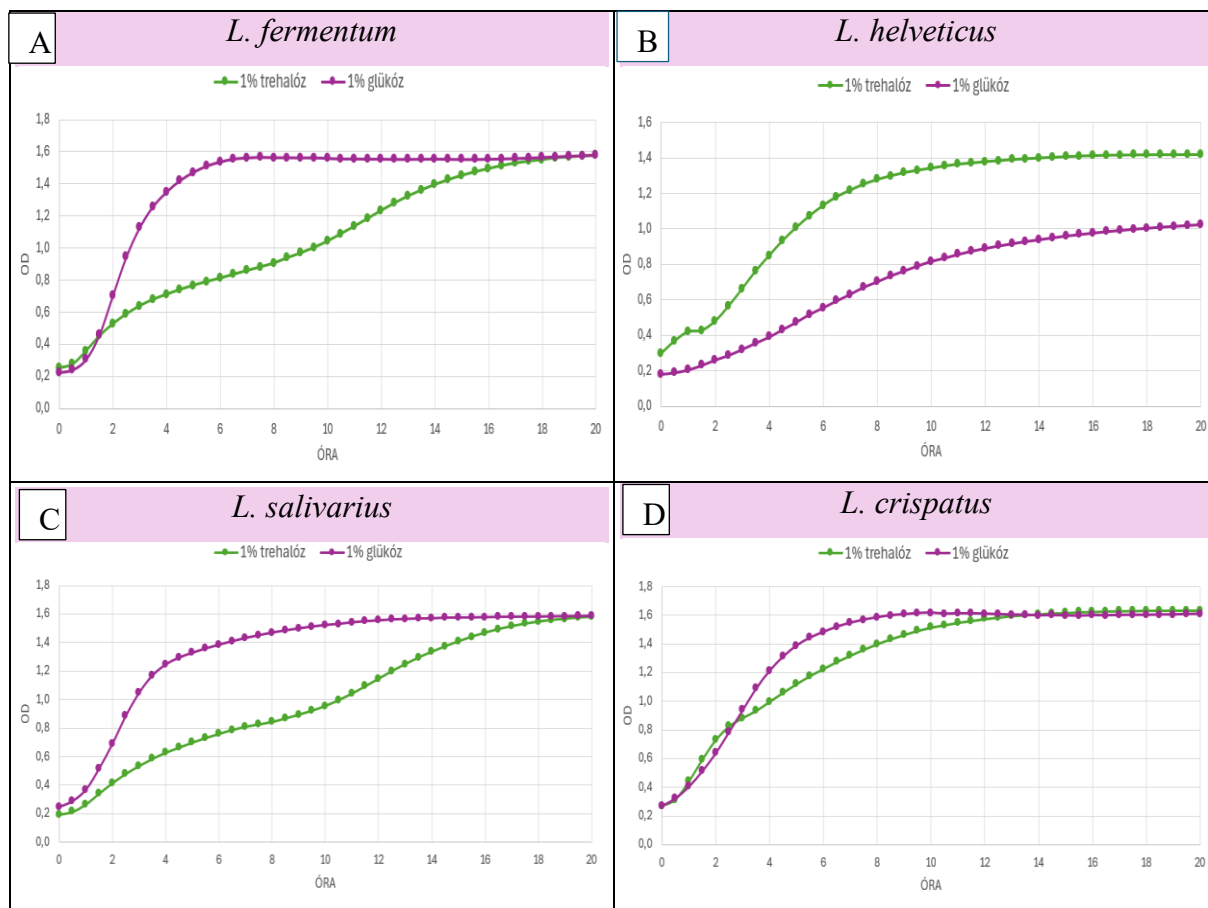
$$\frac{0,693}{\mu} = t_{gen}$$

5. Eredmények és értékelésük

Eredményeim során vizsgáltam a különböző sejtfeltárási módszerek hatékonyságát *Lactobacillus* törzsek feltárására, valamint az ilyen módon létrejött parabiotikumok antimikrobás hatását élelmiszerpatogének ellen. Vizsgálataim kiterjedtek fizikai és kémiai sejtfeltárási módszerekre, a felszaporító tápközeg szénhidrát tartalmának és mennyiségének befolyásoló tulajdonságára. Kutatómunkám alapjául a korábbi kutatási eredményeimet (Liebl, 2023) használtam fel. Ebben megállapítottam, hogy az általam alkalmazott tejsavbaktériumok fermentációs tápközegének a legjobb trehalózt tartalmazó MRS levest használni, majd 18 óra fermentáció után a sejtfeltárást javasolt kémiai detergenssel elvégezni. Ezzel jelentős antimikrobás hatást érhetünk el a patogén mikroorganizmusok gátlása terén.

5.1 A tápközeg szénhidrát tartalmának hatása

Az egyes tejsavbaktériumok szaporodását befolyásoló szénhidrátok mikroba gátló tulajdonságra vonatkozó hatását kívántam meghatározni. Chen és munkatársai (2007) kutatásaik eredményeként leírták a trehalóz bakteriocin termelést fokozó hatását. A trehalóz esetleges serkentő hatásának vizsgálatát megelőzően a 4 probiotikus tejsavbaktérium szaporodását kívántam nyomon követni ezen szénhidrátot tartalmazó közegben. Kontrollként 1% glükóz tartalmú MRS levest alkalmaztam. Az optikai denzitás változásával detektálható sejtnövekedést a 4. ábrán szemléltetem.



4. ábra: A vizsgált tejsavbacillusok szaporodási görbéje 1% trehalóz és 1% glükóz tartalmú MRS levesben A: *L. fermentum*, B: *L. helveticus*, C: *L. salivarius*, D: *L. crispatus*

Ezen eredményekből látható, hogy a glükóz tartalmú MRS táplevesben a laktobacillusok stabilabb növekedést mutattak, gyorsabban elérték a stacioner fázist, míg a trehalóz tartalmú tápközegben a négy törzs eltérően növekedett. Az adatok alapján meghatározott fajlagos szaporodási sebességet és generációs időt a 4. ábrán mutatom be. Az 1% trehalózt tartalmazó tápközegben a *L. fermentum* és *L. salivarius* hasonló görbét rajzolt, esetükben a trehalózhoz való alkalmazkodás is felfedezhető, és a törzsek csak egy kisebb stressz után folytatták az exponenciális szaporodást. Ezzel szemben a *L. helveticus* és *L. crispatus* a trehalóz jelenlétében is a kontrollhoz hasonlóan nőttek. Esetükben is felfedezhető a stressz, de képesek voltak 1-2 óra alatt hozzászokni a szénforrás változásához. A trehalóz tartalmú tápközegben a stacioner fázis mindegyik mikroba esetében csak később következett be a kontrollhoz viszonyítva. A generációs időt és a fajlagos szaporodási sebességet a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: Generációs idő és fajlagos szaporodási sebesség

	Generációs idő (óra)		Fajlagos szaporodási sebesség (1/óra)	
	1% glükóz tartalmú tápközeg	1% trehalóz tartalmú tápközeg	1% glükóz tartalmú tápközeg	1% trehalóz tartalmú tápközeg
Mikroorganizmus				
<i>L. fermentum</i>	1,95 perc	12,8 perc	0,36	0,054
<i>L. helveticus</i>	10,36 perc	5,07 perc	0,0669	0,166
<i>L. salivarius</i>	2,09 perc	9,46 perc	0,3312	0,0732
<i>L. crispatus</i>	2,56 perc	5,48 perc	0,2697	0,1264

Ahogy az a generációs időkből is látható, a baktériumok lassabban növekednek trehalóz tartalom mellett, mely valószínűleg a stressz következtében alakul így.

5.1.1 Trehalóz koncentrációjának változtatása

Mivel a trehalóz jelentős hatással bír a probiotikus baktériumok stresszre adott válasza esetén, így vizsgálata az antimikrobás tulajdonság tekintetében is nagy jelentőségű. Ezért arra voltam kíváncsi, hogy a trehalóz koncentrációjának változtatása hogyan befolyásolja a felszaporított törzsek antimikrobás hatását. Ehhez 0,5%, 1% és 2% trehalózzal egészítettem ki az MRS táplevest, majd agardiffúziós módszer segítségével vizsgáltam a mintákat. A kísérlet során a *L. salivarius* HA 118 törzset használtam tesztorganizmusként. Az elért eredményeket a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: *L. salivarius* különböző koncentrációjú trehalózt tartalmazó MRS táplevesben felszaporított, 18 óra fermentáció után CTAB sejtfeltárással feltárt parabiotikumának antimikrobás hatása

Kórokozó mikroorganizmus	Feltisztulási zóna mértéke (mm)		
	0,5% trehalóz	1% trehalóz	2% trehalóz
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	3	2
<i>Escherichia coli</i> 8739	3	2	3
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2	2,5	2,5
<i>Listeria</i>	2	3	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3	2

Az eredményekből látszik, hogy az 1% trehalózt tartalmazó tápközegben fermentált tejsavbaktérium fejti ki a legjobb antimikrobás hatást, ugyanis ebben az esetben az *E. faecalis*,

az *E. coli* O157:H7, a *Listeria*, és az *E. cloacae* esetében is a legnagyobb gátló zóna volt megfigyelhető. A koncentráció további növelésével a gátló hatás nem fokozódott. Ezek mellett fontos megemlíteni, hogy a gátlási zónák közti különbségek nem voltak jelentősek, főleg az 1% és a 2% trehalóz tartalom között, így a gazdaságosságot is szem előtt tartva a további vizsgálataimhoz 1% trehalózt tartalmazó tápközeget használtam. A különbségeket szemlélteti az 5. ábra is.



0,5= 0,5% trehalóz használata

1= 1% trehalóz használata

2= 2% trehalóz használata

5. ábra: Különböző trehalóz koncentrációjú tápközegekben felszaporított *L. salivarius* törzsből nyert parabiotikum gátló hatása az *E. coli* O157:H7 törzs ellen

5.1.2 A sejttömeg tartalom hatásának vizsgálata

A továbbiakban a sejtfeltáráshoz használt sejttömeg mennyiségének hatását vizsgáltam a feltisztulási zónák méretére, melyhez 25, 50 és 100 ml fermentléből gyűjtöttem össze a sejttörmelékét. Az előző vizsgálat során 25 ml fermentléből nyertem ki a sejteket, ezeket az eredményeket próbáltam fokozni a gátló hatás tekintetében. A kísérlethez tesztorganizmusként a *L. helveticus* törzset választottam. Az agardiffúziós módszer során kapott eredményeket a 9. táblázatban szemléltetem.

9. táblázat: Különböző mennyiségű fermentléből összegyűjtött és CTAB oldattal feltárt sejtek antimikrobás hatása, (1% trehalóz, 18 óra fermentáció)

	Feltisztulási zóna mértéke (mm)		
	25 ml fermentléből származó sejtek	50 ml fermentléből származó sejtek	100 ml fermentléből származó sejtek
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2	3
<i>Escherichia coli</i> 8739	2	2	2
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2	2	3
<i>Listeria</i>	3	2	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	3

Az eredmények alapján a 25 ml, 50 ml és 100 ml tenyészléből összegyűjtött, majd sejtfeltárással előállított sejtszuspenziók antimikrobás hatása között csak minimális eltérést tapasztaltam, azt is csak az 50 ml és a 100 ml fermentléből kinyert minták esetében. A feltisztulási zóna mértékének fokozódása nem is minden patogén esetében volt látható. Az *E. coli* 8739 és a *Listeria* törzsek ellen nem volt jelentős hatékonyságnövekedés a kiindulási sejttömeg mennyiségének növelése révén. Mivel a 100 ml minta összegyűjtése technológiai megközelítésből nehézségekkel járt, valamint az eredmények tekintetében csak minimális fokozó hatást mutatott, így a továbbiakban a 25 ml tenyészléből összegyűjtött sejttörmeléssel dolgoztam. Ennek ellenére a jövőben más módszerrel érdemes lehet a sejtmennyiséget növelni és ezzel az antimikrobás hatást is fokozni.

Összefoglalva az eddigi kísérletek során optimálisnak vélt körülményekkel dolgoztam tovább, amik az alábbiak voltak: 1% trehalózt tartalmazó MRS táplevesben 18 óra alatt felszaporított, 25 ml fermentléből összegyűjtött sejtekkel teszteltem a sejtfeltárási módszereket.

5.2 Sejtfeltárási módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata parabiotikum előállítására

A parabiotikumok előállítására fizikai és kémiai sejtfeltárási módszereket is alkalmaztam. A fizikai módszerek esetében közvetlenül az antimikrobás hatást vizsgáltam, míg a kémiai módszerek esetében egy előzetes kísérlet során spektrofotométer segítségével kívántam megállapítani, hogy az adott detergens képes-e (és amennyiben igen mennyi idő alatt) a tejsavbaktériumok elölését kiváltani.

5.2.1 Fizikai módszerek

5.2.1.1 Szonikálás

A szonikálás az intracelluláris kavitáció okán roncsolja a sejteket. Ismételt ultrahangos kezelés és szüneteltetés alkalmazásával állítottam elő sejttörmelékeket, melyek antimikrobás hatását vizsgáltam. A módszer által kiváltott hatásokat a 10. táblázat tartalmazza. A szonikálás esetében a *L. fermentum* mikroorganizmusból kinyert parabiotikum gátló hatást fejtett ki az *Enterococcus faecalis* és az *Escherichia coli* 8739 ellen. A *L. helveticus* szonikálással feltárt sejtalkotói esetében csak a *Listeria* ellen alakult ki minimális gátló hatás. A *L. crispatus* esetében csak egyetlen patogén ellen figyeltem meg minimális feltisztulási zónát, míg a *L. salivarius* esetében nem volt kimutatható gátló hatás egyik patogén ellen sem ezen módszer használatával.

10. táblázat: Szonikálással feltárt parabiotikumok antimikrobás hatása

("-": nem volt látható feltisztulási zóna; "+": feltisztulási zóna jelent meg /nagyjából 1 mm/)

	Gátlási zónák kialakulása/mértéke			
	<i>L. fermentum</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. crispatus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> 8739	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-
<i>Listeria</i>	-	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-

Összességében ezen módszer alkalmazásával specifikus gátló hatásokat el lehet érni, de a hatás fokozása indokolt lehet. A szonikálás kezelési ciklus számának emelésével elérhető hatás növekedését, a jövőben még érdemes lenne vizsgálni.

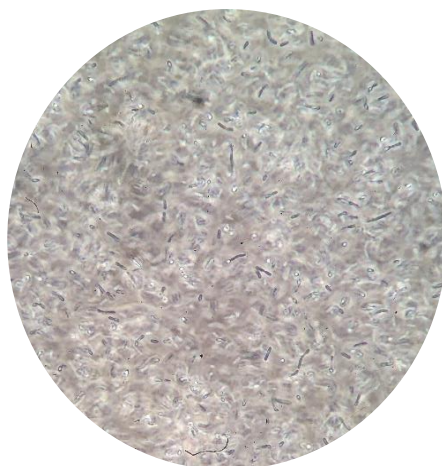
5.2.1.2 Fagyasztás- felolvasztás

A 25 ml mintából összegyűjtött probiotikus sejtek sorozatos lefagyasztása, majd felengedtetése eredményeként képzett parabiotikum gátló hatását is agardiffúziós módszerrel teszteltem. Megállapítottam, hogy e vizsgált sejtfeltárási módszer nem mondható sikeresnek, ugyanis esetében nem alakult ki gátló hatás, mely detektálható lett volna egyetlen patogén baktérium esetében sem. A módszer ezek mellett időigényes, így további vizsgálatokat nem végeztem a használatával.

5.2.1.3 Hőkezelés

Korábbi munkáimból kiderült, hogy amellet, hogy a hőkezelés a leggazdaságosabb, legkevesebb időbefektetéssel járó sejtfeltárási módszer, még némely esetben gátló hatást is képes indukálni az ilyen módon feltárt parabiotikum. A módszer optimalizálása céljából a hőkezelés időtartamának hatását vizsgáltam az így előállított parabiotikumok antimikrobás tulajdonságára. Ehhez a trehalózban felszaporított tejsavbaktériumokat 60°C vízfürdőbe helyeztem és különböző időközönként mintát vettem: 30 perc, 60 perc, 90 perc, 120 perc, valamint 150 perc. Az életképesség ellenőrzésére a hőkezelt sejtszuszpenzióból MRS tápközegbe oltottam. Az MRS táplevesbe való visszaoltás után 48 órával azonban a jelentős sejtnövekedés volt tapasztalható, még a 150 percig hőkezelt minták esetében is. Ezért ezen minták esetében nem végeztem el az antimikrobás hatás vizsgálatot, hiszen a sejtfeltárási módszer nem eredményezte a sejtek lizálását. Ez ellentétben Salinas és munkatársai (2008) által MRS tápközegben felszaporított *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* és *Bacillus subtilis* hővel való előlérésére alkalmazott kezelésétől. Ők ugyanis 1 óra alatt 60°C-on megvalósított hőkezeléssel sikeresen inaktiválták a baktériumokat. A mintákat mikroszkóp segítségével is

szemrevételeztem, melyben látszódtak az ép és életképes laktobacillusz formák. Ez látható a 6. ábrán is.



6. ábra: *L. fermentum* 60°C 120 perces kezelés utáni mikroszkópos képe (100x-os nagyítás)

Ezt követően a hőmérséklet további emelésével próbáltam a sejteket előlni. Ennek okán 80°C-os vízfürdőt alkalmaztam az előbbi kísérlettel megegyező paraméterek mellett, majd 10 perc, 30 perc, 60 perc, és 120 perc elteltével mintát vettem és tizedelő hígítást követő lemezöntéssel meghatároztam a sejtszámot a hőkezelés követően. Az eredmények alapján ebben az esetben is életképes maradt mind a 4 vizsgált probiotikum, még a 2 órás hőkezelést kapott sejtek esetében is. A sejtszám meghatározása során az alábbi eredményeket kaptam 48 órás szaporítást követően:

- *L. fermentum*: $2,1 \cdot 10^8$ tke/ml
- *L. helveticus*: $1,81 \cdot 10^9$ tke/ml
- *L. salivarius*: $4,01 \cdot 10^9$ tke/ml
- *L. crispatus*: $4,2 \cdot 10^8$ tke/ml

Az eredmények arra utalnak, hogy főleg a *L. helveticus* és *L. salivarius* esetében nagyobb mennyiségű sejt maradt életben, de a *L. fermentum* és a *L. crispatus* is jelentős sejttömeget tudott létrehozni a korábban hő sokknak kitett sejtjeiből. Ez az eredmény valószínűleg a trehalóz védő mechanizmusának köszönhető, ahogy azt Jain & Roy (2009) megállapították a trehalóz képes a fehérjék és a membránok védelmére hővel szemben is. Martins és munkatársai (2008) által is megállapított tény, hogy a trehalóz intracelluláris felhalmozódása termotoleránssá képes tenni a probiotikus mikroorganizmusokat, így a következő kísérlet során ezt próbáltam megerősíteni. Ehhez a 120 perc 80°C hőkezelést kapott mintákat glükóz tartalmú MRS levesbe

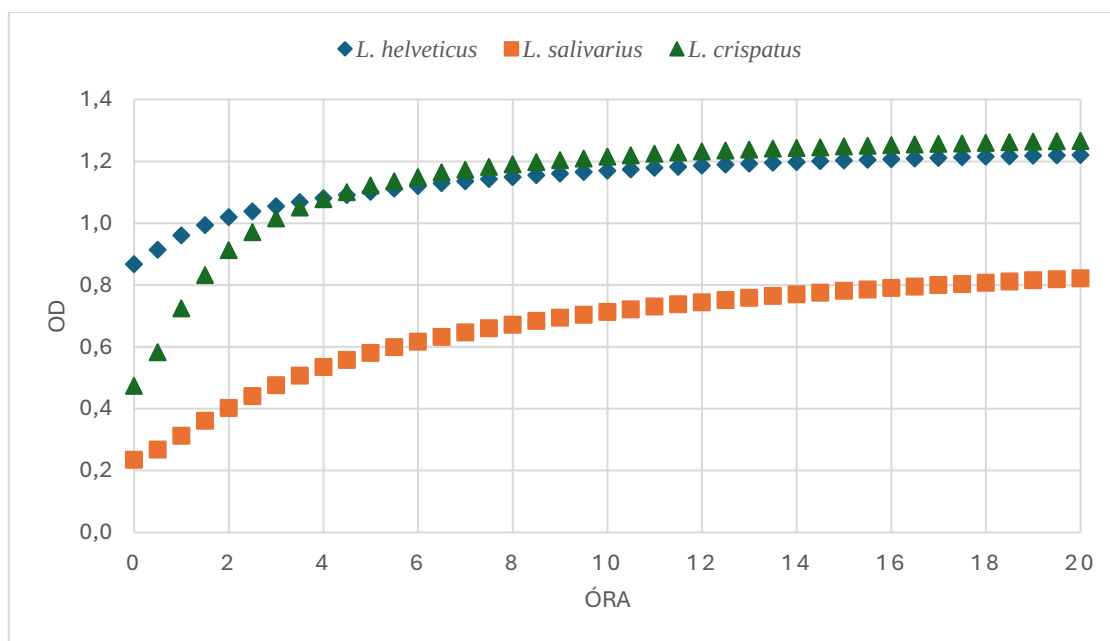
oltottam vissza, majd a felszaporodásuk után szintén 80°C-os vízfürdőbe helyeztem őket. 10 perces és 2 órás hőkezelést követően mintát vettem a kezelt sejtekből, s MRS táplevesbe oltottam. 48 órás inkubálást követően megállapítható volt, hogy a 10 perces hőkezelés után mind a négy probiotikus törzs életképes maradt, míg a 2 órás hőkezelést egyik tejsavbaktérium sem élte túl. Ezekből arra következtettem, hogy a trehalóznak jelentős védő szerepe van a sejteket ért hősokk esetében. Így a további vizsgálatok esetében szem előtt kell tartani, hogy jelentősen emelt hőmérséklet és időtartam esetében lehet elérhető a sejtek roncsolása ezen tápközeg mellett.

5.2.2 Kémiai módszerek

A korábbi vizsgálataimban a legjelentősebb antimikrobás hatást kémiai detergens (CTAB) használatával értem el, ezért is terelődött a figyelmem más kémiai detergensok kipróbálása felé. Ezeket, mint potenciális sejtfeltárási detergenseket vizsgáltam, és arra voltam kíváncsi, hogy alkalmazásukkal az általam választott tejsavbacillusok esetében elérhető-e a lizálás paraprobiotikum előállítására. A probiotikumok szaporodási képességét spektrofotométer segítségével mértem, 96 lyukú lemez használatával, melyben triplikátokban dolgoztam.

5.2.2.1 SDS oldat hatása

Az SDS oldat esetében is azt vizsgáltam, mennyire képes előltni a probiotikumokat az idő függvényében. Ezeket a 7. ábra mutatja.

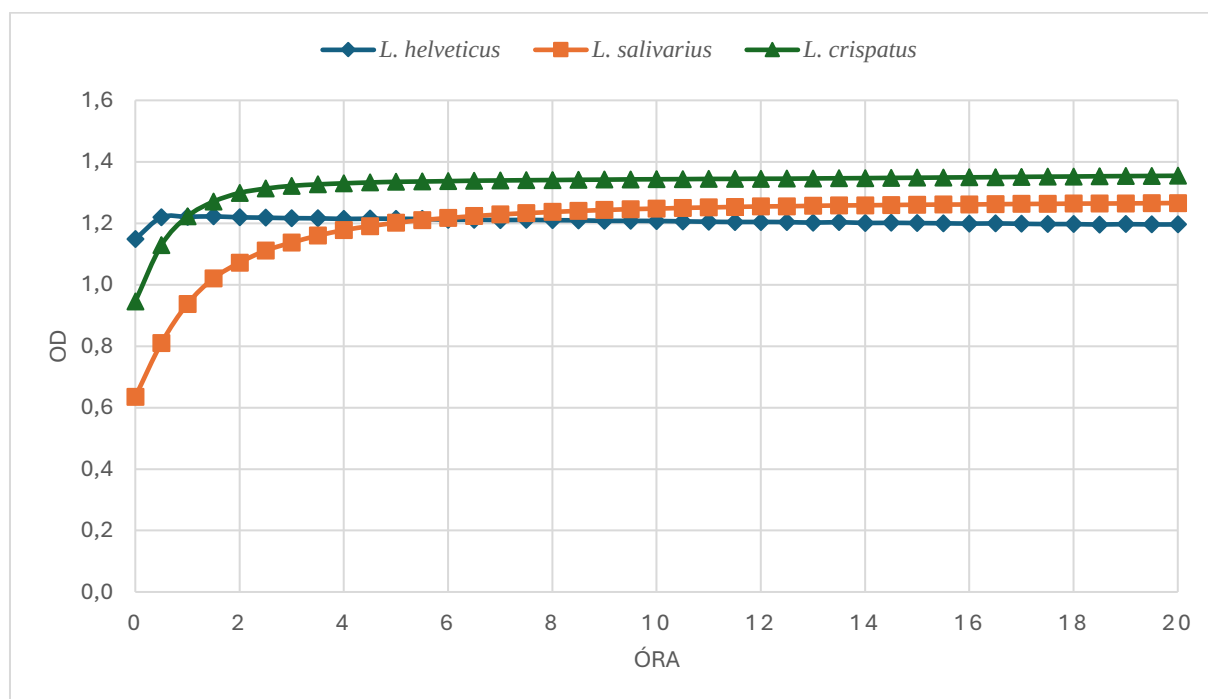


7. ábra: SDS 1%-os oldata 1:2 arányban alkalmazva a különböző tejsavbacillusok ellen

Az eredmények szerint az SDS detergens az általam alkalmazott koncentrációban vagy mennyiségben nem volt elegendő a tejsavbaktériumok teljes elölésére. Részlegesen lassította, gátolta a szaporodásukat, de a denzitás változása alapján a sejttömeg növekedése nem állt meg még 18 óra után sem. Így megállapítható, hogy az SDS detergenst sejtfeltárási célból alkalmazva tejsavbaktériumok esetében javasolt nagyobb mint 1:2 arányban alkalmazni a sejtszuszpenzió, vagy töményebb oldat készítése ajánlott.

5.2.2.3 Triton X-100

A Triton X-100 széles körben alkalmazott kémiai sejtfeltárási detergens, ezért alkalmazása a kísérleteimben is releváns lehet. Ehhez 1%-os oldatot 1:2 arányban adtam a sejtszuszpenzióhoz és a probiotikum szaporodására gyakorolt hatását időben detektáltam. Ezt szemlélteti a 8. ábra.



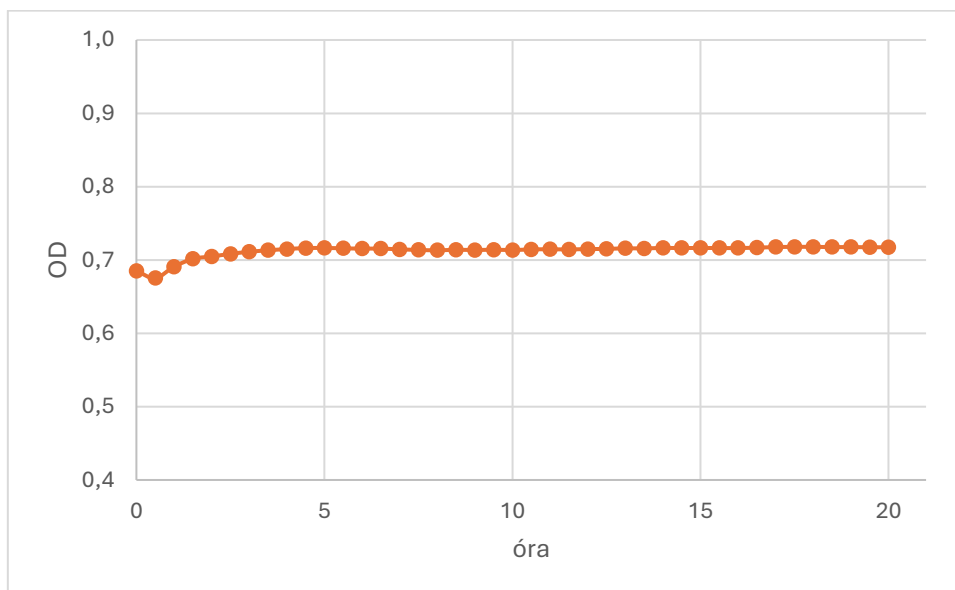
8. ábra: Triton X-100 detergens által kifejtett hatás a tejsavbaktériumok szaporodására

A diagram adatai alapján elmondható, hogy az adott kémiai detergens eltérő mértékben fejt ki a hatását a sejtekre. A *L. helveticus* mutatta a legnagyobb érzékenységet, esetében már 30 perc után teljesen megállt a szaporodás. A második legérzékenyebbnek a *L. crispatus* mutatkozott, aminél ezen koncentráció 2 óra hatóidő után mutatott teljes gátlást. A legellenállóbb a *L. salivarius* volt, amely esetében 6 óra letelte után alakult csak ki a gátló hatás.

5.2.2.1 CTAB oldat

A CTAB oldat esetében szinte minden alkalmazáskor detektáltam antimikrobás hatást agardiffúziós módszerrel. Ehhez 10 perces hatóidővel alkalmaztam a detergenst a sejteken, majd alapos átmosás után vizsgáltam a probiotikumok patogének ellen kifejtett hatását. Ebben a kísérletben spektrofotométer segítségével detektáltam a tejsavbaktériumokra kifejtett, már

bizonyított antimikrobás hatását az idő függvényében. Ebben az esetben is a teljes lizálás tényét szerettem volna szemléltetni. Ehhez a vizsgálathoz a *L. helveticus*-t választottam tesztmikroorganizmusnak. Az eredményeket a 9. ábra tartalmazza.



9. ábra: CTAB sejtfeltáró hatása a *L. helveticus* esetében

A diagramból látható, hogy a CTAB a *L. helveticus* ellen gyorsan fejti ki hatását, mely esetében már a 30 perces mintavételnél teljesen leállt a sejtszaporodás, melyből arra következtetnek, hogy a sejtek ennyi időn belül elhaltak. Így az eddig alkalmazott 10 perces kezelés elégnek bizonyul a sejtek teljes elölésére, azaz paracellulóz elpusztítására.

Ezen eredmények tekintetében elmondható, hogy az általam alkalmazott koncentrációban leghatásosabb detergensnek a CTAB oldat mutatkozott, de jelentős lehet a Triton X-100 hatása is. Az SDS, mint sejtfeltáró detergens ebben a formában nem volt elég hatékony, így ennél a koncentráció optimalizálása mellett lehet csak további vizsgálatokat végezni.

5.3. Különböző sejtfeltérési módszerek egymásra gyakorolt hatása

A kémiai sejtfeltérások után a sterilitás elérése érdekében 10 perces 80°C hőkezelést alkalmaztam. Ezeknél az eseteknél felmerült a különböző sejtfeltérési módszerek együttes alkalmazásából eredő esetleges erősítő hatás, mely befolyással lehet az antimikrobás tulajdonságra is. Erről többek közt Shehadul és munkatársai (2017) írtak. Eredményeik alapján a kémiai és fizikai sejtfeltérési módszerek együttes alkalmazása erősíti egymás hatékonyságát, ezáltal a lízist is befolyásolják. Ennek tisztázása érdekében a 80°C-os hőkezelést és a CTAB oldattal való sejtfeltérést kombináltam, kontrollként a hőkezelés nélküli, steril körülmények

között megvalósított CTAB oldatos sejtfeltárási műveletet alkalmaztam. Az antimikrobás hatást agardiffúziós módszerrel vizsgáltam, melynek eredményeit a 11. táblázat tartalmazza.

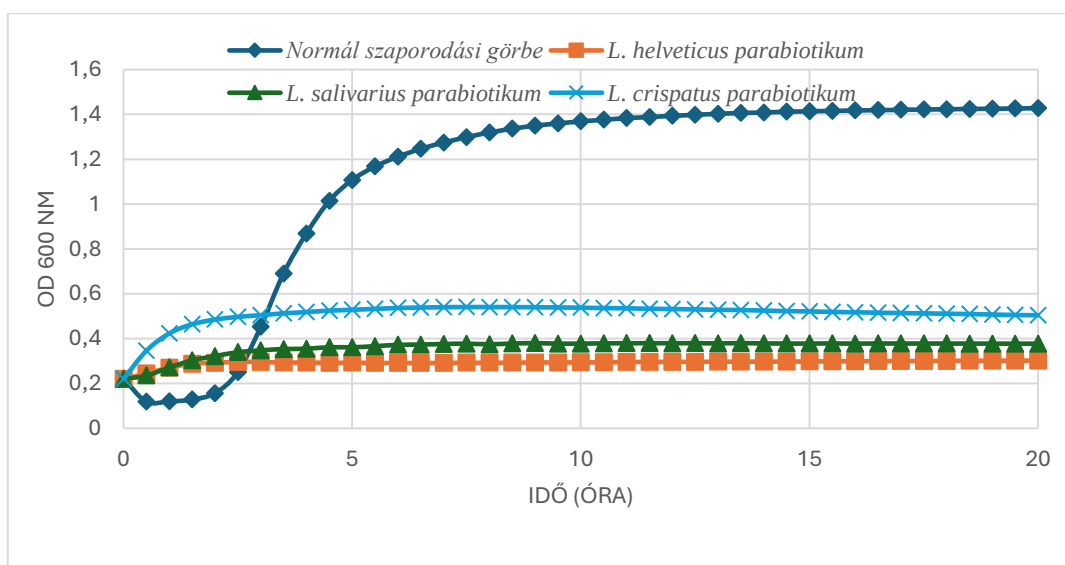
11. táblázat: A kémiai és fizikai sejtfeltárási módszerek együttes hatása az antimikrobás tulajdonságra („+”: 1 mm feltisztulási zóna; „++”: 2 mm feltisztulási zóna)

	<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Lactobacillus salivarius</i>		<i>Lactobacillus crispatus</i>	
	CTAB	CTAB+HŐ	CTAB	CTAB+HŐ	CTAB	CTAB+HŐ
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	++	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 8739	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	++	++	+	+	+	+
<i>Listeria</i>	++	++	+	+	++	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	++	++	+	+	+	+

A táblázat alapján elmondható, hogy azon minták esetében, ahol plusz hőkezelést alkalmaztam, és azok között, ahol nem, nincs különbség az antimikrobás hatás tekintetében, így a kombinált kezeléssel nem érhető el az antimikrobás hatás fokozása. Továbbá ezen kísérletből az is megállapítható, hogy az antimikrobás tulajdonságért felelős komponens hőstabil, 10 perc 80°C hőkezelést követően is hatékonyan gátolja kórokozó mikroorganizmusok szaporodását.

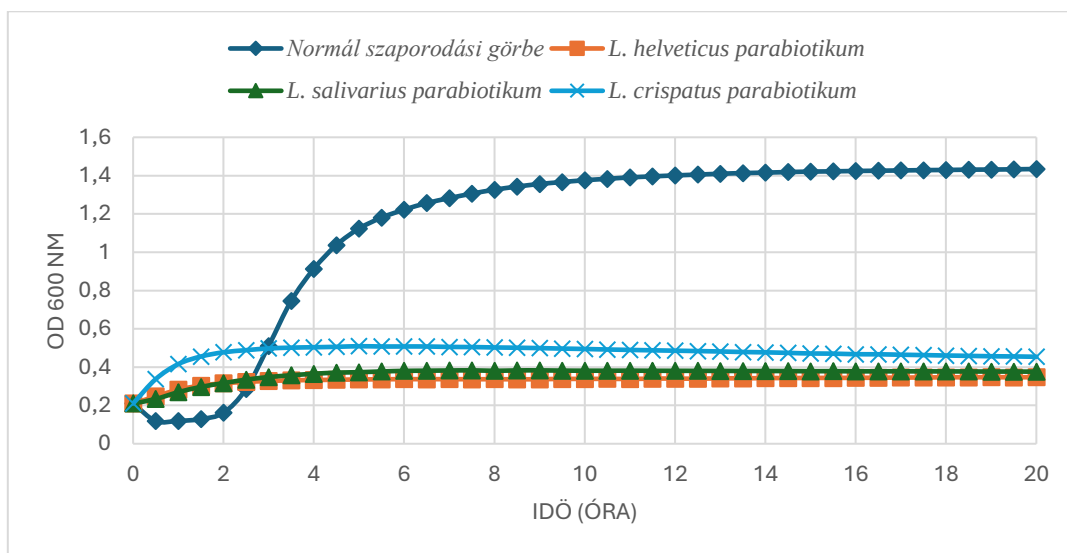
5.4 Különböző probiotikum eredetű parabiotikumok gátló hatásának vizsgálata

Mivel a CTAB oldat mutatkozott továbbra is leghatékonyabb módszernek a sejtek feltáráására, így ezen módon előállított parabiotikumok patogénekre kifejtett gátló hatását spektrofotométer segítségével is végig követtem 20 órás TSB tápközegben megvalósított szaporítás során. A patogén baktériumok ellen kifejtett gátló hatást jól szemlélteti a 10., 11., 12., 13., és 14. ábra.



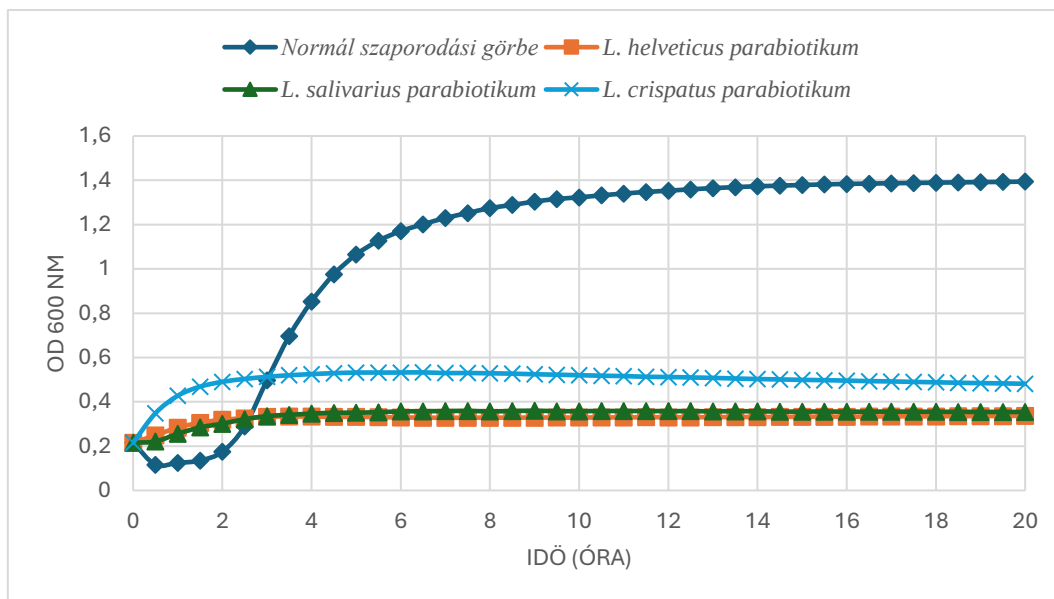
10. ábra: *E. faecalis* szaporodásának alakulása különböző probiotikum eredetű parabiotikumok mellett

Az *E. faecalis* esetében a legnagyobb gátló hatást a *L. helveticus* parabiotikummal sikerült elérni, a 600 nm-en mért optikai denzitás, nem haladja meg a 0,3 értéket. A *L. crispatus* parabiotikuma esetében a gátlás kialakulása előtt a tesztmikroorganizmus nagyobb mértékben indult növekedésnek a többi tejsavbaktériumhoz képest. Fontos azonban kiemelni, hogy mindegyik tejsavbaktérium parabiotikuma képes volt 2 órán belül teljesen gátolni az *E. faecalis* szaporodását és ez a hatás nem változott a 20 órás szaporítás során.



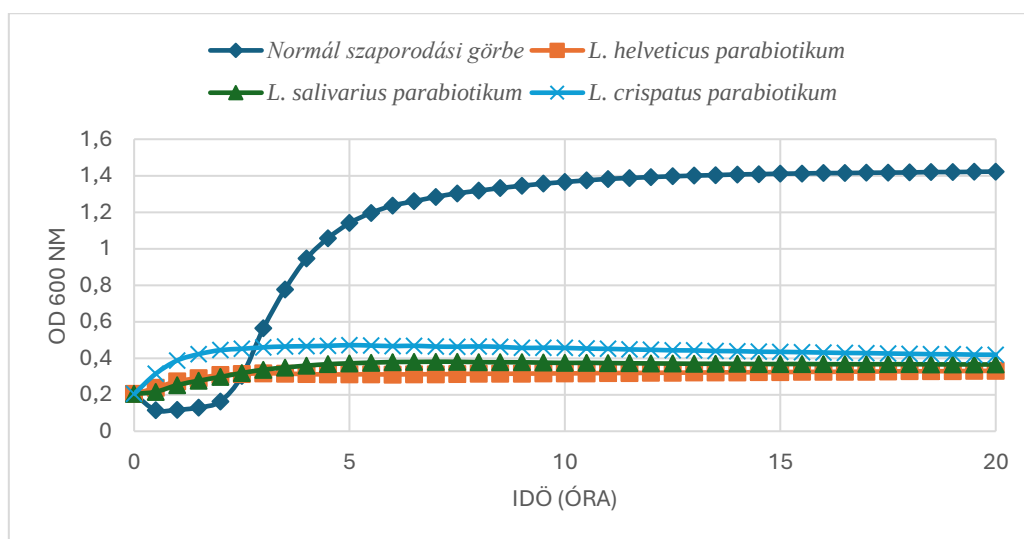
11. ábra: *E. coli* 8739 szaporodásának alakulása különböző probiotikum eredetű parabiotikumok mellett

Az *E. coli* 8739 törzse ellen is kialakult a gátló hatás. A *L. helveticus* és a *L. salivarius* hasonló görbét ír le, ezen két tejsavbaktérium parabiotikuma mutatkozott a leghatásosabbnak. Az *E. faecalis* elleni gátló hatáshoz hasonlóan ebben az esetben is a jelentősebb volt a tesztorganizmus szaporodása a *L. crispatus* parabiotikuma mellett (OD , azonban a többi parabiotikumhoz hasonlóan gyorsan kialakult a szaporodás megfékezése, mely az egész vizsgált időintervallum alatt kitartott.



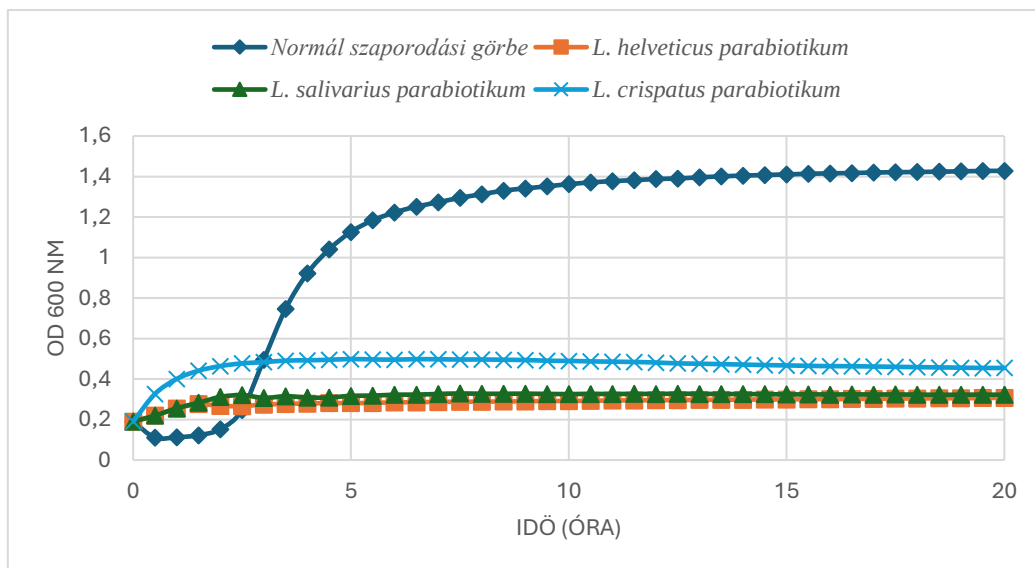
12. ábra: *E. coli* O157:H7 szaporodásának alakulása különböző probiotikum eredetű parabiotikumok mellett

Az *E. coli* O157:H7 törzse, mely egy jelentős élelmiszerpatogén szintén gátolható a parabiotikum szuszpenzió használatával legalább 20 órán keresztül.



13. ábra: *Listeria* szaporodásának alakulása különböző probiotikum eredetű parabiotikumok mellett

A *Listeria* patogén baktérium ellen hatott a legjobban a *L. crispatus* parabiotikuma is. Továbbá, az összes vizsgált parabiotikum jelentős gátló hatást mutatott rövid hatóidő után.



14. ábra: *E. cloacae* szaporodásának alakulása különböző probiotikum eredetű parabiotikumok mellett

Az *E. cloacae* baktérium ellen kifejtett hatás is hasonló az előző patogén baktériumokhoz. Ebben az esetben a *L. helveticus* és a *L. salivarius* fejtette ki leggyorsabban a gátló hatását, ám a *L. crispatus* is képes volt a patogén baktérium szaporodásának megfékezésére.

Összességében elmondható, hogy az általam vizsgált összes patogént nagyjából azonos hatással képesek gátolni a parabiotikumok, ezzel is szemléltetve potenciális hasznukat az élelmiszerbiztonság területén.

6. Összefoglalás

Kutatásom eredményei alapján összefoglalásként elmondható, hogy különböző módszerekkel is elérhető parabiotikumok előállítása. A fermentációs tápközeg szénforrásának módosításával megállapítható volt, hogy az általam vizsgált tejsavbaktériumok esetében az MRS levesben található glükóz trehalózra cserélésével a sejtek stresszhatással szembesültek. Szaporodási görbéjükből látszik, hogy a változáshoz lassabban alkalmazkodtak, ám a stacioner fázist így is rövid időn belül elérték minden esetben. A trehalóz koncentrációja befolyásolja az antimikrobás hatást, a legnagyobb mértékű gátlást az 1% alkalmazásával érhetjük el, ezért javasolt ennek a használata. A kiindulási sejttömeg is hatással van a gátló hatás mértékére, ugyanakkor ezen különbség nem jelentős 25 ml, 50 ml, illetve 100 ml fermentléből összegyűjtött sejtek esetén, így a 25 ml fermentléből kinyert sejttömeggel ajánlott dolgozni.

A parabiotikumok előállítása érdekében vizsgáltam kémiai és fizikai sejtfeltérési módszereket. A hőkezelést kapott minták esetében elmondható, hogy a trehalózban felszaporított sejtek termotoleráns tulajdonsággal is rendelkeztek, melyet valószínűleg a trehalóz membránra

kifejtett védő hatása biztosított. Ezért is lehetséges, hogy a hősokkal lizálni kívánt sejtek még a 2 órás 80°C kezelést is túléltek. A szonikálás hatékonysága patogén és parabiotikum specifikus volt. Három esetben volt képes az ezzel a módszerrel feltárt sejt gátlást indukálni, így ezen módszer hatékonysága elmarad a CTAB oldatos feltáráshoz képest. A fagyasztás- felolvasztás esetében nem tudtam antimikrobás hatást detektálni, így ezen módszer nem bizonyult megfelelőnek a probiotikus parabiotikumok előállítására. A kémiai feltárások során a CTAB, az SDS és a Triton X-100 oldatokat alkalmaztam a tejsavbaktériumok előlése, melyek különböző hatékonysággal lizálták a sejteket. Ezek közül a leghatékonyabbnak a cetil- trimetil-ammónium- bromid oldat mutatkozott, de jelentős hatást lehetett felfedezni az SDS oldat esetében is, így későbbiekben alkalmazását ajánlott vizsgálni az antimikrobás hatás tekintetében is. A kémiai és fizikai sejtfeltárási módok kombinálása nincs hatással a gátló tulajdonságra, valamint vizsgálataimból kiderült, hogy a hatásért felelős komponens hőstabil. Végsősorban, az optikai denzitás mérésen alapuló módszerrel jól szemléltethető volt az előállított parabiotikumok élelmiszerpatogén törzsek ellen kifejtett gátló tulajdonsága együtt szaporítás során, ami minden esetben hosszútávú hatást biztosított, mely remek jelöltekké teszi őket élelmiszertartósítási felhasználásra.

7. Szakirodalom

1. Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114.
2. Barlow, S., Chesson, A. N. D. R. E. W., Collins, J. D., Dybing, E. R. I. K., Flynn, A. L. B. E. R. T., Fruijtjer-Pölloth, C., Hardy, A., Knaap, A., Kuiper, H., Neindre, P., Schans, J., Silano, V., Skerfving, S., Vannier, P. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J*, 587(1).
3. Becker, A., Schlöder, P., Steele, J. E., Wegener, G. (1996). The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52, 433-439.
4. Bedford, A., Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition*, 4(2), 151-159.
5. Bertuccioli, A., Cardinali, M., Zonzini, G., Cazzaniga, M., Di Pierro, F. (2022). *Lactobacillus crispatus* M247: characteristics of a precision probiotic instrument for gynecological and urinary well-being. *Microbiology Research*, 13(4), 963-971.
6. Bian, X., Wang, T. T., Xu, M., Evivie, S. E., Luo, G. W., Liang, H. Z., Yu s., Huo, G. C. (2016). Effect of *Lactobacillus* strains on intestinal microflora and mucosa immunity in *Escherichia coli* O157: H7-induced diarrhea in mice. *Current Microbiology*, 73, 65-70.
7. Birmipa, A., Sfika, V., & Vantarakis, A. (2013). Ultraviolet light and ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 96-102.
8. Calcott, P. H., & MacLeod, R. A. (1975). The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: The relative importance of wall and membrane damage. *Canadian Journal of Microbiology*, 21(12), 1960-1968.
9. Calvete-Torre, I., Sabater, C., Villamiel, M., Margolles, A., Méndez-Albiñana, P., Ruiz, L., Hernandez-Hernandez, O. (2024). Exploring the modulatory effect of trehalose-derived galactooligosaccharides on key gut microbiota groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, 273, 133053.
10. Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
11. Cebrián, G., Condón, S., & Mañas, P. (2017). Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: Mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods*, 6(12), 107.

12. Chen, A., Tapia, H., Goddard, J. M., Gibney, P. A. (2022). Trehalose and its applications in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(6), 5004-5037.
13. Chen, X. Y., Woodward, A., Zijlstra, R. T., Gänzle, M. G. (2014). Exopolysaccharides synthesized by *Lactobacillus reuteri* protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5752-5760.
14. Chen, Y. S., Srionnual, S., Onda, T., Yanagida, F. (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 190-193.
15. Cornett, J. B., & Shockman, G. D. (1978). Cellular lysis of *Streptococcus faecalis* induced with Triton X-100. *Journal of Bacteriology*, 135(1), 153-160.
16. Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., & Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502.
17. Culligan, E. P., Hill, C., Sleator, R. D. (2009). Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathogens*, 1, 1-12.
18. de Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C., Sant'Ana, A. S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 96-114.
19. de Almada, C. N., de Almada, C. N., de Souza Sant'Ana, A. (2018). Paraprobiotics as potential agents for improving animal health. *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, 247-268.
20. de Luna Freire, M. O., Cruz Neto, J. P. R., de Albuquerque Lemos, D. E., de Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., de Souza, E. L., de Brito Alves, J. L. (2024). *Limosilactobacillus fermentum* Strains as Novel Probiotic Candidates to Promote Host Health Benefits and Development of Biotherapeutics: A Comprehensive Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-16.
21. de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-2076.
22. Deák, T., Kiskó, G., Maráz, A., Mohácsiné, F. C. (2006). *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda Kiadó. Budapest, 382
23. Dinić, M., Pecikoza, U., Djokić, J., Stepanović-Petrović, R., Milenković, M., Stevanović, M., Filipović, N., Begović, J., Golić, N., Lukić, J. (2018). Exopolysaccharide produced by

- probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 reduces inflammatory hyperalgesia in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1.
24. Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian Journal of Medical Research*, 134(5), 664-671.
 25. Feng T., Wang J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review, *Gut Microbes*, 12:1
 26. Fontana, F., Alessandri, G., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Longhi, G., Anzalone, R., Viappiani, A., Ventura, M., Turrone, F., Milani, C. (2020). Probiogenomics analysis of 97 *Lactobacillus crispatus* strains as a tool for the identification of promising next-generation probiotics. *Microorganisms*, 9(1), 73.
 27. Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
 28. Gill, P. A., Van Zelm, M. C., Muir, J. G., Gibson, P. R. (2018). Short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 48(1), 15-34.
 29. Giraffa, G. (2014). *Lactobacillus helveticus*: Importance in food and health. *Frontiers in Microbiology*, 5, 338.
 30. Golding, J. W. (1996). 11 - Affinity Chromatography, *Monoclonal Antibodies* (Third Edition), Academic Press, Pages 327-351.
 31. Grigorov, E., Kirov, B., Marinov, M. B., Galabov, V. (2021). Review of microfluidic methods for cellular lysis. *Micromachines*, 12(5), 498.
 32. Huynh, U., Zastrow, M. L. (2023). Metallobiology of Lactobacillaceae in the gut microbiome. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 238, 112023.
 33. Hynönen, U., Palva, A. (2013). *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5225-5243.
 34. İncili, G. K., Akgöl, M., Karatepe, P., Kanmaz, H., Kaya, B., Tekin, A., & Hayaloğlu, A. A. (2023). Inhibitory effect of bioactive compounds derived from freeze-dried paraprobiotic of *Pediococcus acidilactici* against food-borne pathogens: In-vitro and food model studies. *Food Research International*, 170, 113045.
 35. Jain, N. K., Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18(1), 24-36.

36. Konstantinov, S. R., Kuipers, E. J., Peppelenbosch, M. P. (2013). Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(12), 741-745.
37. Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.
38. Lee, N. K., Park, Y. S., Kang, D. K., Paik, H. D. (2023). Paraprobiotics: definition, manufacturing methods, and functionality. *Food Science and Biotechnology*, 32(14), 1981-1991.
39. Liebl, R., (2023): Posztbiotikumok antimikrobás hatásának vizsgálata, Szakdolgozat
40. Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017): Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
41. Martins, F. S., Miranda, I. C., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Neves, M. J. (2008). Effect of the trehalose levels on the screening of yeast as probiotic by in vivo and in vitro assays. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 50-55.
42. Mattei, B., Franca, A. D., Riske, K. A. (2015). Solubilization of binary lipid mixtures by the detergent Triton X-100: the role of cholesterol. *Langmuir*, 31(1), 378-386.
43. Murga, M. L. F., de Valdez, G. F., Disalvo, E. A. (2001). Effect of lipid composition on the stability of cellular membranes during freeze–thawing of *Lactobacillus acidophilus* grown at different temperatures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388(2), 179-184.
44. Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Bendali, F., Spano, G., Seal, B. S., Drider, D. (2019). *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(20), 3387–3399.
45. Nouri Gharajalar, S., Kazemi-Darabadi, S., Valinezhad Lajimi, H., Shahbazfar, A. A. (2021). The roles of *Lactobacillus acidophilus* and pectin in preventing postoperative sepsis and intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 1355-1362.
46. Ohtake, S., Wang, Y. J. (2011). Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2020-2053.
47. Ou, C. C., Lin, S. L., Tsai, J. J., & Lin, M. Y. (2011). Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *Journal of Food Science*, 76(5), M260-M267.

48. Önata, E. T., Özdemir, Ö. (2024). Çocuklarda Profilaktik ve Terapötik Probiyotik Kullanımı. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 8(1), 32-43.
49. Ramkrishna, S., Chellamboli, C., Anupama, D. (2019). A revolution by probiotic and paraprobiotic in food industry: review. *Res Rev Int J Multidiscip*, 4(9), 72-81.
50. Saad, N., Urdaci, M., Vignoles, C., Chaignepain, S., Tallon, R., Schmitter, J. M., Bressollier, P. (2009). *Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(12), 1635-1643.
51. Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M. Á. (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1-2), 114-123.
52. Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannspurger, G., Huys, G. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164-185.
53. Sañudo, A. I., Luque, R., Díaz-Ropero, M. P., Fonollá, J., Bañuelos, Ó. (2017). In vitro and in vivo anti-microbial activity evaluation of inactivated cells of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 against *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 84, 58-63.
54. Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., Selvaganapathy, P. R. (2017). A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 8(3), 83.
55. Shin, H. S., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, S. A., An, H. M., Kim, J. R., Kim J, Cha MG, Lee SW, Kim, KJ, Lee K. O., Ha, N. J. (2010). Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1425-1431.
56. Shripada, R., Gayatri, A. J., Sanjay, P. (2020). Paraprobiotics. Precision medicine for investigators, Practitioners and Providers, 39-49.
57. Siciliano, R. A., Reale, A., Mazzeo, M. F., Morandi, S., Silvetti, T., Brasca, M. (2021). Paraprobiotics: A new perspective for functional foods and nutraceuticals. *Nutrients*, 13(4), 1225.
58. Souzu, H. (1989). Changes in chemical structure and function in *Escherichia coli* cell membranes caused by freeze-thawing. I. Change of lipid state in bilayer vesicles and in the original membrane fragments depending on rate of freezing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 978(1), 105-111.
59. Taverniti, V., Guglielmetti, S. (2012). Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in Microbiology*, 3, 392.

60. Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., Gao, C., Olsen, RE., Ran C., Zhou, Z. (2020). Paraprobiotics and postbiotics of probiotic *Lactobacilli*, their positive effects on the host and action mechanisms: A review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 570344.
61. Tiwari, S., Mall, C., Solanki, P. P. (2020). CMC studies of CTAB, SLS & tween 80 by spectral and conductivity methodology to explore its potential in photogalvanic cell. *Surfaces and Interfaces*, 18, 100427.
62. Tomasz, A., Waks, S. (1975). Enzyme replacement in a bacterium: phenotypic correction by the experimental introduction of the wild type enzyme into a live enzyme defective mutant pneumococcus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 65(4), 1311-1319.
63. Vallejo-Cordoba, B., Castro-López, C., García, H. S., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: A review of current evidence and emerging trends. *Advances in Food and Nutrition Research*, 94, 1-34.
64. Vanaporn, M., Titball, R. W. (2020). Trehalose and bacterial virulence. *Virulence*, 11(1), 1192-1202.
65. Walter, J., O'Toole, P. W. (2023). Microbe profile: the *Lactobacillaceae*. *Microbiology*, 169(12), 001414.
66. Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449-458.
67. Xin, Y., Hu, C., Li, Y., Yang, Z., Zhang, L., Li, A., Li. C., Liu L., Du, P. (2024). Immunomodulatory potential of *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 postbiotics: By regulating the Th17/Treg balance. *Food Bioscience*, 61, 104842.
68. Yang, Y., Song, X., Wang, G., Xia, Y., Xiong, Z., Ai, L. (2024). Understanding *Ligilactobacillus salivarius* from Probiotic Properties to Omics Technology: A Review. *Foods*, 13(6), 895.