



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS
MÉRNÖKI KAR

ÉLELMISZERMÉRNÖKI INTÉZET

***ELTÉRŐ SZÍNŰ SZŐLŐFAJTÁK TÖRKÖLYÉNEK
ANTIMIKROBIÁLIS HATÁSA***

TDK DOLGOZAT

Herrhofer Éva

II. évfolyamos Okleveles élelmiszermérnök MSc.

hallgató

Témavezető:

Dr. Krisch Judit

egyetemi docens

SZEGED

2012.

ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban virágzik a növényi eredetű gyógyhatású készítmények alkalmazása. Minden nappal újabb, és újabb növényi hatóanyag emberi szervezetre jótékony hatását fedezik fel. Dolgozatomban a bogyós gyümölcsöket, elsősorban a szőlőt helyeztem a középpontba. A szőlő rengeteg antioxidáns vegyületet tartalmaz, ezáltal számos pozitív hatást tulajdonítanak neki. Az antioxidánsoknak szerepe van a rákos megbetegedések, valamint, a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulása kockázatának csökkentésében. Kísérleti munkámban arra voltam kíváncsi, hogy a szőlő antioxidáns hatása mellett rendelkezik-e antimikrobiális tulajdonságokkal is. Eredményeim alapján jól látható gátlási zónát eredményeznek agardiffúziós kísérletek során *Bacillus cereus*, és *Bacillus subtilis*-nél. Túlélési tesztek során már 4 óra alatt két nagyságrenddel csökkentik az élő sejtszámot. Növekedésükre hatással vannak ezek a hatóanyagok, megváltoztatják a jellegzetes szaporodási görbét, ennek megfelelően a görbék laposabbá váltak, csökkentették a maximálisan elért sejtszámot.

ABSTRACT

Nowadays, the use of vegetal medicinal products is becoming more and more popular. The beneficial effects of vegetal substances on human organism are invented every day. In my thesis, I was focusing on the berries, especially on grapes. Grapes contain a lot of antioxidant compound; therefore many positive effects are attributed to them. The antioxidants have a great role in preventing the evolution of cancer and of cardiovascular system diseases. During my experimentation, I was investigating whether grapes have not only antioxidant effects but antimicrobial attributes as well. According to my results, the substances of grapes cause an apparent inhibitory zone during agar diffusion experiments by *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. During survival tests, the substances decrease the number of living cells by two orders of magnitude in 4 hours already. The increase of living cells are influenced by the substances, which change the typical growth curve, accordingly the curves become more flat, and they decrease the maximal amount of the number of cells.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Növények hatóanyagai, és szerepük a növényi szervezetben	3
2.2. Hatóanyagok emberi szervezetre gyakorolt hatása	9
2.3. A bogyós gyümölcsökben található hatóanyagok	12
2.4. Bogyós gyümölcsök antimikrobiális hatása	14
2.5. Szőlő hatásai, hatóanyagai	17
2.6. Szőlő és a bor antimikrobiális hatása	18
2.7. A kísérlet során vizsgált mikroorganizmusok jellemzése	22
2.7.1. Escherichia coli	22
2.7.2. Serratia marcescens.....	22
2.7.3. Bacillus subtilis, és Bacillus cereus	22
2.7.4. Saccharomyces cerevisiae, Pichia anomala	23
2.7.5. Aspergillus niger, és Penicillium spp.....	23
2.7.6. Rhizopus stolonifer	23
3. ANYAGOK, ÉS MÓDSZEREK.....	24
3.1. Növényi anyag- Szőlőfajták	24
3.1.1. Kunleány	24
3.1.2. Piros sasza.....	24
3.1.3. Cabernet sauvignon.....	24
3.2. Alkalmazott mikroorganizmusok	25
3.3. Kísérlet menete	25
3.3.1. Szőlő előkészítés	25
3.3.2. Liofilezés.....	25
3.3.3. Darálás	26
3.3.4. Kivonat készítés	26
3.3.5. Táptalajok főzése, kiöntése	26
3.3.6. Mikroorganizmusok előkészítése.....	27
3.3.7. Agardiffúziós tesztek: korongdiffúziós teszt; lyukdiffúziós teszt.....	27
3.3.8. MIC, és MBC megállapítása	27

3.3.9.	Túlélési tesztek.....	28
3.3.10.	Növekedési gátlási tesztek	28
4.	EREDMÉNYEK, ÉS ÉRTÉKELESÜK	29
4.1.	Agardiffúziós tesztek.....	29
4.1.1.	Lyukdiffúziós teszt.....	29
4.1.2.	Korongdiffúziós teszt.....	32
4.2.	MIC és MBC meghatározás makrohígításos módszerrel	33
4.3.	Túlélési teszt eredmények	37
4.4.	Növekedés gátlási teszt eredmények	39
5.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	41
	IRODALOMJEGYZÉK.....	43
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	45

1. BEVEZETÉS

A Földön körülbelül 250.000-500.000 növényfaj él, ezeknek viszonylag csak kis hányadát 1-10%-át használják élelmiszerként. A gyógyászatban ennél sokkal több növényt alkalmaznak. A növények gyógyszerként való alkalmazása az ősidőkre vezethető vissza. Hippokratész például 300-400 gyógyászati célra alkalmas növényt azonosított. Pedaniosz Dioszkoridész (1. századi görög katoniorvos, szakíró) legismertebb munkája a *Peri hülész iatrikészs* („A gyógyító anyagról”) című jegyzék, amely közel 600 gyógynövény nevét, hatását, azok alkalmazását tartalmazza a növények rajzaival tarkítva. A görög és latin növénynevek mellett az általa ismert más nyelvű neveket is megadta. Ez a munka a legismertebb ókori gyógynövény határozó, mely a későbbi gyógynövényes könyvek alapja. A már létező herbáriumokat alkalmazták, bővítették. (<http://hu.wikipedia.org> 2012.09.28.)

A növények használata a gyógyászatban mindig is jelen volt, de időről-időre visszaszorul használatuk, az éppen aktuális gyógyászatban alkalmazott szerek, módszerek miatt. A 19. században a gyógynövény használat reneszánszát élte. Egyfajta ellenállás, szembeszegülés volt az akkoriban alkalmazott orvosi módszerekkel szemben. Oliver Wendell Holmes (1809 –1894) cikkében a 19. században használatos gyógymódokat veszélyesnek és hatástalannak titulálja, példaként a londoni borbély-üzletekben használt higanyfürdőket említi, melyek szifilisz kezelésére voltak hivatottak, vagy másik példája a hallucinogén anyagokkal történő tuberkulózis kezelés, melyet szintén hatástalannak ítélt.

Azóta a gyógynövények alkalmazása mindennapos. A gyógyszerészet, az orvostudomány fejlődésével, a növények hatóanyagainak ismerete, alkalmazási területeik sokat tanulmányozott, és egész jól ismert terület. De mégis minden egyes kutatással ezeknek a hatóanyagoknak további kedvező, az emberi szervezet számára igazán jelentős, és lényeges hatását fedezik fel.

Kísérleteimben arra voltam kíváncsi, hogy a szőlőben megtalálható vegyületek, melyeknek antioxidáns hatása jól ismert, alkalmazhatók-e különböző mikrobális fertőzések kezelésére. Rendelkeznek-e ezek a vegyületek antimikrobiális hatással. A napjainkban alkalmazott antibiotikumok ellen kialakuló gyors rezisztencia miatt ezek az antibiotikumok egy idő után hatástalanok a mikroorganizmusokkal szemben. Ennek megoldása lehet ezeknek a hatóanyagoknak a használata a különböző mikrobák ellen. Amellett talán egy folyamatos, mindennapi kis dóziséval alkalmazás alkalmas lehetne a fertőzések megelőzésében.

Nem csak gyógyászatban, hanem étrend kiegészítőkben is már alkalmazzák ezeket az anyagokat antioxidáns hatásuk végett. De alkalmazásuk jelentős lehetne különböző élelmiszeripari termékekben is, növelve ez által a termék értékességét.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Növények hatóanyagai, és szerepük a növényi szervezetben

A növények szinte korlátlan mértékben képesek szintetizálni olyan vegyületeket, amelyeknek pozitív, illetve negatív hatása is ismeretes. Ezek a vegyületeket lehetnek klorofillok; karotinoidok; fenolos típusú vegyületek, vagy más néven polifenolok; alkaloidok; terpenoidok és illóolajok; lektinek; szaponinok; szerves kéntartalmú vegyületek; szerves savak; betalainok; vitaminok; illetve egyéb vegyületek. A növényi hatóanyagok a növények másodlagos anyagcseréjének termékei. Nem vesznek részt tehát a növények felépítésében, nem töltenek be szabályozó szerepet, viszont nélkülözhetetlenek a növények normális életműködéséhez (Krisch, 2012). A hatóanyagok növényekben betöltött szerepe sokrétű, és nem minden esetben teljesen tisztázott. Nagyrészüket védekező komponensként viselkedik a növényi patogének ellen, és gyakran különböző stressz - válaszokat indukálnak, de emellett még számos, a növény számára fontos folyamatban segédkeznek (Cowan, 1999).

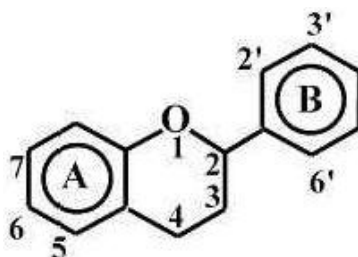
A klorofillok fő feladata a fotoszintézisben nyilvánul meg, mely során a növények a fény energiáját felhasználva szerves anyagból szerves anyagot állítanak elő. A klorofillok, vagy más néven zöld színanyagok a növények kloroplasztiszaiban található vegyületek, melyek négy pirrolgyűrűből állnak, és ezek a pirrolgyűrűk egymással porfirinvázat képeznek. A porfirinyűrű közepén egy magnézium atom található. A klorofillok 450 nm körül és 650-750 nm-nél abszorbeálják a fényt, majd a fotoszintetikus apparátus segítségével, mely általában tartalmaz még járulékos színanyagként karotinoidokat is, átalakítják a fényenergiát kémiai energiává. (Láng, 2007)

A karotinoidok sárga, narancssárga, vörös, zsírban oldódó színanyagok. Növényekben a különböző növényi szervekben például levelekben, gyökerekben, magvakban, virágokban található. De megtalálható algákban, színes élesztőkben is. Állatokban, mint az A vitamin elő anyaga található. A karotinoidok szerepe a fotoszintézisen túl, a magas fényintenzitás elleni védekezésben is jelentős, védik a klorofill molekulákat a fénybomlástól. Emellett általában a színanyagoknak figyelemfelhívó szerepet is tulajdoníthatunk, melynek jelentősége a rovarbeporzás során érvényesül. A karotinoidoknak két nagy csoportja ismert, a karotinok, melyek szénből, és oxigénből épülnek fel, és a xantofillok, melyek a karotinok oxigéntartalmú változatai. Általában elmondható, hogy a karotinoidok 40 szénatom számú, konjugált kettős kötésekben gazdag vegyületek. Leggyakrabban transz konfigurációban fordulnak elő. A konjugált kettős kötéseknek, vagyis az

ebből adódó számos, a külső elektronhéjhoz lazán kapcsolódó elektronoknak köszönhető a karotinoidok erős antioxidáns hatása.

A fenolos típusú vegyületek, vagy más néven polifenolok felépítésére jellemző, hogy egy, vagy több aromás gyűrűből állnak, amihez hidroxil csoport, vagy hidroxil csoportok kapcsolódnak. A hidroxil csoportok felelősek az antioxidáns hatásért. Minél több hidroxil csoporttal rendelkezik az adott vegyület, annál erősebb antioxidáns hatást mutat. A polifenolok növényekben betöltött szerepe változatos. Felelősek egyrészt a gyümölcs, zöldség színének kialakításáért, felelősek, az UV fény hatására, illetve a fotoszintézis során képződő ROS-ok (reaktív oxigénformák) eliminálásáért. A polifenolok két nagy csoportját különböztethetjük meg, melyek a flavonoid, és a nem flavonoid szerkezetű vegyületek.

A flavonoidok többnyire glikozilált formában találhatók meg a növényekben. Alapszerkezetükre jellemző, hogy két aromás gyűrű, azaz a két 6 szénatom számú gyűrű között egy 3 szénatomos gyűrű helyezkedik el.

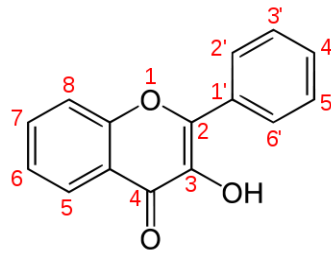


1. ábra: Flavonoidok alapváza

A flavonoidok között több alcsoportot különíthetünk el, melyek a következők:

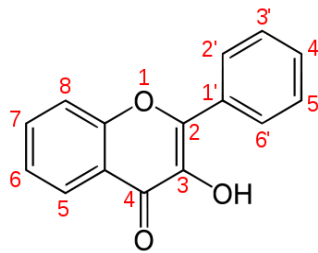
- Flavonok
- Flavonolok
- Flavanonok
- Flavanonolok
- Flavanolok
- Izoflavonok
- Antocianidinek
- Kalkonok

A flavonok két jelentős vegyülete az apigenin, ami főként zöldségekben fordul elő, és a luteolin, ami inkább gyümölcsökben található meg.



2. ábra: Flavon alapváz

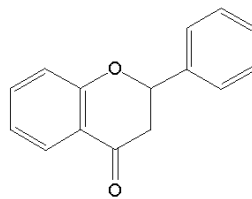
A flavonolok legismertebb képviselői a kvercetin, a mircetin, és a kempferol. A kvercetin bogyós gyümölcsök, hagymafélék, a mircetin bogyós gyümölcsök, szőlő, míg a kempferol bogyós gyümölcsök, és a sóska hatóanyaga.



3. ábra Flavonol alapváz

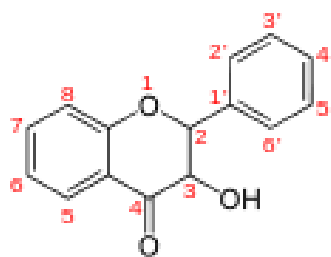
A fenti ábrából látható, hogy a flavonolok C gyűrűjének 3. C-atomjához kapcsolódik egy hidroxil csoport. És ez a hidroxil csoport különbözteti meg őket a flavonoktól.

A következő csoport a flavanonok, melyek elsősorban citrusfélékben fordulnak elő jelentős mennyiségben. Főbb képviselőik a naringenin, és a heszperitin. A naringenin főleg narancsban, a heszperitin citromban, zöldcitromban található.



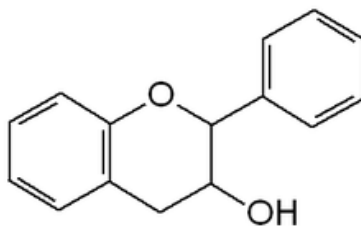
4. ábra Flavanon alapváz

A flavonoid típusú vegyületek negyedik csoportját a flavanonolok, vagy más néven dihidroflavonolok képezik. Idetartozó ismertebb vegyületek a dihidrokempferol, a dihidrokvercetin, és a dihidromircetin, valamint a taxifolin.



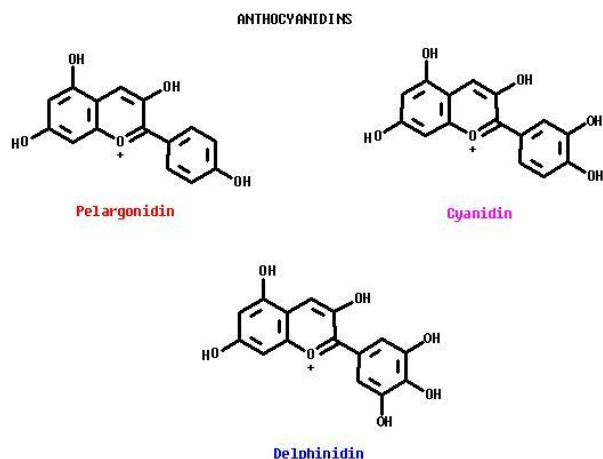
5. ábra Flavanonol alapváz

A flavanolokat több névvel is illetik, mint flavan-3-olok, proantocianidinek, vagy kondenzált tanninok. Jellemző, hogy többnyire egymással összekapcsolódva, polimereket képezve találhatók meg élelmiszereinkben. A polimerek 4-11 egységből álló, egymással a C8-C4-es szénatomon keresztül kapcsoló vegyületek. Monomerjei az epikatechinek, katechinek, epigallokatechinek, és a galloktechinek, valamint galluszsavval kapcsolódó formáik, gallátjaik. Előfordulásuk főleg bogyós gyümölcsökben, szőlőben, vörösborban, fahéjban, és csokoládéban jelentős.



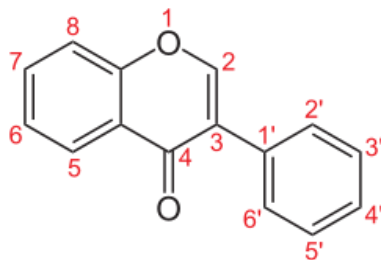
6. ábra Flavanol alapváz

Az antocianidinek az antociánok aglikonjai, azaz cukor alegység nélküli formái. Több típusuk ismert, azonban mindegyikre igaz, hogy főként gyümölcsökben fordulnak elő. A cianidin bogyós gyümölcsökben, szilvában, vöröskáposztában; a pelargonidin főként eperben; delphinidin bogyós gyümölcsökben; malvinidin vörös szőlőben, ebből adódóan vörösborban; míg a peonidin bogyós gyümölcsökben, cseresznyében, meggyben fordul elő nagy mennyiségben.



7. ábra Néhány antocianidin szerkezeti képe

A flavonoid típusú vegyületek utolsó csoportja az izoflavonok. Jellemzőjük, hogy szerkezetük hasonlít a női nemi hormon szerkezetére (ösztadiol), ezért növényi vagyis fitoösztogéneknek is nevezik. Többnyire hüvelyesekben fordulnak elő, például szójababban. Legjelentősebb képviselői a daidzin, a daidzein, a genisztin, és a genistein.



8. ábra Izoflavon alapváz

A polifenolos vegyületek másik nagy csoportja a flavonoidok mellett a nem flavonoid típusú vegyületek. Ezeknek a vegyületeknek a csoportosítása szénatom szám alapján történik.

Az első csoport, a C6-os csoport képviselői az egyszerű fenolok, mint gvajakol, eugenol, illetve a fenol alkoholok, mint például a tirozol, vagy a hidroxitirozol. Fenol alkoholok esetében az aromás gyűrűhöz egy, vagy több alkohol oldallánc kapcsolódik.

A következő csoportot a C6-C1-es csoportot a fenolsavak, és az aldehidek képezik, amikor is fenolsavak esetben az aromás gyűrűhöz egy karboxil, míg az aldehideknél egy aldehyd csoport kapcsolódik. A fenolsavak jellegzetes képviselői a galluszsav, ellagsav, és a 4-hidroxi-benzoészav, melyek elsősorban gyümölcsökben fordulnak elő. Aldehidek fő vegyületei a vanillin, sziringaldehid, koniferaldehyd, és a szinapaldehid. Vanillin citrusfélékben, vaníliában található, a sziringaldehid, koniferaldehyd, és a szinapaldehid pedig whisky, brandy illat, - és ízanyagait adják.

A harmadik csoport a kondenzálható tanninok, $(C_6-C_1)_n$. Ezek a tanninok galluszsav és ellagsav glükózzal képzett észterei. Gallotanninok fellelhető mangó magban, míg ellagitanninok bogyós gyümölcsökben, szőlő magban fordulnak elő.

C6-C3 csoport a hidroxifahéjsav származékok csoportja. Elsősorban gyümölcsök héjában megtalálható vegyületek. Négy fő formájuk ismeretes. A p-kumarinsav, a kávéssav bogyós gyümölcsökben; a ferulasav főként gabonafélékben; a szinapinsav áfonyában, narancsban; a klorogénsav - kávéssav, és a kinasav észtere - cseresznyében, meggyben fellelhető hatóanyagok.

Jelen csoportosítás elkülöníti az egyéb C6-C3 származékokat. Ilyenek például a kumarinok (petrezselyem, zeller); a lignánok (káposzta, eper, málna); és a ligninek. A lignánok, és a ligninek a növények sejtfalának felépítésében vesznek részt.

A nem flavonoid típusú vegyületek utolsó csoportját a stillbének képezik (C6-C2-C6). Szerkezetükre jellemző, hogy a két aromás gyűrűt, egy két szénatomos lánc kapcsolja össze. Két képviselőjük a rezveratrol, ami vörös szőlőben, vörös borban van jelentős mennyiségben, és a picein, ami a rezveratrol glükozidja.

A növényi hatóanyagok között meg kell említenünk az illóolajokat is, melyek főként fűszerekben, gyógynövényekben megtalálható, vízben nem oldható, aromás vegyületek. Az illóolajok összetett vegyületek, többnyire 2-3 domináns komponens mellett, több, kisebb mennyiségben megtalálható mellékkomponens alkotja. Az illóolajok összetevőit két csoportba sorolhatjuk. Az egyik csoportot a terpének, és a terpenoidok alkotják, míg a másik csoport tagjai az aromás, és alifás vegyületek.

Terpének 5 szénatomos izoprén alegységek, míg a terpenoidok a terpének oxigént is tartalmazó változatai. A terpének igen változatosak, megtalálhatók monomer, dimer, trimer, és tetramer formában is. A monomerek többnyire nyílt láncúak, de előfordulhatnak gyűrűs, akár kettős gyűrűt is tartalmazó formában is. A legismertebb monomer terpének, melyek csak szén és hidrogén atomot tartalmaznak a mircén, limonén, terpinén. De lehetnek alkoholok is, melyek egy hidroxil csoporttal gazdagabbak, ilyen vegyület a linalool, nerol, borneol. Az aldehid csoportot tartalmazó monomer terpének a citrál, nerál. Keto csoportot tartalmazók a tegeton, karvon, kámfor. Észter kötéssel kapcsolódhatnak a monomerhez valamilyen csoport, mint a linalil, vagy a metil acetát estében. Éterek között legismertebb pedig az 1,8 cineol, mely a borókában fellelhető.

Az aromás, és alifás vegyületek szintézise fenilpropánból történik. Ezekhez a vegyületekhez tartozik például a fahéjaldehid, a fahéj-alkohol, az eugenol, és az anetol.

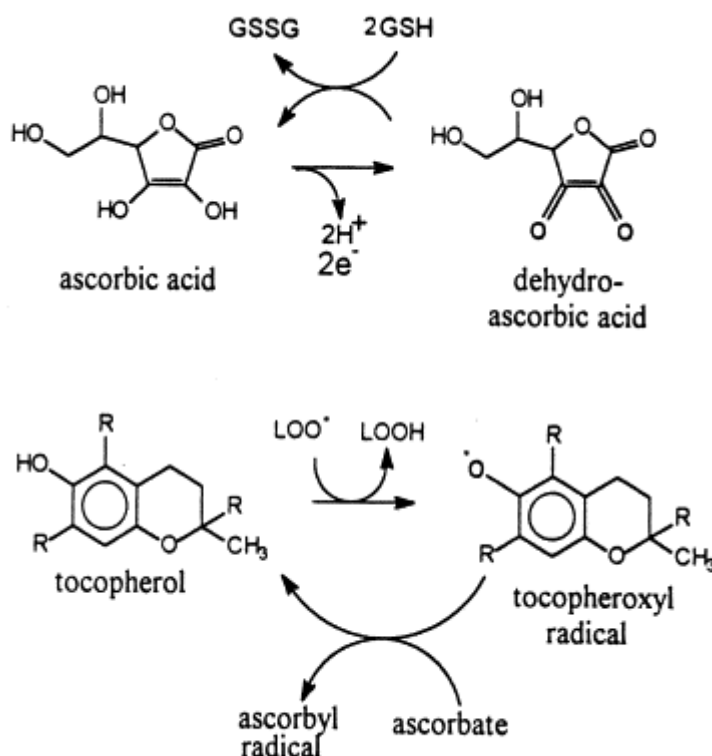
Illóolaj alkotó vegyületnek számítanak a nitrogén, és kéntartalmú vegyületek. Ezek a vegyületek elsősorban káposztafélékben (glükozinolátok), hagymafélékben (alliin, allicin) vannak jelen. (Krisch, 2012)

2.2. Hatóanyagok emberi szervezetre gyakorolt hatása

Napjainkban egyre elterjedtebbek azok a gyógyhatású készítmények, melyekben a fenolos vegyületek összetevőként szerepelnek, hiszen ezeknek a vegyületeknek bizonyítottan jótékony hatása van az emberi szervezet számára. Csökkentik a degeneratív betegségek, a szív-és érrendszeri betegségek és bizonyos rákos megbetegedések kialakulásának kockázatát. Antioxidáns, szívvédő, rákmegelőző, gyulladáscsökkentő, antimikrobiális tulajdonságokkal bírnak. Ezen felül ismert még öregedés gátló hatásuk is. (En-Qin et al., 2010)

Az antociánoknak számos jótékony hatása ismert, melyek az antioxidáns kapacitásuknak köszönhetőek. A reaktív oxigénformák (ROS), mint a hidroxil, a peroxil gyök, vagy a szuperoxid anion folyamatosan termelődnek az élő szervezetek anyagcseréje során. Az élő szervezetek ugyan védve vannak az oxidatív károsodásoktól különböző védő enzimek által, mint glutation peroxidáz, vagy szuperoxid dizmutáz, vagy olyan antioxidáns komponensekkel védekeznek ellenük, mint a tokoferol, a karotinoidok, vagy az aszkorbinsav, de abban az esetben mikor ezeknek a szabadgyököknek a mennyisége felülemelkedik az organizmus antioxidáns kapacitásán, megtámadják a lipideket, a fehérjéket, a DNS-t. Károkat okoznak a sejtmembrán integritásában, funkciójában, növelik annak áteresztőképességét. Megtámadják az enzimeket, megváltoztatják szerkezetüket, megtámadják a genetikai anyagot. Ezen a változások eredményeként a szervezetben különböző patológiai elváltozásokat alakítanak ki, mint például szív és érrendszeri megbetegedések, ízületi gyulladások, különféle rákos megbetegedések, Alzheimer kór. Ezek a betegségek mind kapcsolatba hozhatók a kontrolálatlanul termelődő szabadgyökökkel, illetve legalábbis részben felelősek e betegségek kialakulásáért.

Az étrend kiegészítő anioxidánsok fejlesztik az immunválaszt. Az antociánok védik az LDL lipoproteineket (kis sűrűségű lipoproteinek) az oxidációtól, csökkentik ez által az érelmeszesedés kialakulásának kockázatát. Az antocianidinek, mint a malvinidin, a cianidin, a delfinidin hasonló antioxidáns potenciált mutatnak a különböző teszt szervezetekben. Ezek az antociánok erősebb antioxidánsok, mint az α -tokoferol, és összehasonlítva a hétköznapi antioxidánsokkal butilált hidroxianizol (BHA), butilált hidroxitoluol (BHT) is jobbnak bizonyulnak. A különböző antociánoknak a hatásossága eltérő a különböző ROS-okkal szemben. Például a delfinidin a leghatásosabb szuperoxid anionnal szemben, míg a hidroxil gyököt a pelargonidin hatástalanítja leghatékonyabban. Az antociánok hatásmechanizmusa, hogy egy H atomot adnak a szabadgyöknek, ezáltal stabilizálják azt, és ez által maga az antioxidáns válik gyökké, de sokkal nagyobb stabilitású lesz, mint a szabadgyök volt.



9. ábra Étrendi antioxidánsok hatásmechanizmusa a szabadgyökökkel szemben (Rock, et al. , 1996)

Antal és munkatársai (2003) publikációjában az antociánoknak 8 pozitív aktivitást tulajdonítanak. Elsőként az antociánok kollagén stabilizáló aktivitását említik meg. A kollagén a test egyik leggyakoribb fehérjéje, felelős az ínak, ínszalagok, porcok kialakításáért. A fekete áfonya antocianidinjei hatással vannak a kollagén metabolizmusra, képesek a kollagén rostok keresztkötéseinek kialakítására, ezáltal hozzájárulnak a természetes kollagén keresztkötések megerősítéséhez. Gyulladásos megbetegedések során a vérben megnövekvő leukocita (fehérvérsejt) szám, és a leukociták által szekretált enzim, a leukocita észteráz aktivitás. Ez az enzim képes hasítani a kollagén keresztkötéseket. Az antocianidinek gátolják ennek az enzimnek a működését, így védve a kollagént.

A másik jelentős hatás az erek átteresztőképességének normalizálása. Ez a hatás nem csak az antociánok sajátosága, hanem az összes flavonoid típusú vegyületé. Csökkentik az erek átteresztőképességét, megerősítik az erek falát. Az antociánok egy érdekes hatása, hogy csökkentik a vér-agy-gát permeabilitását. Bizonyított, hogy a megnövekedett vér-agy-gát permeabilitás összeköttetésben áll a központi idegrendszer autoimmun betegségeivel, skizofréniával, vagy az úgynevezett agyi allergiával. (Antal, et al., 2003) Feltételezhető, hogy az antociánok gátolják az

agyi erek kollagén membrán enzimátikus, és nem enzimátikus degradációját, ezzel fenntartja, vagy éppen helyreállítja az agy védelmét a különböző hatásokkal (drogok, fertőzések, toxinok etc.) szemben.

A gyulladáscsökkentő aktivitás ismét egy olyan tulajdonság, amely minden flavonoid típusú vegyület magáénak tudhat. Ezek a vegyületek megakadályozzák azoknak az anyagoknak a szintézisét, felszabadulását, melyek gyulladást indukálnak (hisztamin, szerin proteáz, prosztaglandinok). Wang és munkatársai (1999) bebizonyították, hogy a meggyben található cianidinek gátolják mindkét típusú ciklooxygenázt (COX-1, 2), melyek katalizálják az arachidonsav prosztaglandin átalakulást. Emellett azt is kimutatták, hogy sokkal hatékonyabbak, mint a nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő gyógyszerek.

Jelentős ezen vegyületek vércukorszint csökkentő hatása. Ez a pozitív hatás a fekete áfonyában megtalálható mirtillinnek köszönhető. Igaz gyengébb hatású, mint az inzulin, de sokkal kevésbé káros.

Állati kísérletekben bizonyították a vegyületek koleszterol szintézisre gyakorolt hatását. A padlizsánban (*Solanum melongena*) jelenlévő delfinidin növeli a HDL-koleszterol szintjét a vérsérumban, ami növeli az epesav kiválasztást. Cianidin 3-glükozid adagolása (2 g/kg takarmány) csökkenti össz-koleszterol koncentrációt a vérben.

Hatással vannak továbbá a vérben a trombociták (vérlemezkék) plakk képződésére. Ezáltal csökkentik az érelzáródás (trombózis) kialakulásának kockázatát. Bizonyították sima izom relaxáló, illetve gyomorfekély megelőző hatásukat is.

Klinikai alkalmazásuk széles körben elterjedt ezeknek a vegyületeknek. A fekete áfonya extraktumát felhasználják különböző látásproblémák kezelésére, hályog kialakulásának megelőzésére, de alkalmazzák keringési rendellenességek, fekélyes megbetegedések, menstruációs panaszok kezelésére is. A cseresznye fogyasztása csillapítja az ízületi fájdalmakat, köszvényt. (Antal, et al., 2003)

A fenolos típusú vegyületeken kívül meg kell említenünk a karotinoidok kedvező hatását is. Felhasználásuk mindennapos. A karotinoidokat felhasználják napkémekben, az UV sugárzás ellen; alkalmazzák őket szembetegségek megelőzésére, ugyanis a látáshoz szükséges az A vitamin, ami β -karotinból képződik. A vitamin hiányában fellépő megbetegedés a farkasvakság, ami szürkületkori látási nehézség. A szem nehezen alkalmazkodik a csökkent fényviszonyokhoz. Legújabb kísérletek eredményei alapján használhatók a rákos megbetegedések kezelésére is. (Krisch, 2012)

2.3. A bogyós gyümölcsökben található hatóanyagok

A bogyós gyümölcsökben elsősorban fenolos komponensek, és szerves savak találhatók meg. A növényi szövetekben megtalálható fenolok egyszerű szubsztituált fenolok, vagy glikozilált fenolok, de valamilyen nagy molekulatömegű polimerizált molekulával komplexet képezve is megjelenhetnek. A flavonoidok, a fenolsavak, a lignánok, a fenol polimer komplexek, más néven tanninok tipikus bogyós komponensek. A bogyós gyümölcsök gazdagok flavonoidokban, például flavonolokban. Magas flavonol tartalom mutatható ki tőzegáfonyában (*Oxycoccus palustris*), vörös áfonyában (*Vaccinium vitis-idaea*), és a fekete ribiszkében (*Ribes nigrum*) (50-200 mg/kg friss növény). Valójában a vadon termő bogyós gyümölcsök, és a fekete ribiszke több flavonolt tartalmaz, mint akármelyik hétköznapi használatban elterjedt zöldség, vagy gyümölcs.

Az antociánok egy gyűjtőfogalom, mely magába foglalja az aglikonokat, vagyis a cukor alegység nélküli formákat, melyeket antocianidineknek neveznek, és antocianinokat. (Antal, et al., 2003) Flavonoid típusú vegyületek közül a túlsúlyban ezek az antocián formák, az antocianidinek találhatók meg a bogyósokban (2000-5000 mg/kg friss növény). Az antocianidinek a látható fényt jól abszorbeálják, így a gyümölcsök jellegzetes narancs/piros/kék színéért felelősek. Magas antocianidin tartalmú gyümölcsök az eper (*Fragaria X ananassa*), a málna (*Rubus idaeus*), a feketeáfonya (*Vaccinium myrtillus*), a veres és a fekete ribiszke (*Ribes rubrum*, *Ribes nigrum*). Az eperben például polifenol komponensek 44%-a antocianidin. (Puupponen-Pimiä, et al., 2004)

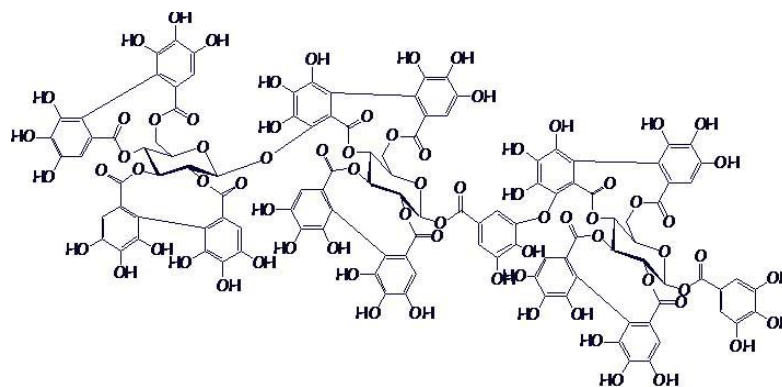
1. táblázat: Különböző zöldségek, gyümölcsök antocián tartalma (Böhm et al., 1988)

Gyümölcs/zöldség	mg antocián/ 100g friss növény	Fő antocianidin komponens
Málna (<i>Rubus idaeus</i>)	40	cianidin
Hamvas szeder (<i>Rubus caesius</i>)	160	cianidin
Feketeáfonya (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	165	delfinidin, malvinidin, petunidin
Fekete ribiszke (<i>Ribes nigrum</i>)	270	delfinidin, cianidin
Szőlő (<i>Vitis vinifera</i>)	145	malvidinin, delfinidin

Fekete berkenye (<i>Aronia melanocarpa</i>)	800	cianidin
--	-----	----------

A nem flavonoid típusú polifenolok közül több egyszerű fenolsav, mint a hidroxifahéjsav és a hidroxibenzoészav gyakori a bogyósokban. A klorogénsav, ami a kávéssav, és a kínasav észtere egy szintén gyakorta fellelhető komponensek ezekben a gyümölcsökben.

A tanninok melyek lehetnek, hidrolizálható, és kondenzált tanninok úgy szintén fontos komponensei a bogyós gyümölcsöknek. A hidrolizálható tanninok lehetnek gallotanninok, és ellagitanninok. Jellemzőjük, hogy általában a galluszsav és az ellagsav glükózzal képzett észterei. Ellagitanninok egy vagy több hidroxidifenil (HHDP) csoportot tartalmaznak, amik glükózhoz, mint diészter, illetve galluszsavhoz kapcsolódnak.



10. ábra Ellagitannin

Az ellagitanninok főként a *Rosaceae* családba, a *Rubus* nemzetségbe tartozó bogyósok hatóanyaga (málna- *Rubus idaeus*, hamvas szeder- *Rubus arcticus*, tözgszeder, vagy más néven mocsári hamvas szeder- *Rubus chamaemorus*). Ezek a gyümölcsök, és az eper termel olyan ellagitanninokat, melyek stabil glükóz konformációban vannak. Ezenkívül pentagalloglükóz dimért, vagy polimer ellagitannint tartalmaznak, és csak kis mennyiségben fordulnak elő monomer formában. Minden *Rubus* nemzetségben tartozó bogyós gyümölcs tartalmaz dimer formát, amit sanquin H6-nak neveznek. Puupponen-Pimiä és munkatársainak (2004) kísérlete alátámasztotta Tanaka és munkatársainak (1993) eredményeit, miszerint a málna tartalmaz tetramer ellagitanninokat, lambertianin D-t.

Nemcsak a *Rubus* nemzetség tagjai gazdagok tanninokban. A Hangafélék családjába (*Ericaceae*) tartozó *Vaccinium* nemzetség tagjai is bővelkednek bennük. Példaként a tőzegáfonya szolgál, ami szintén tartalmaz kondenzált tanninokat. A kondenzált tanninok, másik ismert nevükön proantocianidinek, melyek a flavan-3-olok, és a flavan-3,4-olok polimerjei. Ezek a komponensek adják a jellegzetes kesernyős ízt a gyümölcsöknek.

A vörös áfonya (*Vaccinium vitis-idaea*), az eper (*Fragaria X ananassa*), és a tőzegáfonya (*Oxycoccus palustris*) a legjobb példái a lignán vegyületekben gazdag gyümölcsöknek (10-15 mg/kg friss növény).

A gyümölcsök típusa, a szezonalitása, a földrajzi eredete mind hozzájárul az egyedi a gyümölcsre jellemző cukor-sav arányhoz. Puupponen-Pimiä és munkatársai szerint az északi régiókban a vadon termő gyümölcsök levének citromsav- almasav aránya állandó (2,9-16,2 g l⁻¹ és 3,3-24,7 g l⁻¹). A vörös áfonya (*Vaccinium vitis-idaea*), a tőzegáfonya (*Oxycoccus palustris*), mocsári hamvas szeder (*Vaccinium oxycoccus*) és fekete ribiszke (*Ribes nigrum*) leve tartalmaz benzoesavat (0,1-0,7 g l⁻¹). Vörös áfonyában (*Vaccinium vitis-idaea*) főként a benzoesav található meg magas koncentrációban (magasabb, mint 1,3 g l⁻¹ szabad benzoesav), és a pH-ja nagyon alacsony (pH 2,6-2,9). A bogyós gyümölcslevek alacsony pH-ja (2,4-3,5 között változik), kedvező a mikroba szennyezettség megelőzésében. (Puupponen-Pimiä, et al., 2004)

2.4. Bogyós gyümölcsök antimikrobiális hatása

A mikrobák citoplazma membránja egy foszfolipid kettős réteg. Ez egy féligáteresztő membrán, ezen keresztül valósulnak meg a különböző transzport folyamatok, mely a szervezet számára nélkülözhetetlenek. A membrán az egyik legfontosabb támadási pontja a növényi vegyületeknek. A fenolos vegyületek feltételezhető hatásmechanizmusa, hogy megtámadják a sejtfalat, bejutnak a sejtbe, ahol a citoplazma-, és sejtfelhérjéjével reakcióba lépnek. Ezt a feltevést számos kutató alátámasztotta.

Walsh és munkatársai timol, és eugenol vegyületek antimikrobiális hatását vizsgálták. Eredményeik alapján ezek a vegyületek, ha nem is teljes mértékben, de részben felelősek a sejtmembrán károsodásért.

Ultee és munkatársai karvakrol hatását vizsgálták *Bacillus cereus*-al szemben. Feltételezésük szerint a karvakrol destabilizálja a citoplazma membránt, és lényegében, mint egy proton pumpa viselkedik, csökkenti a pH gradienst. A pH gradiens csökkenésével csökken a protont mozgó erő, az ATP szintézis leáll, ami végül sejthalálhoz vezet. (Puupponen-Pimiä, et al., 2004)

Gram pozitív és a Gram negatív baktériumok sejtfal szerkezete eltérő, így az anyagok sejt belső terébe való bejutásának mechanizmusa sem lehet azonos. A Gram negatív, és Gram pozitív szervezetekre egyaránt jellemző, hogy sejtfaluk szilárdító eleme a peptidoglikán polimer. Ez a polimer murein egységekből épül fel. A murein egy cukor és egy peptid részből áll. A cukor rész egy N-acetil-glukózamin és egy β-N-acetil muraminsav. Ehhez a cukorrészhez kapcsolódik a négy aminosavat tartalmazó peptidlánc. A négy aminosav közül három állandó, és egy közülük pedig

változó. Az első helyen mindig egy L-alanin található, második helyen D-glutamin, a harmadik helyen vagy L-lizin, vagy mezo-diamino-pimelinsav (mDAP) van, míg a negyedik helyet D-alanin foglalja el. Gram negatívok esetében általában a harmadik helyen mDAP, míg Gram pozitívoknál L-lizin van. Ezek a tetrapeptidek egymáshoz úgy kapcsolódnak, hogy az egyik tetrapeptid negyedik helyén álló D-alanin a másik tetrapeptid harmadik helyén található mDAP-hoz, vagy L-lizinhez kapcsolódik. Ez a kapcsolódás Gram negatívok esetében közvetlen peptidkötés által valósul meg, míg Gram pozitívoknál egy 4-5 tagú aminosav hídon keresztül jön létre. Így a Gram negatívok sejtfala kompaktabb szerkezetű, míg a Gram pozitívoké lazább szerkezetet valósít meg. (Kevei, Kucsera, 2004)

Nem csak a sejtfal szerkezetében térnek el egymástól a Gram pozitív és Gram negatív fajok, hanem a sejtmembrán felépítésében is. A Gram negatív baktériumoknak van egy úgynevezett külső sejthártyája, mely hidrofób vegyületek számára gátat állít. Helander és munkatársai kísérleteiben kimutatták, hogy bizonyos fenolos vegyületek, mint például a timol, és a karvakrol képesek ezt a külső sejthártyát károsítani, ezáltal a membrán transzportot, és ezzel a sejt belső homeosztázisát megzavarni, így előidézve a sejthalált.

Scalbert (1991) szerint a tannin antimikrobiális tulajdonsága annak köszönhető, hogy képes a mikroorganizmus által extracelluláris térbe jutott enzimek működését gátolni, illetve képes a mikroba növekedéséhez szükséges fémionokat megkötni. Összességében a tannint alkalmasnak találta gombákkal, baktériumokkal, élesztőkkel szemben.

Alberto és munkatársai (2001) megfigyelték, hogy a fenolos vegyületek hatással vannak *Lactobacillus hilgardii* mikroba növekedésére. Magas galluszsav koncentráció mellett (1000 mg l^{-1}) gátolják mikrobák növekedését.

Belofsky és munkatársai (2004) kísérleteinek eredménye alapján a fenolos vegyületek képesek gátolni a multidrog rezisztencia pumpát. Ennek jelentősége abban áll, hogy a pumpa működésének hiányában a baktérium sejtek nem képesek a számukra kedvezőtlen anyagok (antibiotikum, hatóanyag stb.) saját sejteiken kívül tartására. Ezen kísérlet továbbvitelével Roccaro és csapata (2004) megfigyelte, hogy a zöld teában található katechin, és epigallokatechin-gallát jelentősen csökkentette a tertaciklin aktivitást a tetraciklin rezisztens *Staphylococcus*-ban. A jelenség során megfigyelték a tetraciklin efflux csatorna aktivitásának, és az extracelluláris térben a tetraciklin mennyiségének a megnövekedését. Hasonló eredményre jutottak Nanayakkara és munkatársai (2002) is. Kísérleteikben meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus*-t vizsgáltak.

Yoda és kollégái kísérleteiben a zöld tea fő hatóanyagát az epigallokatechin-gallát hatását vizsgálták különböző baktérium törzseken. Eredményeik szerint a Gram + baktériumok esetén, mint például a *Staphylococcus aureus*-nál a MIC, azaz a minimális gátló koncentráció kisebb volt, mint a Gram – baktériumoknál. Ez a fentebb említett sejtmembrán különbségekkel magyarázható.

Az epigallokathecin- gallátnak más jelentős tulajdonságot is tulajdonítanak, például Zhao és munkatársai szerint ez a vegyület gátolja *E.coli* antibiotikum rezisztencia plazmid (R plazmid) transzferét. Az R plazmid felelős a baktériumok különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájáért.

Az antimikrobiális hatások között meg kell említeni a fenolsavak okozta sejtkárosodást. A fenolsavak disszociálatlan állapotban képesek átjutni a sejtmembránon. Viszont a sejten kívüli tér pH-ja eltérő az intracelluláris tér pH-jától. A fenolsavak bejutva a sejtbe disszociálnak, csökkentik a belső tér pH-ját, így károsítva a citoplazmatikus fehérjéket.

A fertőzések kialakulásához a baktériumok nagyszámú jelenlétére, illetve a nyálkahártya felülethez való tapadásához, ott telepek kialakítására van szükség. A baktériumok epitél sejtekhez való tapadása váltja ki az urogenitális, a gyomor-bél és légzőszervi traktus fertőzést. Kísérletek bizonyítják, hogy tőzegáfonya (*Oxycoccus palustris*) lé gátolja *E. coli* letapadását az uroepitéliumhoz. Ezért a hatásért a kondenzált tanninok felelősek. A szájban található baktérium, a *Streptococcus mutans* letapadásának gátlása is bizonyított, melyért szintén a tőzegáfonyában fellelhető hatóanyagok felelősek. Pozitív hatása, hogy javítja a száj higiéniáját. Érdekes felismerés, hogy míg a hatóanyagok antiadhéziós hatással bírnak patogénekkal szemben, addig az emberi szervezet számára hasznos mikroflóra ellen nem lépnek fel. Számos irodalom bizonyítja a patogénekkal szembeni gátlást, míg, tejsavbaktériumok elleni gátlásról nem jelent meg közlemény. Ezek alapján akár feltételezhető, hogy ezek a hatóanyagok szelektív hatással rendelkeznek. Bár ennek megerősítése még várat magára. (Puupponen-Pimiä, et al., 2004) A fenolos vegyületek szintén gátolják a letapadását a *Helicobacter pylori*-nak, mely egy Gram negatív baktérium, ami elősegíti a gyomorfekély, gyomrhurut, és a gyomorrák kialakulását. Habár van hatásos kezelés ellene, nagy a valószínűsége az antibiotikum rezisztencia kialakulásának. Számos tanulmány számol be különböző növényi eredetű extraktumról, melynek ismert ilyen aktivitása. A növények közül például a fokhagyma (*Allium sativum*), a brokkoli (*Brassica oleracea convar. botrytis var. italica*), a tőzegáfonya (*Oxycoccus palustris*), a zöld tea (*Camellia sinensis*), és a szőlő (*Vitis vinifera*). (Brown et al. 2008)

Különböző kísérletek alapján a hidroxiláció foka, azaz, hogy mennyi hidroxil csoportot tartalmaz az egyes vegyület, összefüggésben van az antimikrobiális hatással. A flavonolok közül a mircetin, mely a B gyűrűjén három hidroxil csoportot tartalmaz, mutatja a legerősebb gátló hatást a Gram pozitív *Enterococcus faecalis* és *Bifidobacterium lactis* ellen. Viszont a Gram negatív *Salmonella*-ra nincs hatással. A flavonok között ismert luteolin, mely a B gyűrűjén 2 hidroxil csoportot tartalmaz, szintén hatással van az előbb említett két mikrobára. Tehát valószínűsíthető, hogy a B gyűrűn elhelyezkedő hidroxil csoportok, és azok száma összefüggésben van az

antimikrobiális aktivitással. A fenolsavakra jellemző, hogy csak a Gram negatív baktériumokkal szemben mutatnak gátló hatást. (Puupponen-Pimiä, et al., 2004)

2.5. Szőlő hatásai, hatóanyagai

A szőlő a szőlőfélék (*Vitaceae*) családjának egyik sok fajt és azon belül sok alfajt magába foglaló nemzetsége. A szőlő jótékony hatása már régóta ismert. Az ókori görög, és római civilizáció is felhasználta a szőlőt borkészítésre. Napjainkban három fő szőlő faj használatos az Európai szőlő (*Vitis vinifera*), az Észak- Amerikai szőlő (*Vitis labrusca*; *Vitis rotundifolia*), és a Francia hibrid. Felhasználásuk szerint lehetnek csemegeaszőlők, borszőlők, illetve mazsola szőlők. Gyümölcsként, gyümölcsitalként, mazsolaként, borként kerül a fogyasztókhoz. A szőlő számos számunkra fontos tápanyagot tartalmaz: vitaminokat, ásványi anyagokat, szénhidrátokat, élelmi rostokat, növényi hatóanyagokat. Napjainkban fontos kutatási területté vált, hisz ismert, hogy a csemegeaszőlő, illetve a szőlőből előállított termékek fogyasztása csökkenti a degeneratív betegségek, szív-és érrendszeri betegségek és bizonyos rákos megbetegedések kialakulásának kockázatát. A kísérletek középpontjában a szőlő bioaktív fenolos vegyületi állnak, ezek a vegyületek rendelkeznek számos, már korábban is említett, emberi szervezetre kedvező tulajdonságokkal, mint például antioxidáns, szívvédő, rákmegelőző, gyulladáscsökkentő, antimikrobiális tulajdonságokkal. Ezen felül a szőlőnek ismert még az öregedés gátló hatása is. A szőlőben fellelhető fenolos vegyületek főként antociánok, flavanolok, flavonolok, stilbének (rezervatrol), fenolsavak. Az antociánok főként a szőlő héjában találhatók. A flavonoidok többsége viszont a magban található. A vörös szőlőben az antociánok, míg fehér szőlő fajtákban a flavan 3-ol-ok az uralkodó fenolos vegyületek. A különböző boroknak eltérő fenol tartalmat tulajdonítanak, attól függően, hogy piros vagy fehér szőlőből készült, illetve a különböző készítési eljárásoktól. Például a vörös bort héjon erjesztik, míg fehérbornál a héjat eltávolítják. (En-Qin, et al., 2010)

A növényi hatóanyagok jótékony hatását a francia paradoxon is alátámasztja. A francia paradoxon lényege, hogy a sok zsiradékot tartalmazó francia étrend – főként magas sajt-, vaj- és állati zsiradék fogyasztás – ellenére a szív- és érrendszeri megbetegedések száma Franciaországban alacsonyabb, mint más, átlagosan kevesebb zsírt fogyasztó országokban. (En-Qin, et al., 2010) A paradoxon maga a „sok evés, és mégis egészség” ellentmondás. A rejtély megoldását a franciák által nagyobb mennyiségben fogyasztott vörösbor, ezáltal a szervezetbe jutott fenol vegyületek egészségre gyakorolt jótékony hatása jelentette. (<http://www.videkfejlesztes.net/> 2012.09.24.) Mindemellett a fenolos vegyületek hatásosak a ROS-al (reaktív oxigénformák) szemben is. Ezen okok miatt étrend kiegészítőként is alkalmazható, főként a héjból, magból előállított termékek, hiszen ezek fenol tartalma magasabb, mint magának a szőlő húsának. Mindazonáltal megjelentek

olyan cikkek is melyek szerint magasabb koncentrációban a fenol vegyületek már nem pozitív, hanem negatív hatással bírnak az emberi szervezetre. Ezért szükség van további vizsgálatokra a megfelelő koncentráció megállapításához.

A fenolos vegyületek tehát főként a héjban, magban fordulnak elő, kevesebb mennyiséget tartalmaz a szőlő húsos része. En-Qin és munkatársai kísérlete szerint a fenolos vegyületek összkoncentrációja a magban mintegy 2178,8 mg / g GAE (galluszsav ekvivalensben kifejezve), a héjban 374,6 mg / g GAE, húsos részben 23,8 mg / g GAE, míg a levélben 351,6 mg / g GAE volt.

Az összfenol tartalom függ a szőlő fajtájától, a talaj összetételétől, az éghajlattól, a szőlő származási helyétől, és művelési gyakorlattól, illetve a növényt megtámadó betegségektől, mint például a gombás fertőzésektől.

2. táblázat: Fenolos vegyületek eloszlása szőlőben (En-Qin, et al., 2010)

Növényi rész/termék	Fenolos vegyület
Mag	galluszsav, katechin, epikatechin, procianidin, proantocianidin
Héj	proantocianidin, ellagsav, mircetin, kvercetin, kempferol, transz-rezveratrol
Levél	mircetin, ellagsav, kempferol, kvercetin, galluszsav
Szár	rutin, kvercetin, 3-O- glukurodin, transz-rezveratrol, astibilin
Mazsola	hidroxifahéjsav, hidroximetilfurfural
vörös bor	malvidin-3-glükózid, peonidin-3-glükózid, cianidin-3-glükózid, petunidin-3-glükózid, katechin, kvercetin, rezveratrol, hidroxifahéjsav

2.6. Szőlő és a bor antimikrobiális hatása

Mint már az előző fejezetből is kiderült, hogy bizonyos fenolos komponensek, mint például a rezveratrol, hidroxitirozol, kvercetin, és megannyi fenolsav gátló hatású a mikrobák

növekedésére. Ezekben a vegyületekben gazdag szőlő, és így a belőle készült bor is alkalmas mikroorganizmusok szaporodásának gátlására, illetve akár pusztítására.

A vörös borok összfenol tartalma magasabb, mint a fehér boroké. Ez egyrészt a különböző színű szőlők különböző fenol összetételének, másrészt a borkészítési eljárásnak is köszönhető. Az elkészítési eljárás abban módosítja a fenoltartalmat, hogy míg a fehér borokat szüret után préselik, vörös boroknál szüretelés után héjon erjesztik. Így magasabb az antocián tartalma. A borokban megtalálható fenolok lehetnek mind flavonoid, mind nem flavonoid típusú vegyületek.

A flavonoidok főként flavonolok, flavanolok, antociánok. Nem flavonoid típusú vegyületek a fenolsavak (benzoesav, hidroxifahéjsav), stillbének. A növényi polifenolok antimikrobiális, antifungális, antivirális hatása ismert.

Rodriguez-Vaquero és munkatársai kimutatták, hogy a borok gátolják a különböző mikrobákat, különösen az *Escherichia coli* növekedését. A gátlás a polifenol koncentráció növelésével arányosan nőtt. Az alkohol-mentes vörös és fehér bor is mutatott antimikrobiális hatást bizonyos kórokozók, mint például *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* és a *Candida albicans* ellen. További vizsgálataik szerint a fenolos vegyületek más fajokat is gátoltak, például a *Salmonella* Typhimurium-ot és a *Listeria monocytogenes*-t. *Listeria monocytogenes* esetében a flavonoidok, a rutin és a kvercetin vegyületek mutatták a legnagyobb gátlást.

Papadopoulou és munkatársai kimutatták, hogy a *Staphylococcus aureus* a legérzékenyebb a fenolos vegyületekkel szemben, majd az *Escherichia coli* és a legkevésbé érzékeny a *Candida albicans*.

Ugyanerre az eredményre jutottak Radovanovic és munkatársai. A gátlási zóna átmérője *Staphylococcus aureus* esetében 16-22 mm volt, míg *Escherichia coli* esetében 12-20 mm.

Rotava és munkatársai szerint, a szőlő magból kivont fenolos vegyületek gátolják a *Staphylococcus aureus*, és az *Escherichia coli* növekedését. Viszont *Salmonella* fajok esetében hatástalanok. A legjobb antimikrobiális hatást a szőlőmag kivonat alkalmazása során tapasztalták. A kísérletek szerint a minimális gátlási koncentráció, vagyis a MIC szőlőmag kivonat esetén 0,26 mg GAE/L, míg szár kivonat esetén 0,34 mg GAE/L.

Jayaprakasha és munkatársainak kísérletei szerint a szőlőmag kivonat gátolta a baktériumok növekedését 340-390 mg GAE / L koncentrációban Gram (+) –ok esetén, és 475-575 mg GAE / L koncentrációban Gram (-) baktériumoknál, ill. szőlőlevél kivonatának is tulajdonítanak valamennyi antimikrobiális hatást, bár jelentősen kevesebbet, mint a szőlőmagból származó kivonatoknak.

Brown és munkatársai szerint a legerősebb antimikrobiális hatással *Helicobacter pylori*-val szemben nem a szőlőmag, hanem a szőlő héja rendelkezik. A szőlő fenolos vegyületei közül a rezervatrol erős antifungális hatású a humán patogén gombák ellen, mint például a *Candida albicans*

ellen 10-20 μL –es koncentrációban. Figyelemre méltó előnye, hogy a fenolok indukciója nem volt hemolitikus aktivitású az emberi vörösvértestekre, szemben a kémiai gyógyszerekkel.

Rhodes és munkatársai szerint a fenolos vegyületek hatásosak minden *Listeria* fajjal szemben, illetve más baktériumokkal szemben is, mint például a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus* vagy *Yersinia enterocolitica*. (En-Qin et al., 2010)

A szőlő, illetve a belőle készülő bor hatását az élelmiszeripar is kutatja. A bort vizsgálták, mint lehetséges húspác komponens. A *Campylobacter* nemzetség tagjai az egyik legismertebb élelmiszereredetű enterális megbetegedés okozói. A betegség tünetei között szerepel a hányás, hasmenés, gyomorgörcsök, hasi fájdalom, láz. A fertőzés a felszíni vizek, kutak vizei, nem megfelelően, vagy egyáltalán nem pasztörizált tej, illetve nem megfelelően elkészített hús fogyasztásából eredhet. A legfőbb kockázatot a baromfihús fogyasztás jelenti. A húspácok só, cukrot, tartósítószer (szorbátot, benzoátot, vagy mindkettőt) tartalmaznak. A magas NaCl koncentráció, és az alacsony pH, és a különböző fűszerek együttesen gátolják a mikrobákat, növelve ez által a hús termék eltarthatóságát. Sajnálatos módon a *Campylobacter* nemzetség tagjai így is megjelennek a termékben. Különböző országokban vizsgálták a *Campylobacter* jelenlétét a pácolt, és pác nélküli baromfi hústermékekben, és mindkettőben ki is mutatták. Isohanni és munkatársi kísérleteiben a mind a fehér, és mind a vörösbor hatásos volt *Campylobacter* ellen. Eredményeik szerint a fehérbor 15 perc alatt, a kiindulási sejtszámot (10^8 /ml) egy nagyságrenddel csökkentette. A vörösbor pedig 1 óra alatt érte el ezt az egy nagyságrendbeli csökkentést. (Isohanni et al., 2010)

A szőlő, és a bor nemcsak a baktériumokra, gombákra, hanem a vírusokra is hatással van. Konowalchuck és Speirs bebizonyította, hogy a szőlőlé gátló hatású különböző enterális vírusokra, és a herpesz vírusra. Az enterális vírusok számát egy nagyságrenddel csökkentette 7-es pH, 4 °C-os, 24 órás inkubációs idő után. A bor is hatással volt a vírusokra, viszont gyengébb hatékonysággal. A borok hatékonyságát befolyásolta a szőlő fajtája. Vörös borok eredményessége jobbnak bizonyult, mint a fehérboroké. (Konowalchuck, Speirs, 1976) Ennek magyarázata a már korábban említett borkészítési eljárás. A vörös borokban az antocián tartalom magasabb a héjon erjesztés miatt.

Konowalchuck és Speirs (1978) egy másik kísérletében különböző gyümölcsitalok, gyümölcslevek antivirális hatását vizsgálták. Eredmények szerint a szőlő rendkívül hatékony volt az 1-es típusú poliovírus ellenében, az inkubációs idő után a szőlőlében a túlélő poliovírus arány 1% alá csökkent mind természetes (pH 3,3), mind semleges (pH 7,0) pH érték mellett. Az 1-es típusú poliovírus a poliomyelitis okozója. Idegrendszeri megbetegedés, mely elsősorban a gyermekeket támadja meg. Nevezik a betegséget gyermekbénulásnak is.

A kerek levelű szőlőből (*Vitis rotundifolia Michx.*) készült gyümölcsleveket vizsgálták *Cronobacter sakazakii* ellen. A *Cronobacter sakazakii*, vagy más néven *Enterobacter sakazakii* egy Gram negatív patogén baktérium. Okozhat agyhártyagyulladást, bakterémiát (véráramban

baktériumok jelenléte), necrotizáló enterocolitis-t (koraszülötteknél fertőzés következtében kialakuló béltraktus gyulladás). Kim és munkatársai a bébiételeket, elsősorban a gyümölcsleveket tanulmányozták. Publikációjukban megvizsgálták a kereskedelemben kapható bébi gyümölcslevek összfenol tartalmát. Eredményeik szerint az összfenol tartalom 176,7-347,7 mg / ml között mozgott. Ezek a gyümölcslevek gyenge antimikrobiális aktivitást mutattak. Két óra alatt kevesebb, mint egy nagyságrenddel csökkentették *Cronobacter sakazakii* élő sejszámát (37 °C). A *Vitis rotundifolia*-ból készült gyümölcslevek, függetlenül a feldolgozási módszertől, 6 nagyságrenddel csökkentették a *C. sakazakii* sejszámot ugyanazon az időtartam alatt. A csersav, a borkósav, az almasav mind gátló hatást fejtett ki a mikrobával szemben, de leghatékonyabbnak a csersav bizonyult. Eredményeik alapján a szőlőlé természetes antibiotikumként alkalmazható bébiételekben *C. sakazakii*-val szemben. (Kim et al., 2010)

Peng és munkatársai Taiwan-i vadszőlő (*Vitis thunbergii* var. *taiwaniana*) gyökeréből izolált, úgynevezett heyneanol A vegyület antimikrobiális hatását vizsgálták. A heyneanol A vegyület egy tetramer rezveratrol. A kísérlet eredményei szerint a minimális gátló koncentráció (MIC) 2 µg/ml⁻¹ volt meticilin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) esetében, míg 2-4 µg/ml⁻¹ MIC értéket tapasztaltak *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* és *Streptococcus pyogenes* mikrobáknál. (Peng et al., 2007)

Mint a fentebb említett kísérletek eredményei is, ez a kísérlet is azt támasztja alá, hogy a szőlőben található vegyületek alkalmazhatóak alternatív antibiotikumként. Manapság a legnagyobb aggodalomra az antibiotikum rezisztencia ad okot. Egyre több az ismert antibiotikum rezisztens törzs, meticilin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-rezisztens *Enterococcus* (VRE), multidrog-rezisztens *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB). A mai kutatások elsődleges célkitűzése a rezisztencia kialakulásának megakadályozása, vagy olyan új hatóanyagok felderítése, melyek a rezisztens törzsekkel szemben is alkalmazhatók. Ezek a hatóanyagok megtalálhatóak a szőlőben, különféle bogyós gyümölcsökben, ezek alkalmazása megoldás lehet a nemcsak a rezisztens törzsek gátlásában, hanem nem rezisztens törzsek okozta fertőzések kezelésében, kialakulásának gátlásában.

2.7. A kísérlet során vizsgált mikroorganizmusok jellemzése

2.7.1. *Escherichia coli*

A Gracilicutes törzs, fakultatív anaerob Gram negatív pálcák sectio, Enterobacteriaceae családjában az *Escherichia* nemzetséghez tartozó faj. Peritrich flagellumokkal rendelkező egyenes pálca, vékony tokja van. Az emberek, állatok béltraktusában megtalálható, a normál bélflóra tagja, jelenléte kedvező, hiszen vitaminokat szolgáltat a gazdaszervezet számára (K vitamin). Legtöbb szerotípus ártalmatlan, de például az O157: H7 ételmérgezést okozhat. A betegség kiváltásában a baktérium által termelt enterotoxinoknak van szerepe. Könnyen tenyészthető, gyakran használt vizsgálati mikroorganizmus mind mikrobiológiai, mind molekuláris biológiai vizsgálatokban.

2.7.2. *Serratia marcescens*

A Gracilicutes törzs, fakultatív anaerob Gram negatív pálcák sectio, Enterobacteriaceae családjában az *Serratia* nemzetséghez tartozó faj. Rövid pálcás, peritrich csillózáttal rendelkező baktérium. Vörös színű pigmentje a prodigiosin, mely vízben nem oldódik. *Serratia* nemzetséghez tartozó fajok szaprofiták. Opportunista patogének lehetnek, azaz legyengült immunrendszerű gazdaszervezetben okozhatnak megbetegedéseket.

2.7.3. *Bacillus subtilis*, és *Bacillus cereus*

Firmicutes törzs, endospóras Gram pozitív pálcák, és kokkuszok sectio, *Bacillus* nemzetségébe tartozó fajok. Aerobok, vagy fakultatív anaerob pálcák. A peptidoglukán sejtfaluk mezo-diaminopimelinsavat tartalmaz. A *Bacillus subtilis*, és *Bacillus cereus* nem patogén fajok. A *B. cereus* egyes növényi eredetű élelmiszereken keresztül válthat ki bélrendszeri panaszokat, míg a *B. subtilis* sebfertőzésekben tenyészthető ki, de jellemzően apatogén szervezetek. A *B. subtilis*-t felhasználják az ipari mértékű enzimtermelésben, α -amilázait az ipari keményítőbontásban hasznosítják. A *Bacillus* nemzetségbe tartozó fajok között ismert patogén faj, például a *Bacillus anthracis*, ami a lépfene kórokozója. A nemzetség egy másik ismert, és jól hasznosított tagja a *B. thuringiensis*, ami β - és δ toxinja révén használatos a biológiai növényvédelemben.

2.7.4. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*

Ascomycota-k törzsébe, a Hemiascomycetes-ek osztályába, a Saccharomycetales (Endomycetales) rendjébe, a Saccharomycetaceae családjába tartozó élesztő fajok, apatogének. A *Saccharomyces cerevisiae*-re jellemző a sarjadzások szaporodás, de extrém körülmények között képes pszeudomicélium képzésre is. Az egyik legtöbbet tanulmányozott eukarióta modellszervezet a molekuláris- és a sejtbiológiában. A *Pichia anomala* használható *Aspergillus flavus* ellen. Az Agricultural Research Service kísérleteiben a *Pichia anomala*-val kezelt pisztácia fákon gátolta az *Aspergillus flavus* növekedését, az esetek 97%-ban.

2.7.5. *Aspergillus niger*, és *Penicillium* spp.

Az Ascomycota-k törzsében az Euascomycetes-ek osztályába, Euritiales rendjébe, a Trichocomaceae családjába tartozó fajok. *Aspergillus niger*-t a 1930-as évektől elsősorban az ipari mértékű biotechnológiai úton előállítható citromsavtermelésben használják. Az többnyire apatogének, viszont ismert az *Aspergillus*ok között opportunistá patogén kórokozó is például az *A. fumigatus*, nagy mennyiségű spóra belégzése esetén súlyos tüdőbetegség, aspergillosis is kialakulhat. A *Penicillium* fajok a humán gyógyászatban váltak nélkülözhetetlenné, az antibiotikum termelő képességük révén. Illetve sajtgyártásban is jelentős szerepet töltenek be a különböző *Penicillium* fajok (pl: *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*). Ezek mellett meg kell említeni, hogy mindkét faj képes mikotoxin termelésre.

2.7.6. *Rhizopus stolonifer*

A Zygomycota-k törzsébe, a Zygomycetes-ek osztályába, a Mucorales rend, az Absidiaceae családban, a *Rhizopus* nemzetségbe tartozó faj. Szinte mindenütt előfordul, apatogén. Gyümölcsök rothadási folyamatait idézi elő. Fumársav és korizon előállításához használják. (Kevei, Kucsera, 2004)

3. ANYAGOK, ÉS MÓDSZEREK

3.1. Növényi anyag- Szőlőfajták

3.1.1. Kunleány

Magyar nemesítésű fehérbor szőlőfajta. Tamássy István és Koleda István nemesítette *Vitis vinifera*, *Vitis amurensis*, és *Afu Ali* keresztezéséből. Jellemzője, hogy késői érésű, fagyra, gombás fertőzésekre nem érzékeny. Alkalmas pezsgőgyártásra is. Származási helye Kunsági borvidék, szüretelési éve 2011. (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Kunle%C3%A1ny> 2012.09.10.)

3.1.2. Piros sasza

Csemegeszőlő, minden bortermelő országban ismert, és termesztett fajta. Magyarországon történő meghonosítása Fábíán József nevéhez köthető, ezért gyakran *Fábiánszőlőnek* is nevezik. Fagyűrő, fekvés iránt nem, talajra igényes fajta. Legfontosabb fajtacsoportjai a passatutti, piros sasza, fehér sasza. Származási helye Kunsági borvidék, szüretelési éve 2011. (<http://hu.wikipedia.org/wiki/Sasza> 2012.09.10.)

3.1.3. Cabernet sauvignon

Kékszőlő fajta. *Cabernet franc* és *Sauvignon blanc* vadkereszteződésének eredménye. Fagyűrő, rothadásnak ellenáll, lisztharmatra érzékeny fajta. Bogyójainak héja vastag, színanyagban gazdag. Származási helye Kunsági borvidék, szüretelési éve 2011. (http://hu.wikipedia.org/wiki/Cabernet_sauvignon 2012.09.10.)

3.2. Alkalmazott mikroorganizmusok

- Gram negatív baktériumok: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*
- Gram pozitív baktériumok: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*
- Élesztőgombák: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*
- Fonalas gombák: *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus stolonifer*

3.3. Kísérlet menete

3.3.1. Szőlő előkészítés

A három különböző szőlő (fehér- Kunleány, piros- Piros saszla, vörös- Cabernet sauvignon) préselése után a visszamaradt törkölyből, a magokat és a héjat elkülönítettük, majd fagyasztva tároltuk, illetve a harmadik típusú mintaként a szőlő mag és héj együttes fagyasztva tárolása történt felhasználásig. Így tehát 9 minta készült:

1. minta: fehér szőlő törköly (mag és héj);
2. minta: fehér szőlő héj;
3. minta: fehér szőlő mag;
4. minta: saszla törköly;
5. minta: saszla héj;
6. minta: saszla mag;
7. minta: vörös szőlő törköly;
8. minta: vörös szőlő héj;
9. minta: vörös szőlő mag

3.3.2. Liofilezés

A különböző szőlők törkölyének, illetve a szétválogatott mag, és héj fagyasztva szárítása. A liofilezés időtartama 3 nap volt. A fagyasztva szárítás LYOVAC GT2 típusú laboratóriumi liofilező berendezéssel történt. A készülék működési elve, hogy a mélyhűtött anyagokból vákuumban a jég olvadás nélkül, szublimálva távozik, majd a berendezésnek az erre a célra kialakított részében jég formájában kondenzál. A szárítási művelet befejeztével a jég felolvad, és leereszthető a rendszerből.

3.3.3. Darálás

A már liofilezett minták porrá őrlése háztartási robotgéppel.

3.3.4. Kivonat készítés

A kivonat készítés első lépéseként, a 9 különböző minta 1 grammnyi mennyiségéhez 20 ml kivonószert (Etilalkohol: H₂O: aceton 28:42:30 elegy) adtunk, majd 24 órára sötétben tároltuk. Ezután szűrőpapír segítségével az elegy szűrése következett, majd petri csészékben 40 °C-os vízfürdő felett az aceton elpárologtatása történt. Elpárologtatás után szárítószekrényben 80 °C-on a már aceton mentes oldat kiszárítása következett, ami közel 2 órát vett igénybe, majd a visszamaradó anyag tömegmérése és 30%-os etanollal 50 mg/ml- re történő beállítására került sor. Ezután az 50 mg/ml-es törzsoldat steril szűrőn keresztüli szűrése, illetve steril fél kémcsövekben hűtőben történő tárolása történt a felhasználásig.

3.3.5. Táptalajok főzése, kiöntése

A baktériumok számára TGE, *Escherichia coli* számára LB, gombák számára pedig malátás táptalajt készítettünk.

TGE táptalaj 1000 ml-re

- Glükóz 10 g
- Pepton 5 g
- Élesztőkivonat 2,5 g
- Agar-agar 25 g

LB táptalaj 1000 ml-re

- Kazein pepton 10 g
- NaCl 10 g
- Élesztőkivonat 5 g
- Agar-agar 25 g

Malátás táptalaj 1000 ml-re

- Glükóz 10 g

- Malátakivonat 10 g
- Élesztőkivonat 5 g
- Agar-agar 30 g

Mind három esetben tápleves készítése esetén az agar-agar összetevő elhanyagolandó.

3.3.6. Mikroorganizmusok előkészítése

Baktériumok, és élesztők esetében a kísérlet megkezdése előtt 24 órával leoltás táplevesbe. Fonalas gombák esetében a kísérlet megkezdése előtt 72 órával leoltás ferde agarra, majd kísérlethez steril desztillált vízzel spórák lemosása.

3.3.7. Agardiffúziós tesztek: korongdiffúziós teszt; lyukdiffúziós teszt

A megfelelő táptalaj kiöntése, beszárítása után a táptalajra 100 µl sejt illetve spóra szuszpenziót szélesztettünk, beszárítottuk, majd sterilizett és hatóanyaggal átitatott korongokat helyeztünk rá, majd a szükséges inkubációs idő után a gátlási zónákat megmértük. Lyukdiffúziós teszt esetén a szélesztés után steril dugófűró segítségével az táptalajba lyukat fűrtünk, majd a lyukba a hatóanyagot pipettáztunk, az inkubációs idő leteltével az eredményeket értékeltük, azaz a gátlási zónákat megmértük. Kontrollként hatóanyag helyett 30%-os etanol szolgált. Ezzel mérhető, hogy az etanolnak van-e hatása a mikrobák növekedésére, ha van, akkor a hatóanyagnál mért gátlási zónáknál számolni kell az etanol gátlásával, azaz a hatóanyagnál mért gátlási zónából le kell vonni az etanolnál mért gátlási zóna nagyságát. Eredmények értékelése élesztők, és baktériumok esetén 24 óra múlva, fonalas gombák esetében 48-72 óra múlva történt.

3.3.8. MIC, és MBC megállapítása

MIC azaz a Minimum Inhibitory Concentration, vagyis a minimális gátló koncentráció, az a mennyisége az adott hatóanyagnak, mely gátolja a mikrobák növekedését. Az MBC (Minimum Bactericidal Concentration) azt az anyagmennyiséget jelenti, amely nemcsak gátolja a mikrobák növekedését, hanem el is pusztítja azokat. MIC és MBC meghatározása makrohígításos módszerrel történt. Sterilizett kémcsövekbe 1 ml táplevest pipettáztunk, majd az első kémcsőbe 100 mg/ml koncentrációjú hatóanyagot kevertünk, illetve felező hígítással 3,6 mg/ml-es végkoncentrációig hígítottunk (tehát az első kémcsőből 1 ml átpipettázása a következő kémcsőbe, ami így már 50

mg/ml koncentrációjú, és így tovább egészen 3,6 mg/ml koncentrációig). Ezekbe a kémcsövekbe a kísérlet megkezdése előtt 24 órával táplevesbe leoltott szuszpenzióból 100 µl pipettáztunk. A kísérlet értékelése során, ahol nem volt látható zavarosság, vagy szaglással nem volt érzékelhető a mikrobák jelenléte, azt nevezhetjük minimális gátló koncentrációnak. MBC meghatározásához, azokból a kémcsövekből, ahol nem észlelhető mikroba jelenlét 100 µl leoltottunk ferde agarra. Ahol nem volt mikroba növekedés az inkubációs idő leteltével, annál a koncentrációnál található a minimális baktericid koncentráció.

3.3.9. Túlélési tesztek

A kísérletet *Bacillus cereus* baktériummal végeztünk el, mert csak ennél a mikrobánál tudtuk pontosan meghatározni az MBC értékét. Az alkalmazott minták pedig a törkölyös (szőlő mag és héj együtt) minták voltak. A teszthez elsőként a sejtsuszpenziót 10^6 ml sejtsűrűségűre kellett beállítanunk. A sejtsuszpenzió 2 ml-éhez kevertük az adott koncentrációjú hatóanyagot, úgy, hogy a végkoncentráció az adott mikroba MBC értékének megfelelő legyen. Ebből 1 óra, 2, óra, és 4 óra elteltével kell 3 lépcsős hígítási sort készítettünk, majd mindegyik mintából 100 µl-nyit petri csészére szélesztettünk. Kontrollként a hatóanyag nélküli minta, és annak 3 lépcsős tizedelő hígításából történő szélesztés szolgált. Eredmény értékelésekor az élő sejtszámot vizsgáltuk, vagyis az inkubációs idő elteltével a petri csészéken található telepek számolása történt.

3.3.10. Növekedési gátlási tesztek

Erlenmeyer lombikban 30 ml a vizsgált mikroorganizmusnak megfelelő tápoldatot bemértük. A tápoldathoz 150 mg hatóanyag keverésére volt szükség, így a végkoncentráció 5 mg/ml-es volt. Ehhez az elegyhez 300 µl sejtsuszpenzió pipettáztunk, majd 2 óránként megmértük az abszorbanciát 29 órán keresztül. A mérésekből a szaporodási görbéket felvettük, majd a szaporodási rátát, és a lag fázis hosszát meghatároztuk.

4. EREDMÉNYEK, ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Agardiffúziós tesztek

4.1.1. Lyukdiffúziós teszt

A héjas, illetve törkölyös mintákat 50 mg/ml koncentrációban, a magos mintákat 25 mg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A steril dugófűróval vájt lyukakba 100 µl hatóanyag került. Gátlási zóna csak *Bacillus cereus*, és *Bacillus subtilis* esetében volt látható. A többi mikroorganizmus nem adott gátlási zónát. A steril dugófűró átmérője 0,8 cm. Kontrollként 30%-os etanol szolgált, amely egyik mikroorganizmus esetében sem adott gátlási zónát, tehát az etanolnak nem volt gátló hatása a mikrobák növekedésére, így az észlelt gátlási zónák teljes mértékben az alkalmazott hatóanyagoknak volt köszönhető.



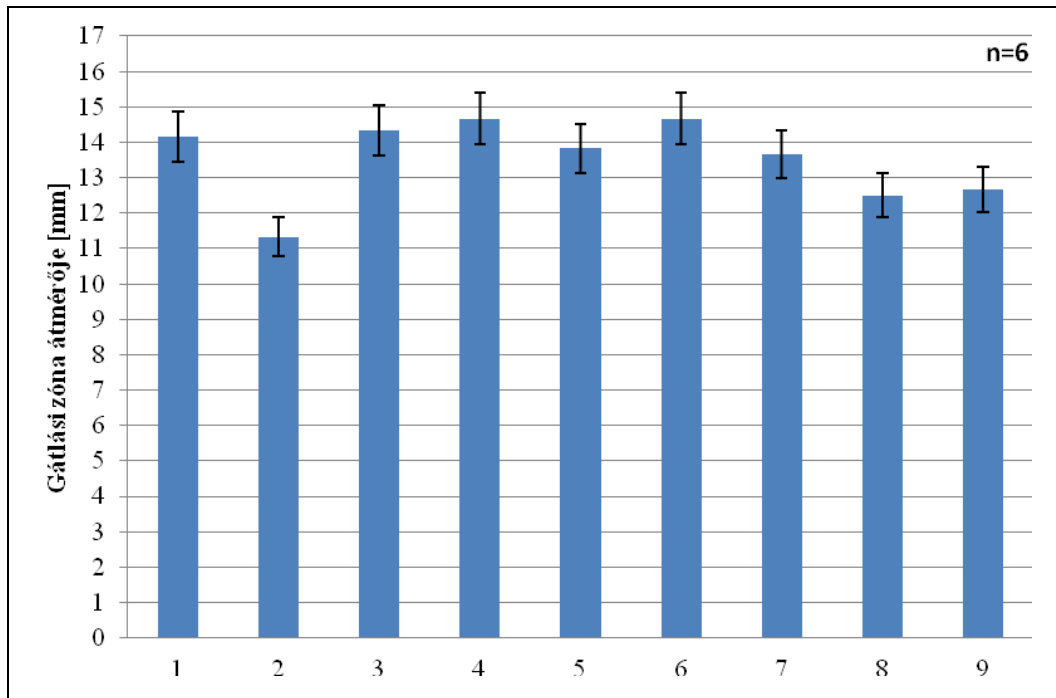
11. ábra *Bacillus cereus* gátlási zónája Kunleány tőröly hatására



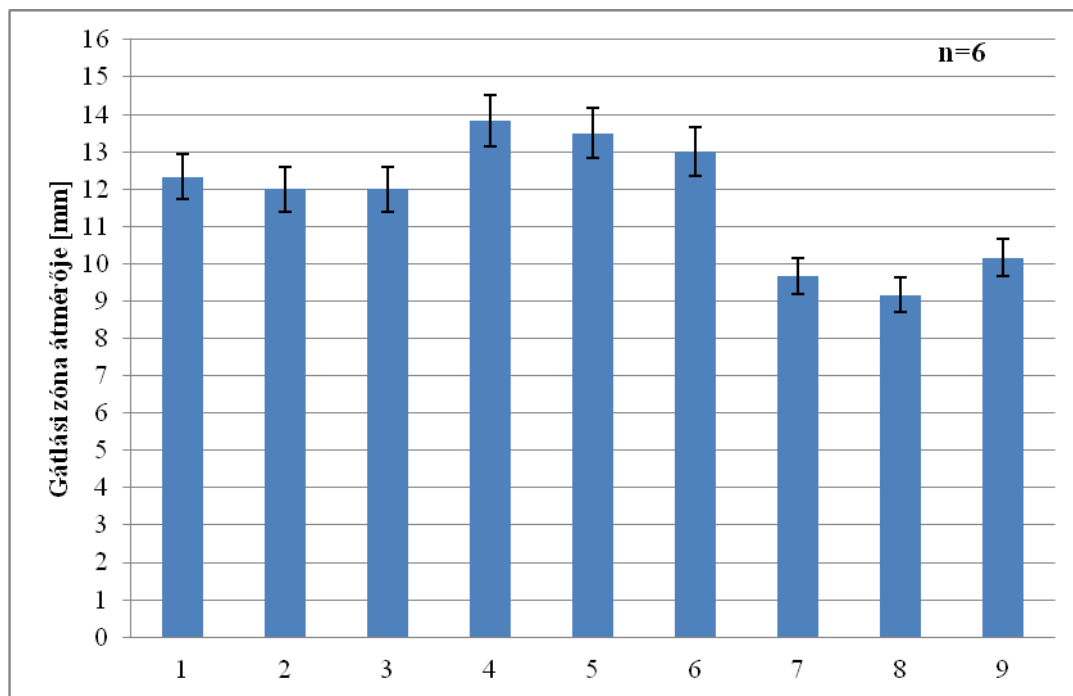
12. ábra *Bacillus cereus* gátlási zónája Piros saszla törköly hatására



13. ábra *Bacillus cereus* gátlási zónája Cabernet törköly hatására



14. ábra Gátlási zóna átmérője *Bacillus cereus* esetén



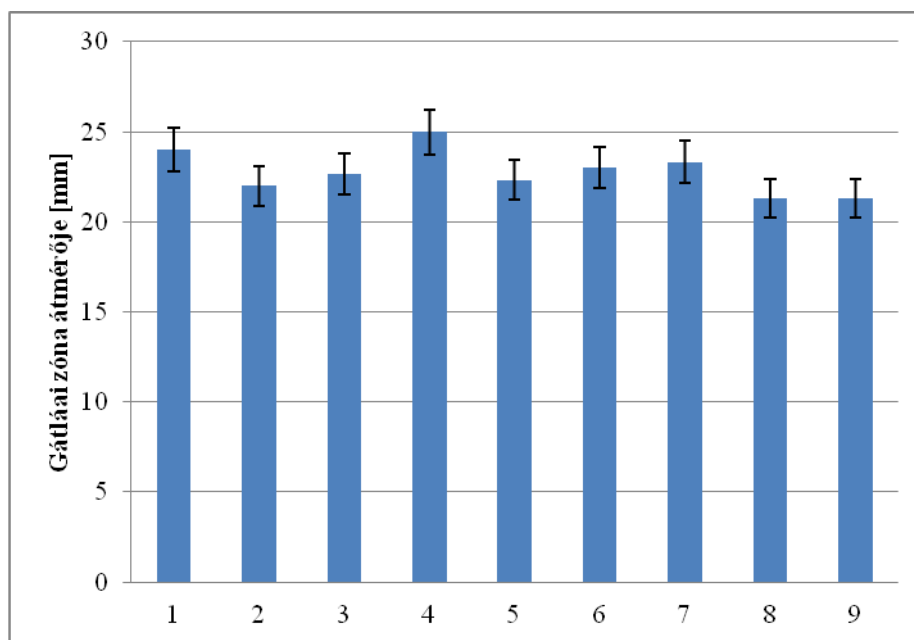
15. ábra Gátlási zóna átmérője mm-ben *Bacillus subtilis*-nél

A kísérlet eredményeként megállapítható, hogy mindkét mikroorganizmusnál a piros saszla törköly volt a leghatásosabb. Ha a szőlőket rangsoroljuk a kísérleti eredmények alapján, akkor a leghatékonyabb a Piros Saszla, majd Kunleány, és végül a Cabernet sauvignon. Ha a minta típusokat rangsoroljuk, akkor leghatásosabbnak a törköly minta (szőlő mag és héj együtt) volt, ezt

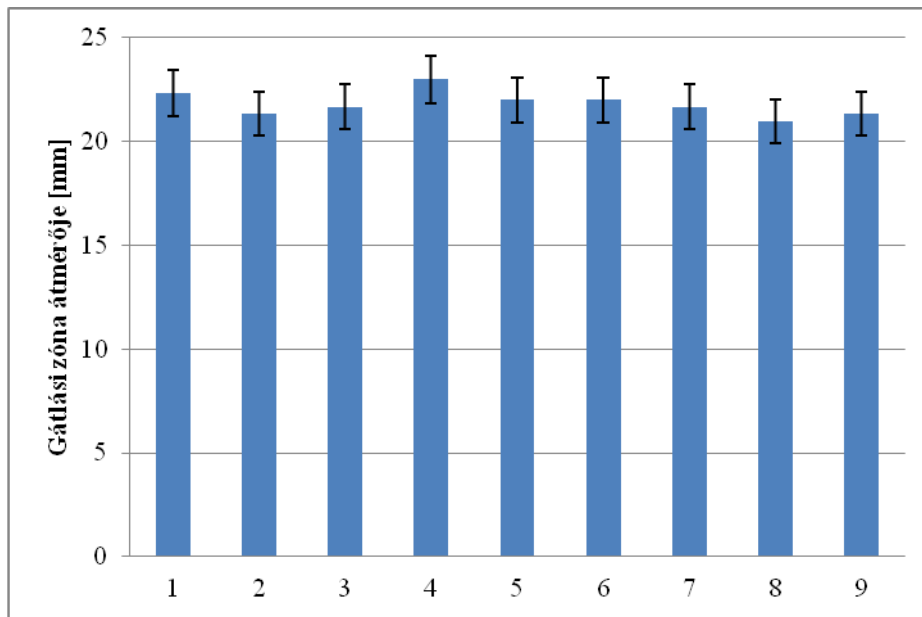
követte a magos minta, és legkevésbé hatásos a szőlő héj volt. Beszámítva viszont azt, hogy a magos mintákat csak 25 mg/ml-es koncentrációban alkalmaztam, míg a többi mintát 50 mg/ml-es koncentrációban, így a legjobbnak a magos minták bizonyulnak. A mikroorganizmusok közül a *Bacillus cereus* a legérzékenyebb a hatóanyagokra.

4.1.2. Korongdiffúziós teszt

Elsőként 6 mm-es sterilizált korongot 10 µl hatóanyaggal itattunk át, és a már szélesztett petricsészékre helyeztük. Ennél a kísérletnél egyik mikroorganizmus sem adott gátlási zónát. Következő vizsgálatnál már 20 mm átmérőjű sterilizált korongot használtunk, amin 60 µl hatóanyagot oszlattunk el. A kísérlet eredményeként azt tapasztaltam, hogy, mint a lyukdiffúziós kísérlet esetében is csak a *Bacillus cereus*, és a *Bacillus subtilis* mutatott gátlási zónát, a többi mikroba nem. Ezért további kísérleteimet csak ezen két baktériummal végeztem el.



16. ábra Gátlási zóna átmérője *Bacillus cereus*-nál



17. ábra Gátlási zóna átmérője *Bacillus subtilis*-nél

Mint a lyukdiffúziós kísérlet esetében, itt is a *Bacillus subtilis* növekedését gátolták kevésbé a hatóanyagok. A különböző szőlők és növényi részek rangsorolása is megegyezik a lyukdiffúziós kísérletben tapasztaltakkal. Leghatékonyabb tehát a saszla szőlő, növényi rész tekintetében pedig magok bizonyultak a legjobbnak.

4.2. MIC és MBC meghatározás makrohígítási módszerrel

3. táblázat: A különböző hatóanyagok *Bacillus cereus* növekedésére gyakorolt hatása

Minta	Alkalmazott hatóanyag koncentráció mg/ml-ben					
	100	50	25	12,5	6,25	3,12
1.Kunleány törköly	-	-	+	+	+	+
2.Kunleány héj	-	-	+	+	+	+
3.Kunleány mag	-	-	+	+	+	+
4.Saszla törköly	-	-	+	+	+	+

5.Saszla héj	-	-	+	+	+	+
6.Saszla mag	-	-	-	-	-	+
7.Cabernet törköly	-	-	-	+	+	+
8.Cabernet héj	-	-	-	-	+	+
9.Cabernet mag	-	-	-	-	+	+

A táblázat tartalmazza a különböző minták hatását a mikrobára. A + jellel jelöltem a mikroba jelenlétet, - jellel a hiányt.

A kísérlet értékelésekor azt a legkisebb koncentrációt neveztem MIC-nek, ahol mikroba növekedés nem volt tapasztalható (zavarosság, szag hiány) a 24 órás inkubációs idő után. Ezekből a mintákból, illetve az utánuk következő nagyobb koncentrációkból 100 µl-nyi leoltásra került, és ahol már nem volt látható növekedés, az, az érték felel meg az MBC-nek. Ezek alapján, a következő MIC és MBC értékeket kaptam:

4. táblázat: A különböző hatóanyagok MIC, és MBC értékei *Bacillus cereus*-nál

Minta	Alkalmazott hatóanyag koncentráció mg/ml-ben					
	100	50	25	12,5	6,25	3,12
1.Kunleány törköly		MBC		MIC		
2.Kunleány héj		MBC	MIC			
3.Kunleány mag		MBC		MIC		
4.Saszla törköly		MBC		MIC		
5.Saszla héj		MBC		MIC		

6.Saszla mag					MBC MIC	
7.Cabernet törköly			MBC	MIC		
8.Cabernet héj				MBC	MIC	
9.Cabernet mag				MBC	MIC	

A táblázatból látható, hogy *Bacillus cereus* MBC értéke egyik mintánál sem haladta meg az 50 mg/ml-es koncentrációt. Illetve megállapítható az is, hogy a mikroba gátlására leginkább a vörös szőlő hatott, valamint a piros saszla mag. Vörös szőlő mintáknál a törkölyös minta 25 mg/ml-es koncentrációban történő alkalmazása felel meg a minimális baktericid koncentrációnak, míg csak magot illetve csak héjat tartalmazó mintáknál a 12,5 mg/ml-es koncentráció adja az MBC értékét. Piros saszla mag esetében az MBC, és a MIC értékét is a hatóanyag 6,25 mg/ml-es koncentrációja adja.

5. táblázat: A különböző hatóanyagok *Bacillus subtilis* növekedésére gyakorolt hatása

Minta	Alkalmazott hatóanyag koncentráció mg/ml-ben					
	100	50	25	12,5	6,25	3,12
1.Kunleány törköly	-	-	+	+	+	+
2.Kunleány héj	-	-	+	+	+	+
3.Kunleány mag	-	-	+	+	+	+
4.Saszla törköly	-	-	+	+	+	+
5.Saszla héj	-	-	+	+	+	+
6.Saszla	-	-	-	+	+	+

mag						
7.Cabernet törköly	-	-	+	+	+	+
8.Cabernet háj	-	-	-	+	+	+
9.Cabernet mag	-	-	-	+	+	+

6. táblázat: *Bacillus subtilis* MIC, és MBC értékei

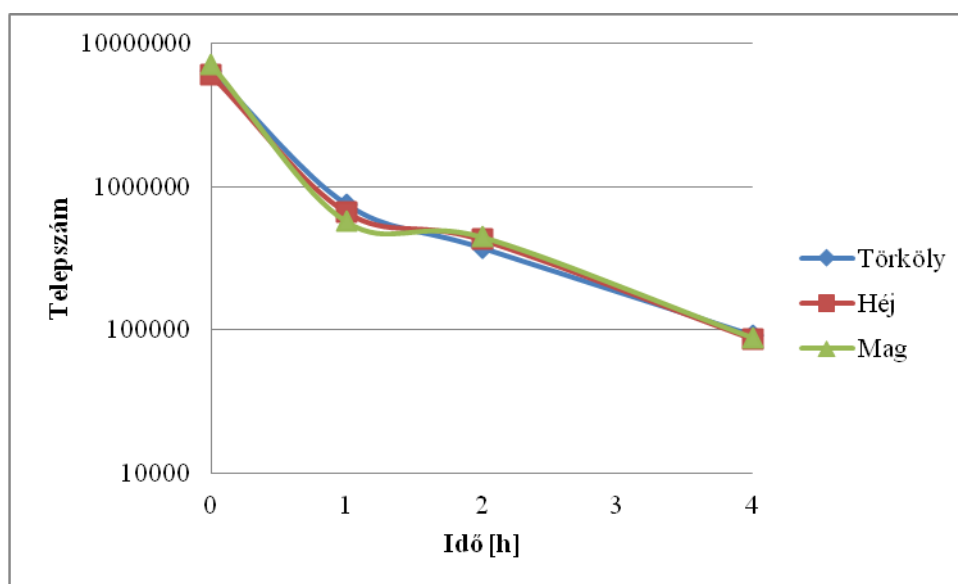
Minta	Alkalmazott hatóanyag koncentráció mg/ml-ben					
	100	50	25	12,5	6,25	3,12
1.Kunleány törköly		MIC				
2.Kunleány háj		MIC				
3.Kunleány mag		MIC				
4.Saszla törköly		MIC				
5.Saszla háj		MIC				
6.Saszla mag			MIC			
7.Cabernet törköly		MIC				
8.Cabernet háj			MIC			
9.Cabernet mag			MIC			

Az táblázatban nem látható, a *Bacillus subtilis* MBC értéke. Az MBC érték minden mintánál nagyobb volt, mint 100 mg/ml. Az MIC értékek 25-50 mg/ml-es koncentrációknál találhatók.

Az előző kísérletekhez hasonlóan itt is bebizonyosodik az, hogy a *Bacillus subtilis* kevésbé érzékeny ezekkel a hatóanyagokkal szemben.

4.3. Túlélési teszt eredmények

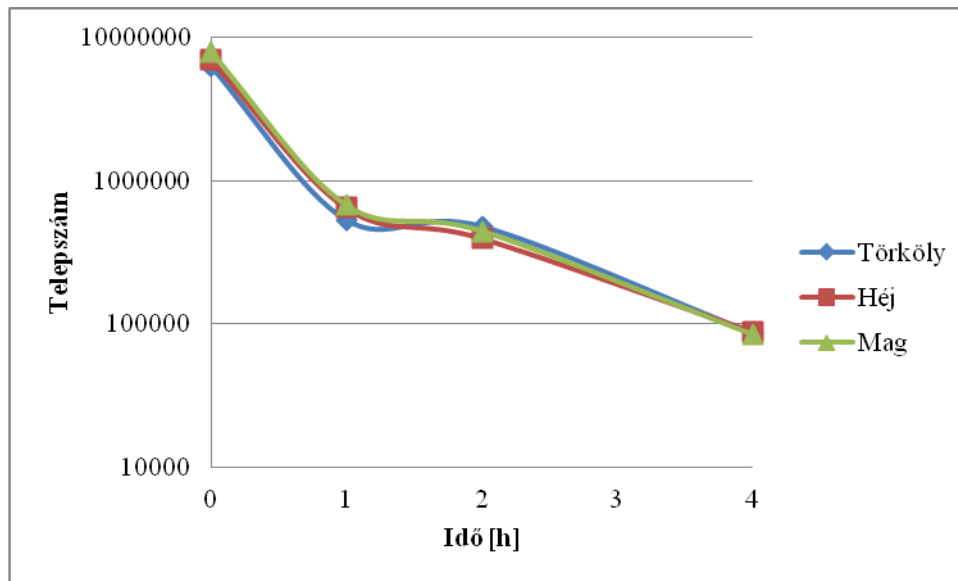
A túlélési tesztet, csak *Bacillus cereus*-nál végeztük el, és a különböző mintáknál tapasztalt MBC értékeket alkalmaztuk. A kezdeti sejtszám $8,8 \cdot 10^6$ -on volt Bürker kamrás számolással. Ezek alapján az eredményeim a következők lettek:



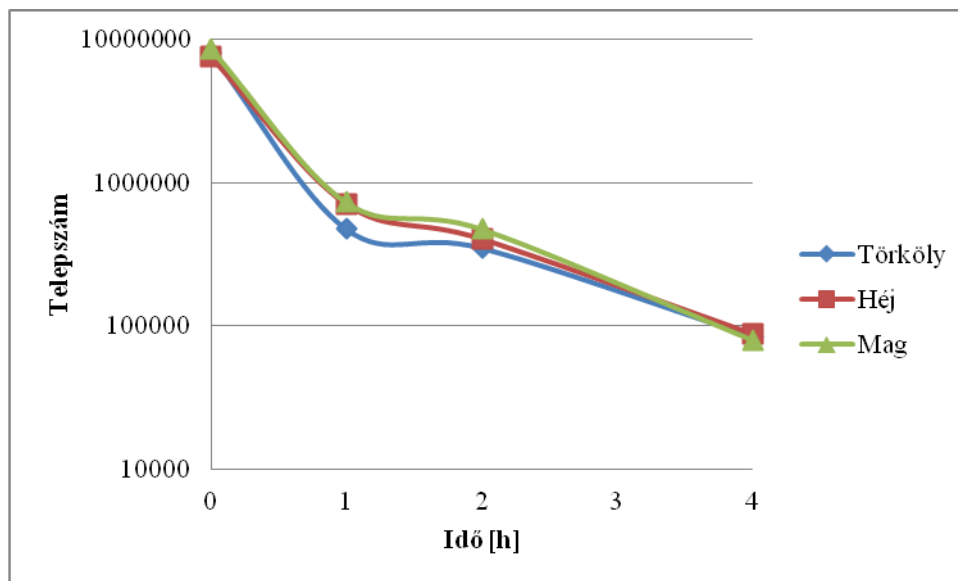
18. ábra Kunleány szőlő hatása *Bacillus cereus*-ra

A diagram tartalmazza mindhárom fehér szőlő minta, tehát a törköly, a héj, és a mag mintánál tapasztalható sejtszám változást. Az ábrán látható, hogy mindhárom minta egy óra után az élő sejtszámot egy nagyságrenddel csökkentette, tehát 10^6 kezdeti sejtszámok után 10^5 -es túlélő sejtszámokat tapasztalhatunk. A második órára ezek a számok tovább csökkentek, bár közel sem olyan mértékűt, mint az első óra után. A négy órás mérés után további egy nagyságrend csökkenést észlelhetünk. Tehát összességében a négy órás kezelés során az élő sejtszám 10^6 -ról 10^4 -re csökkent mindhárom fehér szőlő minta esetén.

A fehér szőlőnél tapasztaltak a piros szőlőre is érvényesek, a mikroba élő sejt száma a kezelés ideje alatt két nagyságrenddel csökkent mindhárom minta típusnál.



19. ábra Saszla szőlő hatása *Bacillus cereus*-ra



20. ábra Cabernet sauvignon szőlő hatása *Bacillus cereus*-ra

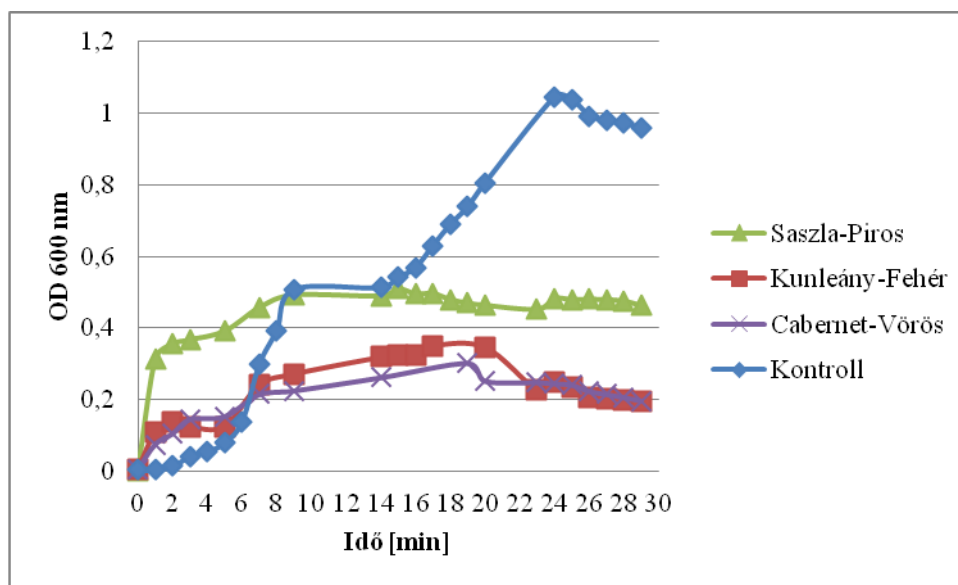
Mint a fehér és a piros szőlő esetében is, ugyanúgy a vörös szőlő alkalmazásakor is hasonló eredményeket tapasztaltam. Négy órás kezelés során a sejtszám két nagyságrendet csökkent.

4.4. Növekedés gátlási teszt eredmények

A kísérlethez csak a törkölyös mintákat alkalmaztuk, és a kontrollhoz viszonyítva vizsgáltuk a hatóanyagok növekedésre gyakorolt hatását.

Normál körülmények között a baktériumok növekedésének első szakasza a lag fázis, mikor is a baktériumok átoltás után alkalmazkodnak az új közeghez, ebben a szakaszban még nem szaporodnak. A következő exponenciális szakaszban beindul a gyors szaporodás, ütemére jellemző, az időegység alatti megkettőződés. A harmadik a stacioner fázis melyben a sejthalál, és a sejtszaporodás egyensúlyban van. Az utolsó fázis pedig a hanyatló fázis, melyben a sejtpusztulás mértéke nagyobb, mint az új sejtek létrejötte. (Kevei, Kucsera, 2004)

Kísérleteimben azt vártam, hogy a normál körülmények között jellemző szaporodási görbét az alkalmazott hatóanyagok valamilyen módon megváltoztatják, módosítják, például elnyújtják a lag fázist, vagy csökkentik a sejtszámot. Az alábbi ábra tartalmazza a kísérlet során kapott grafikont.



21. ábra *Bacillus cereus* növekedésének gátlása a különböző hatóanyagok hatására

Az eredmények a vártak megfelelőek. Bár a lag fázis elnyújtása nem jelentkezik, de a kontrollhoz képest mindhárom minta összes sejtszáma jóval alacsonyabb, mint a kontrollé, a görbék laposabbak. A kezdeti gyors növekedés után, mely valószínűleg a magas cukortartalomnak köszönhető a sejtszám már gyakorlatilag alig változik, kissé emelkedik csak. Ez a kezdeti gyors sejtszám növekedés főleg a saszla szőlőnél kiemelkedő. A kontrollnál viszont szépen kirajzolódik a jellegzetes lag fázis utáni gyors exponenciális növekedés, mely 9 óra után stagnál, majd 5-6 óra múlva újra gyors növekedésnek indul, míg eléri a maximális sejtszámot. Ez a jelenség a szinkron

szaporodással magyarázható. A sejtek nagyjából egyszerre kezdenek el szaporodni, így egy lépcsőszerű mintázat mutatkozik.

A szaporodási ráta, és a lag fázis hossza a növekedési görbe logaritmikus szakaszára illesztett egyenes segítségével határozható meg. Az egyenes egyenletének ($y=ax+b$) meredeksége adja a szaporodási rátát, míg metszéspontja a lag fázis hosszát. A szaporodási rátákat, és a lag fázisok hosszát az alábbi táblázat tartalmazza:

7. táblázat: *Bacillus cereus* szaporodási rátája, és lag fázisának hossza a különböző szőlők hatására

	Szaporodási ráta [1/h]	Lag fázis hossza [h]
Kontroll	0,1113	4,45
Kontroll	0,0642	7,07
Kunleány- Fehér	0,0675	-
Saszla- Piros	0,1777	-
Cabernet- Vörös	0,045	-

A táblázatban két kontroll érték látható, ennek oka a lépcsőzetes jellegű szaporodás. Az első érték a kezdeti szaporodás rátáját adja, míg a második érték a 14. óra után meginduló második gyors szaporodás rátáját. Megállapítható az is, hogy a második gyors növekedés már nem olyan markáns, mint a kezdeti szaporodás. A kezdeti szaporodási ráta majdnem a kétszerese a második növekedésnél tapasztaltnak. A táblázatból az is látható, hogy a kontroll szaporodási rátáját meghaladja a saszla szőlőnél tapasztalt érték. Ennek oka a már korábban is említett gyors kezdeti növekedés, mely a mikrobák számára kedvező magas cukortartalommal magyarázható. Ugyanezen okból lag fázis hossza csak a kontrollnál határozható meg. A kezdeti szaporodáshoz tartozó lag fázis hossza közel 4 és fél óra, második értékhez tartozó pedig meghaladta a 7 órát.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Számos közlemény számol be a szőlő emberi szervezetre gyakorolt jótékony antioxidáns, és antimikrobiális hatásáról. Irodalmak szerint Gram pozitív, és Gram negatív baktériumokra egyaránt hatásos, ezen felül hatással van a különféle enterális vírusokra, gombákra is. Ezzel szemben kísérleteimben alkalmazott mikroorganizmusok közül, csak a Gram pozitív baktériumokkal szemben találtam hatásosnak. A Gram pozitív baktériumok sejtfala lazább szerkezet, a sejtmembrán szerkezet kevésbé kompakt, nem rendelkeznek külső sejthártyával, mint a Gram negatív baktériumok. Így a hatás, illetve az eredményesség Gram pozitív baktériumoknál nagyobb mértékű. Ezt számos kutató alátámasztotta kísérleteivel.

A vizsgált Gram pozitív baktériumok a *Bacillus cereus*, és a *Bacillus subtilis*. Rhodes és munkatársai kísérleteiben bebizonyította, hogy a szőlőkivonat *Bacillus cereus*-ra gátló hatású. Hasonló eredményeket tapasztaltam. *Bacillus subtilis*-re gyakorolt hatásról nem olvastam az irodalomban.

Összegezve kísérletem eredményit a szőlőben fellelhető vegyületek gátló hatásúak *Bacillus cereus*, és *Bacillus subtilis* mikrobákra. Kísérleteim szerint *Bacillus cereus* érzékenysége nagyobb mértékű, mint a *Bacillus subtilis*-é. Ez bebizonyosodott mind az agardiffúziós kísérletek, mind a MIC és MBC meghatározási kísérletek alapján.

Az agardiffúziós kísérletekben a leghatékonyabbnak a sasza szőlő bizonyult, a minta típust tekintve a szőlő magból készült kivonathoz képest a legnagyobb gátlási zónát, mindkét baktérium esetében. Az irodalomban olvasottak szerint a szőlőben megtalálható vegyületek többnyire a magban, héjban, fordulnak elő, kisebb mértékben a szőlő húsos részében. Kísérleteimben hasonlókat tapasztaltam. A magból készült kivonatos minták mutatták a legnagyobb gátlási zónát mindkét baktérium esetében az agardiffúziós tesztek során. Bár az irodalom a vörös szőlőt tartja a legaktívabbnak gátlás tekintetében, az agardiffúziós kísérleteimben a vörös szőlő a volt a legkevésbé hatásos.

A minimális gátló koncentráció, és minimális baktericid koncentráció meghatározási kísérletekben a *Bacillus cereus* MBC értéke egyik mintánál sem haladta meg az 50 mg/ml-es koncentrációt. Az eredményekből kiderül az is hogy a mikroba gátlását leginkább a magos minták eredményezték. Ez szintén megegyezik az előbb is említett ténnyel, hogy a szőlő magja mutatja a legnagyobb antimikrobiális aktivitást. Ebben a kísérletemben az előző eredményhez képest a vörös szőlő volt a leghatékonyabb, követte a sasza szőlő, kevésbé hatékonynak bizonyult a fehér szőlő. *Bacillus subtilis*-nél az MBC érték minden mintánál nagyobb volt, mint 100 mg/ml, a MIC értékek

25-50 mg/ml-es koncentrációknál mutathatók. Az előző kísérletekhez hasonlóan itt is bebizonyosodik az, hogy a *Bacillus subtilis* kevésbé érzékeny ezekkel a hatóanyagokkal szemben.

A túlélési tesztek során a *Bacillus cereus* mikroba, különböző mintáknál tapasztalt MBC értéket alkalmaztam. Az eredmények szerint minden minta az első óra után az élő sejtszám egy nagyságrenddel csökkentette. A második órára ez a szám tovább csökkent, bár közel sem olyan mértékűt, mint az első óra után. A négy órás mérés után további egy nagyságrenddel csökkent a sejtszám. Összességében tehát az élő sejtszám a négy órás kezelés alatt két nagyságrenddel csökkent.

A növekedési gátlási tesztekben a hatóanyagok hatással voltak *Bacillus cereus* növekedésére. A kontrollhoz képest mindhárom minta összes sejtszáma kisebb volt. A görbék laposabbak lettek, a kezdeti gyors növekedés után, ami a magas cukortartalom következménye a hatóanyagok a növekedést kontrolálták.

Összefoglalva tehát a szőlőben fellelhető vegyületek alkalmazhatók mikrobák gátlására. Jól látható gátlási zónát eredményeznek agardiffúziós kísérletek során. A MIC, és az MBC értékük meghatározható. Túlélési tesztek során már 4 óra alatt két nagyságrenddel csökkentik az élő sejtszámot. Növekedésükre hatással vannak, a jellegzetes szaporodási görbét megváltoztatják, ennek megfelelően a görbék laposabbá váltak, a log fázisban a maximálisan elért sejtszámot csökkentik.

IRODALOMJEGYZÉK

- Antal D., Gârbán G., Gârbán Z. (2003): *The Anthocyanins: Biologically-Active Substances of Food and Pharmaceutic Interest* The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI- Food Technology, 2003
- Brown J., Guohui H., Haley-Zitlin V., Xiuping J. (2008): *Antibacterial Effects of Grape Extracts on Helicobacter pylori*; Applied and Environmental Microbiology, 75, 848–852
- Cowan M. M. (1999): *Plant Products as Antimicrobial Agents*, Clinical Microbiology Reviews, 564–582
- En-Qin X., Gui-Fang D., Ya-Jun G., Hua-Bin L. (2010): *Biological Activities of Polyphenols from Grapes*. International Journal of Molecular Sciences, 11, 622-646.
- Isohanni P., Alter T., Saris P., Lyhs U. (2010): *Wines as possible meat marinade ingredients possess antimicrobial potential against Campylobacter* Poultry Science 89, 2704–2710.
- Kevei F., Kucsera J. (2004): *Mikrobiológia I. egyetemi jegyzet* JATEPress kiadó
- Kim T.J., Weng W.L., Silva J.L., Jung Y.S, Marshall D. (2010): *Identification of Natural Antimicrobial Substances in Red Muscadine Juice against Cronobacter sakazakii* Journal Of Food Science, 75(3), 150-154
- Konowalchuk J., Speirs J., (1976): *Virus Inactivation By Grapes And Wines*. Applied And Environmental Microbiology, 32(6), 757-763.
- Konowalchuk J., Speirs J., (1978): *Antiviral Effect of Commercial Juices and Beverages* Applied And Environmental Microbiology, 35(6) 1219.
- Krisch Judit Dr. (2012): *Növényi hatóanyagok. Oktatási segédanyag.*
- Láng F.: *Növényélettan, Növényi anyagszervezés*, ELTE Eötvös Kiadó (2007)
- Papadopoulou C., Soulti K., Roussis I.(2005): *Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans*; Food Technol. Biotechnol. 43 (1) 41–46 .

Peng S.-C., C.-Y. Cheng C.-Y., F. Sheu F., Su C.-H. (2007): *The antimicrobial activity of heyneanol A extracted from the root of taiwanese wild grape* Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072 doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03766.x

Puupponen-Pimiä R. , Nohynek L., Alakomi H. , Oksman –Caldentey K. (2004): *Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens*, Appl Microbiol Biotechnol, 67, 8–18.

Rock C., Jacob R, Bowen P. (1996): *Update on the Biological Characteristics of the Antioxidant Micronutrients: Vitamin C, Vitamin E, and the Carotenoids* Journal of the American Dietetic Association, 96 (7), 693–702.

http://hu.wikipedia.org/wiki/Cabernet_sauvignon (2012.09.10.)

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Kunle%C3%A1ny> (2012.09.10.)

http://hu.wikipedia.org/wiki/Pedanosz_Dioszkorid%C3%A9sz (2012.09.28.)

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Saszla> (2012.09.10.)

<http://www.videkfejlesztés.net/oktatas/videkfejlesztési-tananyag/az-elelmiszer-es-az-üzlet/a-francia-paradoxon.html> (2012.09.24.)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen kutatási eredmények megjelenését „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával” című, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 azonosítószámú projekt támogatja. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.