



Élelmiszertudományi Kar

Sör- és Szeszipari Tanszék

SZÓJATEJ BIFIDOBAKTÉRIUMOKKAL TÖRTÉNŐ FERMENTÁLHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

TDK Dolgozat

DELI VIKTÓRIA

Élelmiszermérnök BSc. IV. évfolyam



Témavezetők: Rezessyné Dr. Szabó Judit egyetemi
docens

Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra
mb. főosztályvezető

TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

**Budapest
2012**

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1	A PROBIOTIKUM, VALAMINT A PREBIOTIKUM FOGALMA, ALKALMAZÁSA	4
2.1.1	<i>A probiotikum eredete</i>	4
2.1.2	<i>A probiotikum fogalma</i>	4
2.1.3	<i>A probiotikus baktériumok bélmikrobiotára gyakorolt hatása</i>	4
2.1.4	<i>A prebiotikumok fogalma</i>	5
2.2	TEJSAVAS FERMENTÁCIÓ JELENTŐS BAKTÉRIUMAI	6
2.2.1	<i>Bifidobaktériumok</i>	6
2.2.2	<i>Tejsavbaktériumok</i>	6
2.3	A SZÉNHYDRÁTOK SZEREPE A TÁPLÁLKOZÁSBAN	8
2.3.1	<i>A laktóz hatása a kalcium abszorpciójára</i>	9
2.3.2	<i>A laktóz-malabszorpció típusai</i>	9
2.3.2.1	A primer malabszorpció	9
2.3.2.2	A szekunder malabszorpció	10
2.3.2.3	Laktóz-malabszorpció - laktóz-intolerancia	11
2.3.3	<i>Színtenyészetekkel előállított tejtermékek szerepe az emésztésben</i>	11
2.4	A SZÓJABAB (GLYCINE MAX)	12
2.4.1	<i>A szója, mint növény</i>	12
2.4.2	<i>A szója beltartalmi jellemzői</i>	13
2.4.3	<i>A szója aminosav összetétele</i>	13
2.4.4	<i>A szójabab ásványi anyag és vitamin tartalma</i>	15
2.4.5	<i>A szójabab antinutritív anyagai</i>	16
2.5	SZÓJATEJ FERMENTÁCIÓ	17
2.6	A MIKROBIÁLIS NÖVEKEDÉS JELLEMZŐI	18
2.6.1	<i>A mikroorganizmusok növekedését, túlélését, pusztulását meghatározó tényezők</i>	18
2.6.2	<i>A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája</i>	18
2.6.3	<i>A növekedési görbe szakaszai, szaporodási fázisok és jellemzőik</i>	19
2.7	OPTIKAI HULLÁMVEZETŐ FÉNYMÓDUS SPEKTOSZKÓPIA	20
2.7.1	<i>A mérés elve</i>	20
2.7.2	<i>A mérőrendszer felépítése</i>	21
3	A MUNKA CÉLJA	23
4	ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	24
4.1	FELHASZNÁLT TÖRZSEK	24
4.2	ALKALMAZOTT TÁPKÖZEGEK ÉS OLDATOK	24
4.3	TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK	25
4.4	A FELHASZNÁLT SZÓJATEJ	25
4.5	A FERMENTÁCIÓ KIVITELEZÉSE	26
4.6	TÁROLÁSI KÍSÉRLET	26
4.7	VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	26
4.7.1	<i>Az élőcsíraszám meghatározása lemezöntéssel</i>	26
4.7.2	<i>A pH mérés</i>	27
4.7.3	<i>A savfok meghatározása</i>	27
4.7.3.1	A mérés elve	27
4.7.3.2	A mérés menete	27
4.7.4	<i>HPLC- nagynyomású folyadékkromatográfiás vizsgálat</i>	27
4.7.4.1	A meghatározás elve	27
4.7.4.2	A mérés menete	28
4.7.5	<i>Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia</i>	28
4.7.5.1	A méréshez felhasznált anyagok	28
4.7.5.2	A mérés menete	28

5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	30
5.1	A BIFIDOBAKTÉRIUM TÖRZSEK ERJESZTŐKÉPESSÉGÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA SZÓJATEJ SZUBSZTRÁTUMON.....	30
5.2	A SZÓJATEJ FERMENTÁCIÓ MEGVALÓSÍTÁSA	32
5.3	A TÁROLÁSI KÍSÉRLET EREDMÉNYEI	34
5.4	FERMENTÁLT SZÓJATEJ ELŐÁLLÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE, VALAMINT A BIFIDOBAKTÉRIUMOK ÉLETKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA HŰTVE TÁROLÁS SORÁN.....	35
5.5	OPTIKAI HULLÁMVezető FÉNYMÓDUS SPEKTROSKÓPIA VIZSGÁLAT	39
5.5.1	A vizsgálati minta elkészítése és jellemzése.....	39
5.5.2	Immunanalitikai bioszenzor készítése	40
5.5.3	A bioszenzor alkalmazhatósága baktériumok sejtszámának meghatározására	41
6	ÖSSZEFOGLALÁS	43
7	FELHASZNÁLT IRODALOM.....	45

1 BEVEZETÉS

A XXI. századi ember felgyorsult életvitele, valamint a környezetben fellelhető szennyező anyagok számos kedvezőtlen hatást gyakorolnak szervezetünkre. Egyre nagyobb mértékben jelentkeznek már fiatal korban is táplálkozással összefüggő betegségek, mint a laktóz intolerancia, tejfehérje allergia, valamint a laktóz csökkent mértékű hasznosulása. Vizsgálatok bebizonyították, hogy a fermentált tejkészítmények javítják a kalcium felszívódását. A fogyasztók is egyre nagyobb érdeklődést mutatnak a funkcionális élelmiszerekkel szemben. A fiziológiailag funkcionális élelmiszerek, amelyek azon felül, hogy tápanyaggal és energiával látják el a szervezetet bizonyítottan pozitív hatást gyakorolnak annak egy, vagy több funkciójára. Egy élelmiszer több módon is funkcionálissá tehető. Ezek között említhető az allegén eltávolítása, az élelmiszerben természetesen jelenlévő komponens koncentrációjának megnövelése a kívánt hatás elérése érdekében (pl. az vitaminnal dúsított termékek). Káros komponensek helyettesítése jótékony komponensekkel (pl. zsírok kiváltása inulinnal). Az élelmiszerek biofelhasználhatóságának növelése az antrinitív anyagok eltávolításával. Továbbá a funkcionális élelmiszerek közé sorolhatók a probiotikummal és/vagy prebiotikummal dúsított termékek. A probiotikumok élő mikroorganizmusok egyedi vagy kevert tenyészetek, melyek megfelelő mennyiségben alkalmazva jótékonyan hatnak a gazdaszervezet egészségi állapotára, közérzetére. Jelenleg a probiotikus termékek piacát a tejtermékek uralják. A fermentált tejtermékek biológiai értéke nem változik fermentáció során, sőt mi több a savanyított tejtermékekben található fehérjék allergén hatása sokkal kisebb, mint az eredeti nyers tejben. (Csapó, 2002) A laktóz intoleranciában szenvedő betegek egy részénél a normál tejhez viszonyítva kisebb mennyiségű tejcukor is kiváltja a betegségre jellemző kellemetlen tüneteket, ezért kerülnek e termékek fogyasztását, így táplálkozásukban nem érvényesülhet a savanyított tejkészítmények számos kedvező hatása.

Az emberi szervezet megfelelő működéséhez azonban elengedhetetlen a fehérjék fogyasztása. Számos táplálkozási célra is megfelelő növényi eredetű fehérjeforrás áll rendelkezésünkre, ezek közül is kiemelkednek a hüvelyes növények, különösen a szójabab, ugyanis fehérjetartalma, valamint aminosav- és vitamin tartalma nagyobb, mint a többi növényé. Legnagyobb előnye, hogy nem tartalmaz koleszterint, glutént és laktózt, így vegetáriánusok, laktóz intoleranciában és tejfehérje allergiában szenvedők, valamint glutén érzékenyek is egyaránt fogyaszthatják. Azért TDK kutatásaim tárgyául szójatej bifidobaktériumokkal történő fermentálhatóságának vizsgálatát választottam. Távlati célnak tekintettem egy olyan fermentált szójatermék kifejlesztését, melyet a laktóz intoleranciában és tejfehérje allergiában szenvedő betegek is fogyaszthatnak, valamint vizsgálni kívántam ezen terméken a tárolás során bekövetkező változásokat. Elsődlegesen a fermentációhoz alkalmazott mikroorganizmus életképességének megőrzésére vonatkozóan kívántam információt szerezni.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A probiotikum, valamint a prebiotikum fogalma, alkalmazása

2.1.1 A probiotikum eredete

A probiotikum fogalma, bár az utóbbi egy-két évtizedben vált népszerűvé, nem új keletű. A XIX. század végén figyelt fel először Ilja Mecsnyikov, a párizsi Pasteur Intézetben dolgozó orosz származású tudós arra, hogy a Kaukázusban és a Balkánon élő népek magas átlagos élettartama összefügg a rendszeres, nagy mennyiségű tejtermék fogyasztással. Megfigyeléseit azzal magyarázta, hogy a tejtermékek tejsavbaktériumai gátolják a káros rothasztó, toxintermelő baktériumok tevékenységét a bélben, csökkentve egyes betegségek kialakulásának kockázatát. Azóta ez a magyarázat az intenzív kutatások következtében kibővült és árnyaltabbá vált, de a Mecsnyikov által használt *probiotikum* („az életért”) elnevezés megmaradt.

2.1.2 A probiotikum fogalma

A probiotikumok tehát élő mikroorganizmusok egyedi vagy kevert tenyészetei, melyek megfelelő mennyiségben alkalmazva jótékonyan hatnak a gazdaszervezet egészségi állapotára, közérzetére. Az ismert probiotikus baktériumok többsége a tejsavbaktériumok (elsősorban *Lactobacillus* fajok) és a bifidobaktériumok közé tartozik. Probiotikumnak csak olyan egyedi törzsek tekinthetők, amelyek előnyös egészségügyi hatásait klinikai vizsgálatok is alátámasztják.

2.1.3 A probiotikus baktériumok bélmikrobiotára gyakorolt hatása

Az ember bélcsatornáját a gyomortól a vastagbélig komplex mikrobaközösség népesíti be. A bélmikrobiota egyénre jellemző, és már születés után elkezd formálódni. Összetételét és eloszlását a gazdaszervezet élettani jellemzői, a mikroorganizmusok tulajdonságai, a bélcsatorna és a mikrobák, illetve a mikrobák egymás közti kölcsönhatásai, valamint a környezeti faktorok egyaránt befolyásolják. Az élettani jellemzők közül fontosak például a bélben kiválasztott anyagok (enzimek, immunglobulinok) vagy a bélmozgás intenzitása. A mikrobiális jellemzők között a bélfalhoz való tapadás képessége, a tápanyag ellátottság változásaihoz való alkalmazkodóképesség, illetve a kitartó képletek képzésének képessége lehet fontos tényező. A különböző mikroorganizmusok között egymást segítő (szinergista) és egymást gátló (antagonista) kölcsönhatások egyaránt létrejöhetnek. A hasznos csoportba sorolt *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok például szerves savak és más, specifikus antimikrobiális vegyületek termelésével tudják visszaszorítani számos kórokozó baktérium szaporodását. Mint a fentiekből is látszik, a bélflóra egyensúlyát kölcsönhatások

szövevényes hálózata alakítja ki. Bár ez az egyensúly a felnőttekben stabil, egyes külső körülmények (fertőzések, gyógyszeres- főleg antibiotikus – kezelés, egyoldalú táplálkozás, ésszerűtlen fogyókúra) vagy belső változások (az öregedés, az immunrendszer meggyengülése, stresszes állapot, a bél nyálkahártya-gátjának sérülései) hatására felborulhat, és a káros mikroorganizmusok dominanciájának irányába tolódhat el. Ezek a mikrobák kellemetlen bélrendszeri tüneteket, megbetegedéseket okozhatnak. Általánosan elfogadott, hogy a bélmikrobiota egyensúlyának fenntartása és helyreállítása érdekében a hasznos mikrobák felé kell eltolni a bélflóra összetételét. Ez elősegíthető a *probiotikumok* és *prebiotikumok* fogyasztásával. A probiotikumokhoz, melyek elsősorban a *Lactobacillus*, *Streptococcus* és *Bifidobacterium* fajok közül kerülhetnek ki, probiotikus termékek vagy kapszulázott étrend-kiegészítők fogyasztásával lehet hozzájutni. Az 1. számú táblázat áttekintést ad a jelenleg forgalomban lévő probiotikumokról.

1. táblázat: Forgalomban lévő probiotikumok

Nemzetség	Fajok	Törzsek (példák)
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. johnsonii</i> La-1 <i>L. plantarum</i>	Referencia S85 DN-114001 ATCC334 YIT 9018 GG, ATCC53103 La-1 Lp299v, WCFS1
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	S85
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> <i>B. breve</i> <i>B. longum</i>	DN-173 010 NCIMB8807 NCC2705, DJ010A

<http://www.aleph.hu/~motesz/docs/2007-1-12.pdf>

2.1.4 A prebiotikumok fogalma

A prebiotikumok az emberi, illetve állati szervezet számára emészthetetlen élelmiszeralkotók, melyek azáltal hatnak a gazdaszervezetre, hogy szelektíven serkentik a bélben jelen lévő, jótékony mikrobák szaporodását és/vagy aktivitását. A probiotikumokat és prebiotikumokat egyaránt tartalmazó élelmiszerek a szinbiotikumok. (Szekér, 2006).

Minden probiotikus baktérium, amit élelmiszerekben vagy táplálék-kiegészítőkben használnak a *Lactobacillus*, *Enterococcus* vagy *Bifidobacterium* nemzetségbe sorolható. (Holzapfel *et al.*, 2001) Meg kell azonban jegyezni, hogy a *Lactobacillus* fajokat, melyek közé számos probiotikus törzs tartozik, elsődlegesen az erjesztéssel előállított (fermentált) élelmiszerek készítésére alkalmazzák. E

törzsek egy része nem alkalmas probiotikumnak, általában azért, mert gyorsan elpusztulnak a gyomor-bélrendszerben uralkodó kedvezőtlen viszonyok között, így nincs idejük jótékony hatásukat kifejteni. Ugyanakkor több, tejtermék eredetű *Lactobacillus* törzsről bizonyították, hogy probiotikus tulajdonságokkal rendelkeznek, amint azt Mecsnyikov korai megfigyelései igazolják. Fontos azonban tudni, hogy a baktériumoknak csak megfelelő mennyiségben elfogyasztva van esélyük, hogy a bélflóra komplex ökoszisztémájában kifejthessék probiotikus tulajdonságaikat. A javaslatok szerint ehhez legalább 10^7 - 10^8 élősejt/g koncentrációban kell lenniük. (Szekér, 2006).

2.2 Tejsavas fermentáció jelentős baktériumai

2.2.1 Bifidobaktériumok

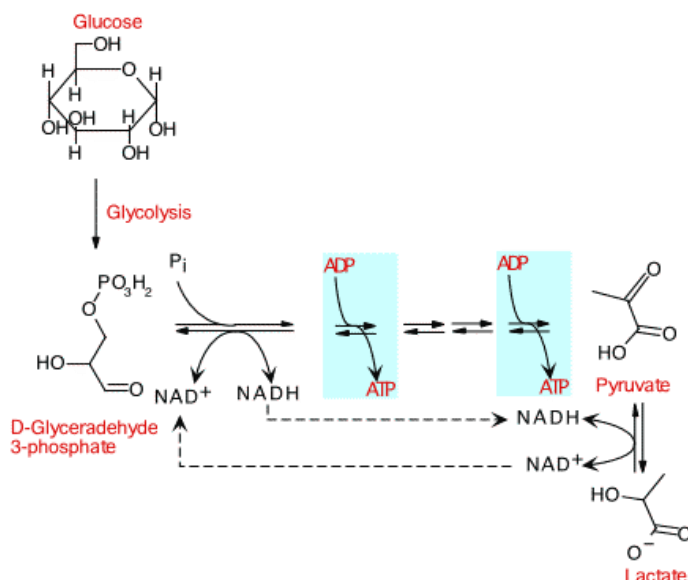
A bifidobaktériumokat Tissier izolálta és írta le először *Bacillus bifidus communis* néven 1909-ben. (Biavati *et al.*, 2000) A *Bifidobacterium* fajok Gram pozitív, nem spóráképző, nem mozgékony, kataláz negatív, változatos alakú (görbült, golfütő, vagy Y alakú pálcák) anaerob baktériumok. Cukorhasznosító mikroorganizmusok, melyek ecetsavat és tejsavat termelnek CO_2 fejlődése nélkül. A glükóz mellett az összes humán eredetű faj képes szénforrásként hasznosítani a galaktózt, a tejcukrot és a fruktózt is (Gomes & Malcata, 1999). A bifidobaktériumok fontos alkotórészei az emberek és állatok mikrobiotájának. Számos előnyös hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre, mint például az immunrendszer aktivitására, a koleszterinszint csökkentésére, a potenciális patogének növekedésének gátlására, melyek fertőzéseket okozhatnak a gazdaszervezetben. Ezáltal a *Bifidobaktériumok* alkalmazása számos tejtermékben, sajtokban és fagyasztott joghurtban egy új irányzattá vált. (Chou & Hou, 2000) Különösen terjedőben van a probiotikumként regisztrált bifidobaktériumok élelmiszerfeldolgozásba való bevonásuk.

2.2.2 Tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumok Gram-pozitív, oxidáz és kataláz negatív, pálcika vagy kokkusz alakú, nem spóráképző baktériumok, amelyek ellenállnak a savas körülményeknek. Jellemző anyagcsere folyamatuk a tejsavas erjedés és fontos szerepet játszanak az élelmiszerek erjesztési folyamataiban. A tejsavbaktériumok lebontó anyagcseréjük alapján homofermentatív vagy heterofermentatív csoportba sorolhatók. (Deák, 2000)

A glükóz homofermentatív erjesztése a glikolízis szerint történik, és a glikolízisben keletkező piruvát a laktát-dehidrogenáz enzim segítségével teljes mértékben tejsavvá redukálódik. Az 1. ábrán nyomon követhető a homofermentatív tejsavas erjedés útja.

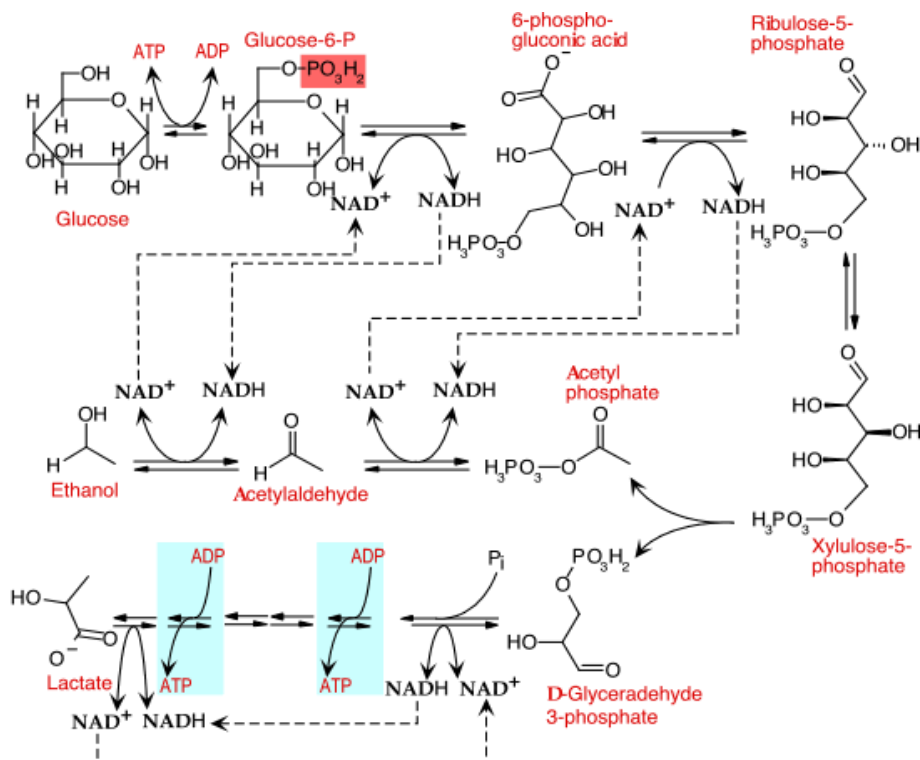




1. 1. ábra Homofermentatív tejsavas erjedés

<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C11/C11Links/www.bact.wisc.edu/microtextbook/metabolism/Fermentation.html>

A heterofermentatív erjedés első szakasza más módon zajlik, a pentózfoszfát utat követi. A sejtekből hiányzik az aldoláz, de a foszfoketoláz működik, ami a glükonsavból képződő pentózokat hasítja. Ezért a heterofermentatív erjedés mindig gázképződéssel (CO_2) jár. Végtermékei vegyesek, fajok szerint változó, tejsav, ecetsav, etanol különböző arányban. A 2. ábrán a heterofermentatív erjedés látható. (Deák, 2000)



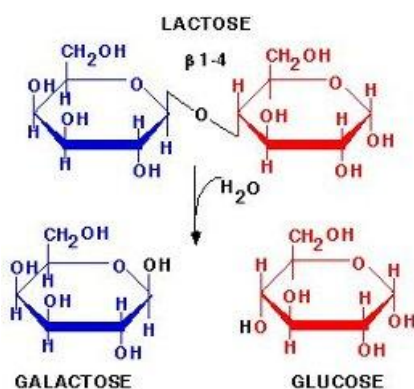
2. 2. ábra Heterofermentatív erjedés

<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C11/C11Links/www.bact.wisc.edu/microtextbook/metabolism/Fermentation.html>

Egyre több, probiotikus kultúrával előállított termék jut el a fogyasztók asztalára. Ezeknél érvényesül a tápcsatornában kolonizáló tejsavbaktériumok számos egészségvédő hatása, mint például antitumor aktivitásuk, antagonizmusuk a patogén bélbaktériumokkal, az immunrendszer erősítése, a koleszterin szintézis szabályozása. Sajnos a tejcukor érzékenyek kerülnek e termékek fogyasztását, mert a β -galaktozidáz enzim hiányában a laktóz nem bomlik le, ezért haspuffadás, gyorsult bélmozgás, hasmenés alakul ki. (Varga *et al.*, 2002).

2.3 A szénhidrátok szerepe a táplálkozásban

A szénhidrátok táplálékunk fő alkotórészei a fehérjék és zsírok mellett. Táplálékunk szénhidrátjait poliszacharidok, diszacharidok és monoszacharidok alkotják. A szénhidrátok energiaszükségletünk 50-60%-át fedezik, ami napi kb. 400 grammot jelent. Ebből 55% keményítő és megközelítőleg 35% szacharóz, 5% laktóz, 3% fruktóz és néhány százalék az emberi szervezet számára emészthetetlen szénhidrát, mint a cellulóz vagy a raffinóz. A szénhidrátok energiaszolgáltató szerepük mellett a szervezet működése szempontjából is fontos vegyületek, részt vesznek a glikoprotein és glikolipid felépítésében is. Különösen fontos szerepet játszik a laktóz, amely a szervezetben végbemenő hosszabb kémiai folyamat eredményeként számos szervünk, így például a bőr, az íny, a szívbillentyű részévé válik. Jelentős szerepet tölt be a csontosodásban, elősegíti a kalcium felszívódását. Az agyszövet felépítésében is részt vesz. A születést követő időszakban a laktóz jelenti a fő szénhidrátforrást-az anyatejben, a cukortartalom gyakorlatilag csak laktóz formájában van jelen, mint az újszülött kucstápláléka,- aránya táplálkozásunkban a felnőttkorig azonban 10%-ra csökken. A táplálékkal elfogyasztott laktózt a szervezet közvetlenül nem tudja hasznosítani, csak hidrolízise eredményeként keletkező monoszacharidok formájában szívódik fel. (3. ábra) A bontást a vékonybél nyálkahártyája által termelt enzim, a laktáz végzi, mely a laktóz β 1-4-es kötéseinek felbontásával a laktózt glükózra és galaktózra bontja, melyek a vékonybél nyálkahártyáján keresztül az érrendszerbe szívódnak fel.



3. ábra A laktóz hidrolízise

(http://ttk.pte.hu/biologia/genetika/bact_gen/bag05.htm)

A laktáz enzim sajátossága, hogy az összes diszacharidbontó enzim közül a legsérülékenyebb, és különböző patológiás hatásokra a legkönnyebben károsodik. Az előbbi sajátosságok miatt a laktóz felszívódási zavara a leggyakoribb malabszorpció. A laktóz-felszívódási zavar kronológiailag két csoportba osztható: az elsődleges (primer) és a másodlagos (szekunder) malabszorpcióra. (Barna, 1998).

2.3.1 A laktóz hatása a kalcium abszorpciójára

A kalcium abszorpciója számottevően megnő, ha a táplálék laktózt is tartalmaz. Ezt a hatást nem magának a laktóznak, hanem a tejsavnak tulajdonítják, amely a mikrobiális hatás következményeként jön létre az emésztő rendszerben, és ezért a savanyú tejtermékeknél nagyobb kalcium abszorpciót figyeltek meg. A megnövekedett kalciumabszorpció egyik magyarázata az, hogy a tejsav által létrehozott savas körülmények között a kalciumsók oldhatósága jobb, aminek hatására megnő a hasznosítható kalcium mennyisége. Hatással lehet a megnövekedett abszorpcióra az is, hogy a laktóz oldható komplexet képez a kalciummal, sőt mi több a laktóz még a kalcium transzportját is megkönnyíti. Egy állatkísérletben, amelyben az egyik állatcsoport takarmánya laktózt, a másiké pedig ugyanannyi glükózt tartalmazott, megállapították, hogy a laktózos diéta megnövelte a kalcium, a magnézium, a foszfor és más esszenciális nyomelemek abszorpcióját, ennek következtében csökkentette a kalciumhiány tüneteit, a csontváz kalcium veszteségét, valamint növelte a vér kalcium koncentrációját. A kalcium beépülése a csontokba sokkal gyorsabb volt, mivel nagyobb csonttömeg és jobb minőségű csontállomány volt elérhető. A laktóz a fentiek miatt optimális körülményeket biztosít a tej nagy kalciumtartalmának abszorpciójához.

A fermentált tejkészítmények még a laktóznál is jobban javítják a kalcium felszívódását, mivel a tejsav a kalciumot lehasítja a fehérjéről és ionos formában könnyebben szívódik fel, mint kötött formában. Kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a tejsav, a laktóz, a D-vitamin és a kalcium speciális kombinációja savanyított tejkészítményekben különösen optimális feltételeket teremt a kalcium felszívódására (Csapó, 2002).

2.3.2 A laktóz-malabszorpció típusai

2.3.2.1 A primer malabszorpció

Az elsődleges felszívódási zavar veleszületett típusa a ritka kórképek közé tartozik. Ebben az esetben a bélhámsejtekből már a születéskor hiányzik a laktáz. Gyakoribb a primer malabszorpció késői megjelenésű (felnőtt) típusa, melynek lényege, hogy a teljesen normális vékonybél-boholyszerkezetű és -hámsejtek mellett a tejcukorbontó enzim működése az egyén életkorának

előrehaladtával fokozatosan csökken, majd megszűnik. A tünetek általában nagyobb gyermekekben és felnőttekben jelentkeznek. Gyakoriságában a világ népei között nagy különbségek vannak, a skandináv népek 5-15 százalékos arányától a Japánban mért 89 százalékos arányig. Egyes etnikai csoportokban (indiánok, amerikai néger, eszkimók, ázsiaiak) a felnőtt lakosság 70-100 százaléka nem képes a laktóz megfelelő bontására (2. számú táblázat). Ezzel szemben az észak-európai lakosság, a németek, dánok, franciák, angolok esetében felnőttkorban is kielégítő marad a bélrendszer laktáz aktivitása. Több tényezőtől is függ, hogy hány éves korban szűnik meg a tejcukorbontás. Elsősorban a földrajzi helytől, az etnikai hovatartozástól és a szociális körülményektől. Legkorábban három éves kor körül, átlagosan azonban öt éves kor után kezdődik a laktáz aktivitásának csökkenése. Etnikai sajátosság, hogy például a Fülöp-szigeteken már a hároméves gyermekek 48 százalékában mutatható ki a laktózbontási zavar.

2. táblázat: A laktózmalabszorpció gyakorisága különböző országokban
(Bodánszky, 2003, nyomán)

Ország	Gyakoriság %
Észak-Amerika (fehér lakosság)	5-20%
Észak-Amerika (fekete lakosság)	70-75%
Észak-Amerika (indián lakosság)	66%
Dánia	3%
Afrika	50%
Afrika (Nigéria)	58-90%
Ázsia	55-95%
Eszkimó	88%
Izrael zsidó lakosság	61%
Izrael arab lakosság	81%
Mexikó	74%
Japán	90%
Átlag európai	15%

Magyarországon az általános iskolások (6-14 év) 6,2 százaléka, a serdülők és fiatal felnőttek (15-29 év) 6,62 százaléka és a felnőttek (30-49 év) 14,66 százaléka szenved laktóz intoleranciában. Ezen belül a nőknél magasabb előfordulási arány tapasztalható.

2.3.2.2 A szekunder malabszorpció

A másodlagos laktózfelszívódási zavar szerzett állapot. Átmeneti laktázhiány (hipolaktázia) szinte minden emberben előfordul élete folyamán bélfertőzés, hasmenések kapcsán. A háttérben ilyenkor a bélhámsejtek sérülése áll. A laktázelégtelenség a kiváltó ok megszűnését követően abbamarad. A

kiváltó okok a következők lehetnek: hasmenéses állapotok, tehéntejfehérje-allergia, bélférgek, krónikus gyulladásos bélbetegségek, immunhiányos állapotok, sebészeti beavatkozások, gyógyszerek.

2.3.2.3 Laktóz-malabszorpció - laktóz-intolerancia

A „felszívódási zavar” kifejezést általában összevontan használják mind az emésztés, mind a felszívódási mechanizmus károsodására. Felszívódási zavarról akkor beszélünk, ha az emésztett tápanyag valamilyen kóros elváltozás következtében nem kerül át a vékonybél hámsztrétegén keresztül a vér- vagy nyirokkeringésbe. A felszívódási zavart két csoportra osztjuk:

1. (Laktóz)-malabszorpció,
2. (Laktóz)-intolerancia.

Élettanilag mindkettő azt jelenti, hogy a laktóz valamilyen oknál fogva nem szívódik fel a vékonybélből, de tünettanilag megkülönböztetjük a két fogalmat.

Malabszorpcióról (felszívódási zavar) akkor beszélünk, ha a tejcukor felszívódása csökkent, vagy egyáltalán nem történik meg, ellenben nem jár kóros klinikai tünetekkel.

Intoleranciáról abban az esetben beszélhetünk, ha a tejcukor elfogyasztását követően kóros tünetek lépnek fel, úgy, mint hasfájás, hasgörcs, hányinger, esetleg hányás, hasmenés. Az állapot súlyosságától függ a tünetek nagysága, amely az enyhe émelygéstől a súlyos hányás-hasmenésig változhat. (Bodánszky, 2003)

2.3.3 Színtenyészetekkel előállított tejtermékek szerepe az emésztésben

A színtenyészetekkel készült termékek emészthetősége jobb, mint a kiindulási anyagoké. Ennek két oka van:

- Az első, hogy a tejsavbaktérium által termelt tejsav rendkívül finom csapadék formájában kicsapja a fehérjét. Az apró részecskék óriási felülete lehetőséget ad az emésztőenzimek számára a fehérje lehető legnagyobb felületen való megtámadására és gyors lebontására.
- A második ok, hogy az előállítás során a mikroorganizmusok a fehérje egy részét peptidekké és szabad aminosavakká bontják le, amit a fehérje előemésztésének is neveznek.

A fermentált tejtermékek biológiai értéke jelentősen nem változik fermentáció során, de a savanyított tejtermékekben a fehérje allergén hatása sokkal kisebb, mint az eredeti nyerstejben. Továbbá, a savanyított tejtermékekben a lipolitikus enzimek hatására a tejszír emészthetősége és abszorpciója jelentős mértékben megnő. A fehérje emészthetősége a joghurtban az anyatejhez

hasznosító, ezért a fermentációval készült tejtermékeket különösen értékesnek tartják csecsemők és gyermekek táplálásában, illetve hasonló előnyöket tapasztaltak idősebb embereknél is. (Csapó, 2002).

A laktóz intoleranciában szenvedő betegek egy részénél a joghurtokban, illetve kefirekben található, a normál tejhez viszonyítva kisebb mennyiségű tejcukor is kiváltja a betegségre jellemző kellemetlen tüneteket. Ezért kerülnek e termékek fogyasztását, s így táplálkozásukban nem érvényesülhet a savanyított tejkészítmények közöttük a probiotikumok számos kedvező táplálkozás-biológiai hatása. (Varga *et al.*, 2002).

2.4 A szójabab (*Glycine max*)

A világon számos élelmezési célra hasznosítható növényi eredetű fehérjeforrás áll rendelkezésünkre, de ezek közül is kiemelkednek a hüvelyes növények, különösen a szójabab, ugyanis fehérjetartalma, valamint biológiai értéke nagyobb, mint a többi növényé. A szója Délkelet-Ázsiából származik. Európába csak a 18. században jutott el, de csak a 20. században került a figyelem középpontjába fehérjetartalma miatt. A szójatermesztési kísérleteket a 19. század második felében kezdték el hazánkban Haberlandt Frigyes munkássága nyomán. Jelenleg a világ 71 országában, összesen közel 80 millió hektáron folyik szójatermesztés.

2.4.1 A szója, mint növény

A szójabab rendszertanilag a hüvelyesek (*Leguminosae*), a *Fabales* renden belül a *Papilionaceae* (pillangósvirágúak) családjába tartozik. Morfológiailag a babhoz hasonló egynyári, dudvás szárú növény. Szára a bokorbabéhoz hasonló, de annál merevebb. Fajtától függően 20-150 cm magasra nő. A leveleinek alakja igen változatos, rendszerint megnyúltabb vagy zömökebb tojásdad alakú. Éréskor a levelek – fajták szerint – lehullnak, vagy a száron maradnak. Virágjának színe lila, rózsaszín, fehér vagy ezek átmenetei. A szója öntermékenyülő növény. Termése kard vagy sarló alakú hüvely. A hüvelyekben 2-4 mag fejlődik. A mag lapítottan gömbölyded alakú, színe a fajtára jellemzően változó: sárga, citromsárga, zöld és barna, fekete, barnás-zöld, szürkés. A szója gyűjtőnév, kb. 500 fajtája létezik.

2.4.2 A szója beltartalmi jellemzői

A szójabab kiemelkedően értékes növény. Magja nagy fehérje- és olajtartalmú. A fehérje aminosav összetétele kiváló, ebből eredően biológiai értéke magas. A magban ugyanakkor viszonylag alacsony a szénhidrát mennyisége, melynek különös sajátága, hogy keményítőt nem tartalmaz. Igen jelentős a szacharóz tartalma, illetve a vízben, a szövetnedvben nem oldódó poliszacharidok mennyisége. A szénhidrátok aránya 14,7 és 18,3% között változik, ahogy azt a 3. számú táblázat mutatja. A szénhidrát 60%-a szacharóz, 4%-a raffinóz és 36%-a sztachióz. A szójababban viszonylag alacsony a rosttartalom, ebben kevés a cellulóz, a hemicellulóz, valamint a lignin aránya. Mindebből eredően a rost emészthetősége kedvezőnek mondható. (Balikó *et al.*, 2005)

3. táblázat: A szójabab fontosabb beltartalmi anyagai és azok mennyisége
(Balikó *et al.*, 2005)

Beltartalmi anyagok	Mennyiség (g/100g)
Víz	7,5-10,1
Nyersfehérje	36,8-41,0
Szénhidrátok	14,7-18,3
Szacharóz	3,3-9,9
Sztachióz	3,2
Raffinóz	1,1
Poliszacharidok	3,6
Olaj	18,0-22,0
Rost	3,9-5,3
Oldhatatlan maradék	8,0
Cellulóz	2,8-3,7
Hemicellulóz	1,0-2,3
Lignin	0,2

2.4.3 A szója aminosav összetétele

A szója értékét elsősorban a fehérjetartalom, valamint a fehérje aminosav-összetétele határozza meg. A szójafehérje közel 90%-ban jól oldódik vízben. Az albuminok és globulinok közül az utóbbiak részaránya nagyobb. A 4. számú táblázat bemutatja a szójabab aminosav-összetételét.

4. táblázat: A szójabab aminosav-összetétele
(Balikó *et al.*, 2005)

Aminosavak	Aminosavak a szárazanyag százalékában		g/16 g N
Lizin	2,21-2,40*	2,30**	5,7
Metionin	0,46-0,52	0,69	1,4
Cisztein	0,53-0,60	0,52	1,3
Treonin	1,42-1,63	1,73	4,1
Triptofán	0,47-0,52	0,48	1,5
Alanin		1,84	4,5
Arginin	2,54-2,81	2,69	6,2
Hisztidin	0,87-1,01	0,95	2,5
Leucin	2,36-2,85	2,88	7,2
Izoleucin	1,56-2,18	1,76	5,1
Fenilalanin	1,80-2,36	2,07	5,0
Valin	1,62-2,02	1,97	5,3
Glicin	1,52-2,00	1,74	4,3
Prolin		2,13	5,5
Aszparagin		5,20	
Szerin		1,67	
Tirozin		1,56	

* Hét külföldi intézmény szélső értékei

** ÁTK Takarmányozási Kutatóintézet Herceghalom vizsgálati átlagai

A jól választott, megfelelő mennyiségű és minőségű fehérjét tartalmazó táplálék az alapja az egészségmegőrző táplálkozásnak. A fehérjéket alkotó húsz aminosav közül nyolc esszenciális: a lizin, triptofán, fenilalanin, metionin, treonin, leucin, izoleucin, és a valin, melyeket a szervezet nem tud szintetizálni. Az esszenciális aminosavakat ezért táplálék útján kell a szervezetbe juttatnunk. A 6. számú táblázat tartalmazza a becsült napi aminosav szükségletet testtömeg kilogrammonként. (Barna *et al.*, 2000)

A szójabab fehérje tápláló tulajdonsága a növényi élelmiszerforrások közül a legkedvezőbb. Összehasonlítva a tehéntejjel, - ahogy azt az 5. számú táblázat is tartalmazza - az arginin és az aszparaginsav nagy mennyisége kiemelkedő.

5. táblázat: Aminosav tartalom (g/100 g fehérje)
(Bíró & Linder, 1998)

	Alanin	Arginin	Aszparaginsav	Fenilalanin	Glutamin	Hisztidin	Izoleucin	Leucin	Lizin	Metionin	Prolin	Szerin	Tirozin	Treonin	Valin
Anyatej	4,4	4,3	9,6	3,9	17,3	2,8	4,6	9,9	7,7	1,8	8,1	5,2	3,7	5,0	5,1
Tehéntej	3,4	3,2	7,5	5,2	21,8	2,6	4,6	9,3	7,6	2,4	8,9	5,6	4,6	4,3	5,6
Szója	4,2	7,2	11,7	4,9	18,7	2,5	4,5	7,8	6,4	1,3	5,5	5,1	3,1	3,9	4,8

6. táblázat: Aminosavak becsült napi szükséglete (mg/ttkg)
(Barna *et al.*, 2000)

Aminosav	Csecsemő (3-4 hónapos)	Iskolás gyermek (10-12 éves)	Felnőtt
Hisztidin	8	Nincs adat	Nincs adat
Izoleucin	70	28-30	10,0
Leucin	161	44-45	14,0
Lizin	103	44-60	12,0
Metionin	58	22-27	13,0
Fenilalanin	125	22-27	14,0
Treonin	87	28-35	7,0
Triptofán	17	3,3-4	3,5
Valin	93	25-33	10,0

2.4.4 A szójabab ásványi anyag és vitamin tartalma

A szójabab ásványi anyagokban és vitaminokban gazdag. Ásványi anyagok közül nagyobb mennyiségben magnéziumot, kalciumot, valamint foszfort tartalmaz, ahogy azt a 7. számú táblázat is mutatja. Vitaminok közül kiemelkedő a szójabab B- és E-vitamin-tartalma, de K-vitamin tartalma sem hagyható figyelmen kívül, melyet a 8. számú táblázatban emeltem ki.

7. táblázat: A szója ásványianyag-tartalma
(Balikó *et al.*, 2005)

Megnevezés	Szójabab
Kalcium	2,5 g /sza. kg
Foszfor	7,1 g /sza. kg
Vas	66,3 mg /sza. kg
Cink	37,0 mg /sza. kg
Jód	0,5 mg /sza. kg
Mangán	23,3 mg /sza. kg
Réz	7,7 mg /sza. kg
Kobalt	0,2 mg /sza. kg
Ólom	0,3 mg /sza. kg

8. táblázat: A szója vitamintartalma
(Balikó *et al.*, 2005)

Vitaminok	A teljes szójababban (mg/g)
Riboflavin	3,4-3,6
Niacin	21,4-23,0
Piridoxin	7,1-12,0
Biotin	0,8
Pantoténsav	13,0-21,5
Folsav	1,9
Inosit	2300
Kolin	3400
Karotin	0,18-2,43
E-vitamin	1,4
K-vitamin	1,9

2.4.5 A szójabab antinutritív anyagai

Évezredes gyakorlat volt a szójabab fogyasztás előtti áztatása majd főzése, ennek célszerűségét a jellegzetes bab íz megszüntetésével magyarázták, de még nem említették a szójában található antinutritív anyagokat, melyek kedvezőtlen hatásai e „kezelések” folyamán inaktiválódtak.

Antinutritív hatásúnak nevezzük azokat az anyagokat, melyek szemmel látható kóros tüneteket ugyan nem okoznak, de a táplálék tápanyagainak értékesülését rontják. A szójababban található antinutritív anyagokat a 9. számú táblázatban összegeztem. Az egyik legfontosabb antinutritív

anyag a szójababban a tripszin inhibitor (TI), mely a tripszin nevű enzim hatását gátolja, így csökkentve a fehérje emészthetőségét.

Az antinutritív anyagok inaktiválásának lehetősége rendkívül fontos. Szerencsére, ahogy a 9. számú táblázat mutatja, legnagyobb részben ezen anyagok hőérzékenyek. A hőkezelt (főzött, gőzölt) mag fehérjéje viszont jól hasznosul és kitűnő biológiai értékű. 20 %-os nedvességtartalom esetében 15 perces gőzöléssel, vagy 3-4 atmoszférás nyomáson 121°C-on a szójabab enzimgátlói néhány perc alatt denaturálódnak. (Balikó *et al.*, 2007.)

9. táblázat A szójabab antinutritív anyagai
(Balikó *et al.*, 2007)

Hőre érzékenyek	Hőnek ellenállók
Proteáz inhibitorok	Fitinsav
Tripszin inhibitor	Cseranyagok
Kimotripszin inhibitor	Favizmus faktorok, vicin, konvicin
Haemagglutininek, lektin	Ösztrogén, izoflavon származék
Golyvaképző faktorok	Flatulencia faktorok, oligoszacharidok
Antivitaminok	Szaponinok

2.5 Szójatej fermentáció

A szójatej termékek jótékony hatásuk következtében főként a modern étrenden alapulnak. A koleszterin, glutén és laktóz mentes szójatej egyaránt alkalmas élelmiszer a laktóz intoleranciában szenvedő vásárlóknak, vegetáriánusoknak és tejfehérjeallergiában szenvedőknek. A szójatej telítetlen zsírsavtartalma magas, tápláló összetevőin felül a szójababban lévő fitoösztrogének stimulálják a koleszterin szabaddá téételét azáltal, hogy csökkentik az LDL koleszterin receptorait, így növelve e receptorok aktivitását. A magas protein tartalmú szójatejben kisebb mennyiségű koleszterin van jelen, ha a szójabab fehérjét tehéntej fehérjével helyettesítjük. Sok vásárló tetszését azonban nem nyerte el az egyszerű szójatej íze. Ez az eltérő aroma lehet az egyik tényezője az alacsonyabb fogyasztásnak a nyugati étrendben. A szójatej íze javítható az üde, füves vagy szója íz csökkentésével tejsavas fermentáció során. E korlátok leküzdésére és egy probiotikus étrend kialakítása céljából tanulmányozták a szójatej fermentációját probiotikus kultúrák, tejsav- és bifidobaktériumok segítségével. (Wang *et al.*, 2004) A vizsgálatok kimutatták, hogy a szójatej támogatni tudja a *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079, a *Streptococcus thermophilus* CCRC 14085, a *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 valamint a *Bifidobacterium longum* B6 törzsek

növekedését. Mindemellett, meglehetősen nagy csökkenést figyeltek meg a fermentált szójatej sztachióz és raffinóz koncentrációjában vegyes kultúrák, tejsav- és bifidobaktériumok egyidejű alkalmazása esetén. Továbbá, megállapították, hogy a *Bifidobacterium infantis* jobban növekszik a szójatejben, mint a *Bifidobacterium longum*. A szójatej glükózzal, laktózzal, vagy galaktózzal való dúsítása serkentette a *Bifidobacterium infantis* és a *Bifidobacterium longum* növekedését a szójatejben.

2.6 A mikrobiális növekedés jellemzői

2.6.1 A mikroorganizmusok növekedését, túlélését, pusztulását meghatározó tényezők

Mint minden élő szervezet, a mikroorganizmusok is bizonyos környezeti feltételeket igényelnek a szaporodásukhoz. (Farkas, 1990) A szaporodás és a pusztulás a mikrobák létfontosságú élettani folyamatai, amelyeket a jellemző belső tulajdonságaik és a rájuk ható külső ökológiai tényezők határoznak meg. Ezek hatása együttesen, egymással kölcsönhatásban érvényesül. (Deák, 2006)

A mikroorganizmusok élettevékenységét és szaporodását számos tényező befolyásolja:

- Idő
- Közeg pH-ja
- Közeg tápanyagtartalma
- Vízáktivitás
- Hőmérséklet
- Oxigénigény

2.6.2 A mikroorganizmusok növekedésének kinetikája

A mikroorganizmusok szaporodását leíró általános egyenlet:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

ahol x : a mikrobaszám

t : inkubációs idő

μ : fajlagos szaporodási sebesség

Az (1) egyenletet integrálva a következő kifejezéshez jutunk.

$$\ln x = \mu t + C \quad (2)$$

A (2) egyenletbe a C konstans helyére bevezetve a beoltási sejtszámot (x_0) és kifejezve μ értékét a következő kifejezéshez jutunk:

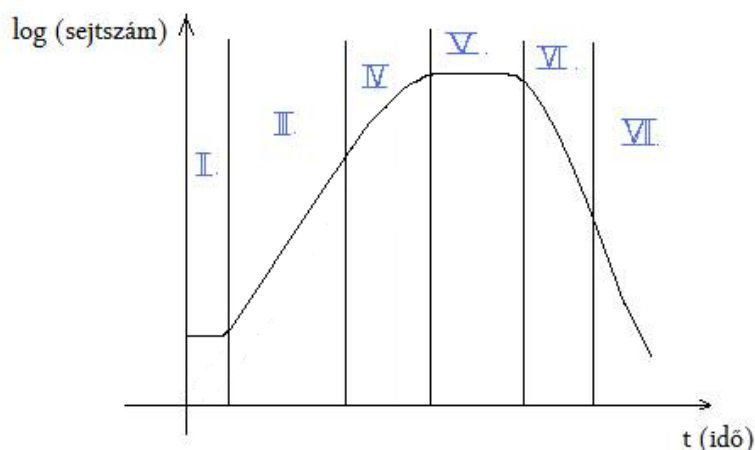
$$\mu = \frac{\ln[x/x_0]}{t} \quad (3)$$

A (3) összefüggésből a fajlagos szaporodási sebesség ismeretében a generációs idő meghatározható.

$$t_{\text{gen}} = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (4)$$

2.6.3 A növekedési görbe szakaszai, szaporodási fázisok és jellemzőik

A mikroorganizmusok populációinak szaporodási sebessége jellemző szakaszok szerint változik. Ezáltal a populáció sejtszámát az idő függvényében a szakaszokra tagolt szaporodási sebesség görbével ábrázolhatjuk. (Deák, 2006).



4. ábra Logaritmikus szaporodási görbe

I. fázis: Lappangási szakasz, melyben a sejtek száma változatlan marad. A sejtek alkalmazkodnak a környezeti feltételekhez.

II. fázis: Átmeneti gyorsuló szakasz, melyben kezdetét veszi a sejtek szaporodása, de még nem minden sejt képes a megkettőződésre.

III. fázis: Exponenciális szaporodás fázisa, melyben minden sejt osztódik a fajra és törzsre jellemző generációs idő alatt.

IV. fázis: Átmeneti lassulás fázisa, melyben a szaporodás lelassul, a szaporodó sejtek száma csökken.

V. fázis: Állandósult szakasz, melyben a szaporodás állandósul, szaporodó és pusztuló sejtek aránya 1:1.

VI. fázis: Hanyatlási szakasz, melyben több sejt pusztul, mint amennyi osztódik.

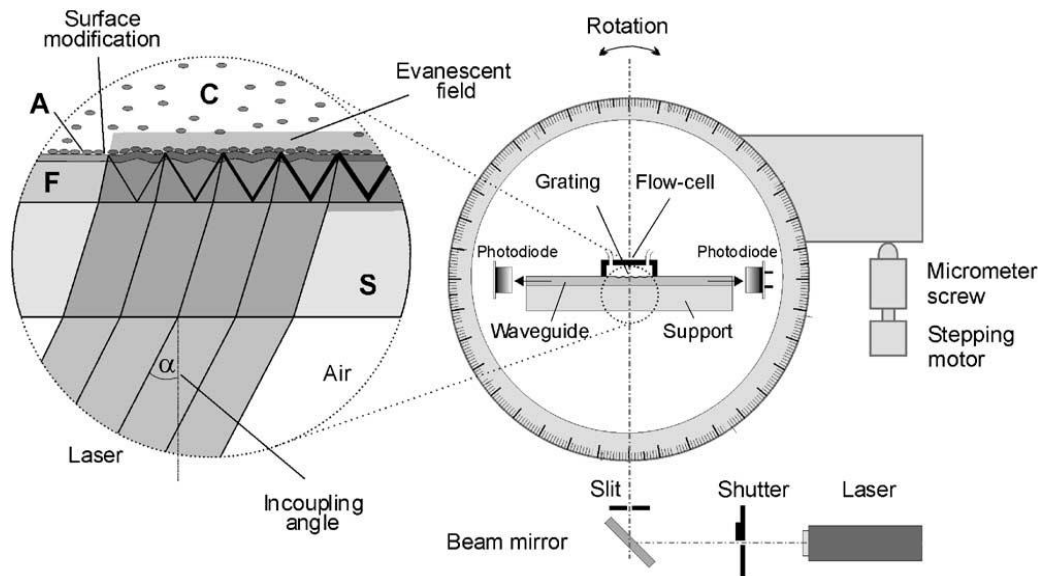
VII. fázis: Pusztulási szakasz, melyben exponenciálisan nő a pusztuló sejtek száma.

2.7 Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia

Mindenhol a világon ahová csak nézünk határfelületeket látunk, határokat két fázis között. A lényeges kémiai-fizikai reakciók ezeken a határfelületeken játszódnak le. A kutatók korábban homogén oldatban vizsgálták a reakciókat, az utóbbi időben azonban új kísérleti eredmények lehetővé tették, hogy pontosabb, kényelmesebb módszerekkel a reakciókat a határfelületeken vizsgálják. Ezek a módszerek a fény visszaverődésén alapulnak.

2.7.1 A mérés elve

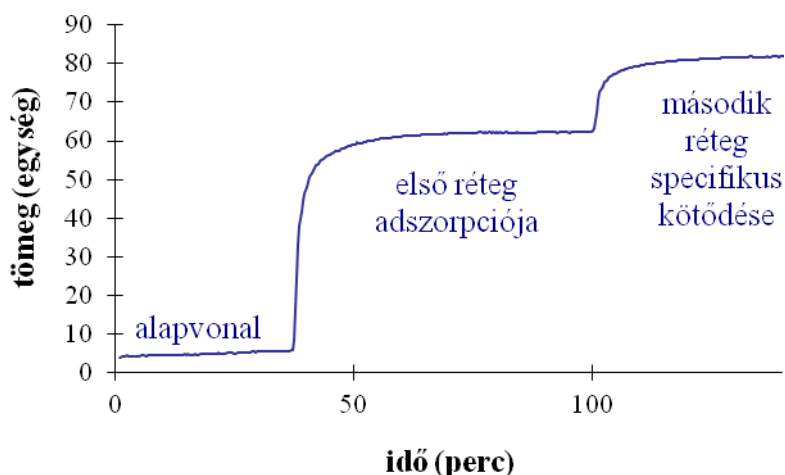
Az Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópia (OWLS) alapja egy integrált optikai hullámvezető szenzor, röviden chip, mely két, eltérő törésmutatójú rétegből (üveg szubsztrát $n \sim 1,5$ és hullámvezető réteg $n \sim 1,8$) áll. A vékony felső $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ hullámvezető rétegben finom optikai rács található. Az OWLS technika működési elvét az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra Az OWLS technika működési elve

A mérés során a lineárisan polarizált lézer fényt az optikai rács bevezeti a vékony $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ hullámvezető rétegbe. A becsatolt fény a hullámvezetőben teljes visszaverődés sorozatával terjed, intenzitását fotodiódákkal mérjük. A lézerfény beesési szögét adott szögtartományban változtatva az egyes chipekre jellemző intenzitás spektrumot kapunk, melyből nagy pontossággal meghatározható a becsatolási szögek értéke. A mért becsatolási szögekből számítható a hullámvezető felületén megkötődött anyag rétegvastagsága és a törésmutató értéke, valamint a vizsgált molekulák fajlagos sűrűségének ismeretében a megkötődött anyag egységnyi felületére eső tömege. A technika kimutatási határa néhány ng fehérje/cm^2 . (J. Vörös *et. al.*, 2002)

Mivel a biokémiai folyamatok vizes közegben játszódnak le a szenzort átfolyó küvetta segítségével rögzítjük a felületen, melynek térfogata 50 μl . A küvettában a hullámvezető szenzor felületén végbemenő reakciónak megfelelően a becsatolási szögek értéke időben változik, ezért az intenzitáspektrumokat folyamatosan mérve a kinetikai változások nyomon követhetők, ahogyan azt a 6. ábra szemlélteti.

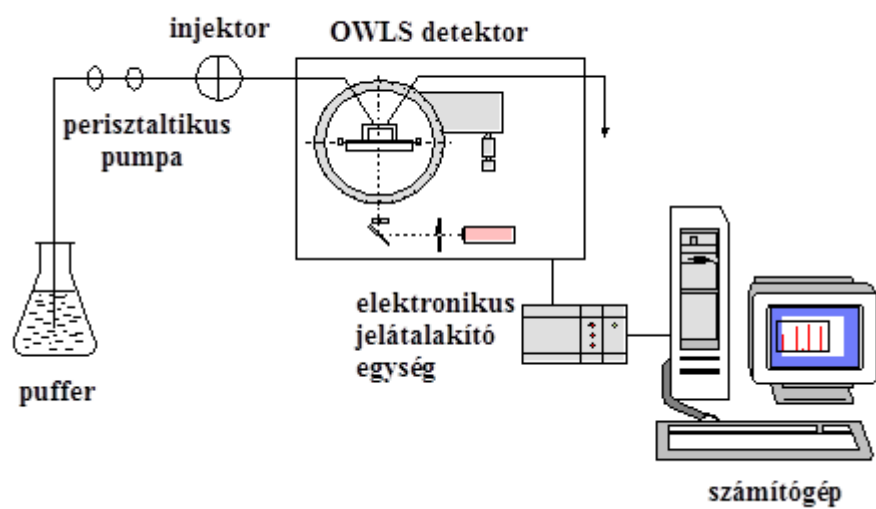


6. ábra A folyamatok időbeli nyomon követése

A módszer alkalmas többek között fehérjék felületi adszorpciójának vizsgálatára, kémiai szenzorként különböző gázok mérésére, állati sejtek növekedésének vizsgálatára, valamint immunszenzorként antigének/antitestek minőségi és mennyiségi meghatározására. Az integrált optikai hullámvezető szenzort bioszenzorként alkalmazva a mérendő anyagra (antigénre) specifikus molekulát (antitestet) rögzítenek, így a molekulák között lejátszódó erős kötődési reakció révén a mérni kívánt anyag a vizsgált oldatból meghatározható. Fontos, hogy a biomolekulákat minél erősebb kötőerőkkel, lehetőleg kovalens kötésekkel kapcsoljuk a szenzorfelülethez, úgy, hogy aktivitásukat megőrizzék.

2.7.2 A mérőrendszer felépítése

Az OWLS100 típusú műszert folyamatosan áramló injektációs (FIA) mérőrendszerben használjuk, ahol az állandó összetételű és pH-jú pufferoldat áramlását perisztaltikus pumpa biztosítja. A standard oldatokat és a mintákat szűrést és megfelelő hígítást követően injektor segítségével juttatjuk be a rendszerbe. Az antitestek kötődését a küvettában az OWLS detektor érzékeli. A mérőrendszer a 7. ábrán látható.



7. ábra Az OWLS mérőrendszer szerkezeti vázlata.

3 A MUNKA CÉLJA

TDK kutatásaim során célul tűztem ki bifidobaktériumokkal erjesztett szójatej előállítását, melyet laktóz intoleranciában és tejfehérje allergiában szenvedő betegek is fogyaszthatnak. A fermentáció lefolyásának értékelésére a haszon mikroorganizmusok szaporodásának, valamint a pH alakulásának követését terveztem. Az egyes fermentációk részletesebb vizsgálatára savfok és szerves sav, illetve szénhidrátok koncentrációjának változását is vizsgálni kívántam, valamint a termékek állományát szemrevételezéssel értékeltem. Az erjesztett termékek stabilitását a baktériumok túlélési képességének meghatározásával, illetve pH változás regisztrálásával szándékoztam követni.

Terveim között szerepelt egy olyan műszeres vizsgálati módszer adaptálása, amely alkalmas lehet a fermentáció folyamán, illetve a késztermékben a sejtszámok meghatározására. Erre a célra az Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópiát (OWLS) választottam. Továbbá összefüggést kívántam keresni a hagyományos, tenyésztéses élő mikrobaszám meghatározás és a műszeres mérési eredmények között.

A szójatej fermentációs és tárolási kísérleteket, valamint a *Bifidobacterium* törzsek vizsgálatát a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékének Fermentációs Laboratóriumában végeztem.

Az immunszenzoros vizsgálatok a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Élelmiszer-analitikai Osztályán történtek.

4 ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált törzsek

A törzsek		
jelölése	faji besorolása	eredete
A 4.8	<i>Bifidobacterium longum</i>	Sör- és Szeszipari Tanszék izolátuma (MAYER et al., 2003)
Bb-46	<i>Bifidobacterium longum</i>	Chr. Hansen starter kultúra
B01819	<i>Bifidobacterium longum</i>	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye
Bb-12	<i>Bifidobacterium lactis</i>	Chr. Hansen starter kultúra
B02020	<i>Bifidobacterium lactis</i>	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye
B9.1	<i>Bifidobacterium breve</i>	Sör- és Szeszipari Tanszék izolátuma (MAYER et al., 2003)

4.2 Alkalmazott tápközegek és oldatok

Beeren's agar

Glükóz	5 g
Cisztein-hidroklorid	0,5 g
Columbia agar	44 g
Agar-agar	5 g
Desztillált víz	1000 ml

Autoklávozás 121°C-on 15 percig, majd visszahűtjük 70°C-ra és 5 ml propionsavat adunk hozzá. A pH-t 5,0-re állítjuk.

TPY (Trypticase-Peptide-Yeast extract) leves

Trypticase pepton (BBL)	10 g
Phytone pepton	5 g
Glükóz	5 g
Élesztőkivonat	2,5 g
Tween 80	1 ml
Cisztein-HCL	0,5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgCl ₂ *6 H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂	0,15 g
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	0,03 g
Desztillált víz	1000 ml

pH=6,8

Autoklávozás 121°C-on 15 percig

Fiziológias sóoldat

NaCl	8,5 g
Desztillált víz	1000 ml

4,5 ml-enként kémcsövekbe töltve autoklávozzuk 121°C-on

4.3 Tenyésztési körülmények

A probiotikus baktériumok anaerob mikroorganizmusok, ezért szaporodásuk egyik alapfeltétele az oxigénmentes környezet. Ezt a Bugbox (8. ábra) anaerob munkahely biztosította. Ez a berendezés egyaránt alkalmas a Petri-csészékben lévő szilárd, valamint az inokulum készítéshez szükséges tápleves tenyészetek inkubálására. A készülékben a hőmérséklet és a páratartalom is szabályozható. Az oxigénmentes környezetet gázkeverékkel biztosítjuk. Az elegy N₂ gázban 10% CO₂ és 5% H₂ gázt tartalmaz. A hidrogéngáz szerepe az, hogy a maradék oxigénnel reakcióba lépve a palládium katalizátor jelenlétében vizet képezzen. A boxban szabad kézzel lehet dolgozni. A bifidobaktériumok optimális szaporodási hőmérsékleti tartománya: 37-41°C. Ennek megfelelően a tenyésztést 37°C-on végeztem.



8. ábra Anaerob munkahely (Bugbox)

4.4 A felhasznált szójatej

Élelmiszerüzletekben könnyen beszerezhető, hőkezelt, natúr szójatejet vásároltam, mely GMO mentes szójából, kalcium, B₂, B₁₂ valamint D vitamin hozzáadásával készült. Nem tartalmaz tartósítószer, mesterséges színezéket és aromát.

Az általam alkalmazott *Alpro Soya ital összetétele*:

Víz, hántolt szójabab, nyers nádcukor, trikálcium foszfát, savanyúságot szabályozó anyag (monokálium-dihidrogén-foszfát), tengeri só, aroma, stabilizátor (gellángumi) vitaminok (riboflavin, B₁₂, D₂).

4.5 A fermentáció kivitelezése

A törzsfenntartás TPY levesen 2 naponta folyamatos passzálással történt. Az alkalmazott *Bifidobacterium* törzsek 24 órás tenyészetével a kísérleti tervnek megfelelő mennyiségű szójatejet oltottam be. A fermentációt 10 tf%-nyi inokulum tenyészettel indítottam, majd 37°C-on 8 órán keresztül inkubáltam. A 0. a 4. illetve a 8. órában mértem a minták pH értékét, tizedelő hígítási sort készítettem, majd a 10⁴, 10⁵ és a 10⁶-os hígításból lemezöntéssel az élőcsíraszám meghatározásához párhuzamos mintákat oltottam le.

4.6 Tárolási kísérlet

A tárolási kísérletet 4°C-on 8 héten keresztül végeztem. Kiindulásként a 8 órás fermentált termékek adatai szolgáltak. Hetente vizsgáltam a minták élőcsíraszámának és pH-jának alakulását.

4.7 Vizsgálati módszerek

4.7.1 Az élőcsíraszám meghatározása lemezöntéssel

A fermentált termékben lévő *Bifidobacterium* törzsek sejtszámát telepszámlálással módszerrel határoztam meg.

Táptalajok előkészítése:

Első lépésben felolvasztottam az elkészített és autoklávozott szilárd Beeren's táptalajokat, majd felhasználásig 50°C-os vízfürdőben tároltam őket. Lemezöntés előtt megfelelő mennyiségű NaOH-ot és propionsavat adagoltam hozzájuk.

Hígítási sor készítése:

A mintát homogenizáltam és tizedelő hígítási sort készítettem 10⁶ fokozatig.

Leoltás lemezöntéssel

A hígítási sor megfelelő tagjaiból 0,1 ml-t steril Petri-csészékbe adagoltam, majd kb. 15 ml-t öntöttem rá a táptalajokból. A Petri-csészék körkörös mozgatásával elkevertem az inokulumot a táptalajjal. Dermedés után a Petri-csészéket megfordítottam és bugboxban 37°C-on inkubáltam.

A termosztálási idő után megszámloltam a kifejlődött telepeket, és az eredményeket a minta 1 ml-ére vonatkoztatva számítottam.

4.7.2 A pH mérés

A pH meghatározását Mettler Toledo típusú készüléken, kombinált üvegelektrod segítségével végeztem. A készüléket két standard segítségével kalibráltam.

4.7.3 A savfok meghatározása

4.7.3.1 A mérés elve

A fermentálás során keletkezett sav mennyiségéből következtethetünk a *Bifidobacteriumok* elszaporodására, ezáltal a termék minőségére. A Soxhlet–Henkel féle savfok (SH^0) meghatározási módszer lényege, hogy az összes lúgmegkötő anyagot megtitraljuk fenolftalein indikátor jelenlétében 0,1 n NaOH-t használva.

4.7.3.2 A mérés menete

A savfok meghatározásához a fermentáció folyamán a 0. 4. és 8. órában is 20 ml mintát vettem a szójatejből, majd fenolftalein indikátor jelenlétében 0,1n-os NaOH-dal halvány rózsaszín színig titráltam. A savfok a leolvasott fogyás értékekből képlet segítségével számoltam.

4.7.4 HPLC- nagynyomású folyadékkromatográfiás vizsgálat

4.7.4.1 A meghatározás elve

A kromatográfiás technikák alkalmazásával hasonló fizikai-kémiai tulajdonságú vegyületek elválasztását tudjuk megoldani. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztás alapja, hogy a különböző fizikai-kémiai tulajdonságú minta komponensek megoszlása a mozgó és állófázis között eltérő. Az álló fázis (oszlop-töltet) felett nyomáskülönbség hatására kényszeráramlást hozunk létre. Minden egyes vizsgált komponens, ha a mozgó fázisba (eluens) kerül, akkor azzal azonos sebességgel halad. Az eltérő sebesség különbség tehát abból adódik, hogy az egyes komponensek mennyi időt töltenek az állófázison. Ahhoz, hogy a minta komponensek az állófázisra jussanak, egy adszorpciós lépés tartozik, vagyis a minta komponens megkötődik az állófázison. A mozgó fázisba történő kijutáshoz egy deszorpciós lépés kell, tehát a minta komponens leszakad az állófázisról és visszakerül a mozgófázisba. A mintának mindig jól kell oldódnia a mozgófázisban. A folyadékkromatográfiában nincs az illékonyságból vagy hőstabilitási problémából adódó korlátozás, ezért ideális módszer a biokémiai szempontból érdekes makromolekulák és bomlékony természetes eredetű anyagok, mint a fehérjék, a poliszacharidok, a nukleinsavak, az aminosavak, a szteroidok, az antioxidánsok és a felületaktív anyagok meghatározására.

4.7.4.2 A mérés menete

A 8 órás fermentáció során a 0. 4. és 8. órában mintát vettem a fermentátumból. A minta 1 grammjához 1ml 0,5n-os H_2SO_4 -et adagoltam, majd megfelelő idő elteltével a mintákat lecentrifugáltam. A centrifugálás 14000 fordulat/perc sebességgel 10 percen keresztül zajlott. A mérések Thermo Scientific Corporation cég által gyártott Surveyor típusú HPLC berendezéssel történtek a következő paraméterekkel:

Oszlop:	Aminex 87H
Eluens:	0,005 M H_2SO_4
Áramlási sebesség:	0,6 ml/perc
Eluálási mód:	izokratikus
Detektorok:	RI; PDA
Integráló szoftver:	ChromQuest

4.7.5 Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia

Az OWLS technika segítségével lehetőségem nyílt a telepszámlálásos módszerrel mért adatok és a műszeres vizsgálatok eredményeinek összevetésére. Az analízishez OWLS 100 típusú integrált hullámvezető szenzort használtam. A készülék bioszenzorként való alkalmazása antigének, illetve antitestek minőségi és mennyiségi meghatározását teszi lehetővé. A vizsgálat során a mérendő anyagra - jelen esetben a *Bifodobacterium longum* B01819 törzs antitest – specifikus molekulát rögzítünk, így a molekulák között lejátszódó erős kötődési reakció révén a mérni kívánt anyag a vizsgált oldatból meghatározható.

4.7.5.1 A méréshez felhasznált anyagok

- 2,5 %-os glutáraldehid
- 0,05 mM sósav
- 2000 x-es hígítású antitest
- 1000 x-es hígítású szójatej
- puffer

4.7.5.2 A mérés menete

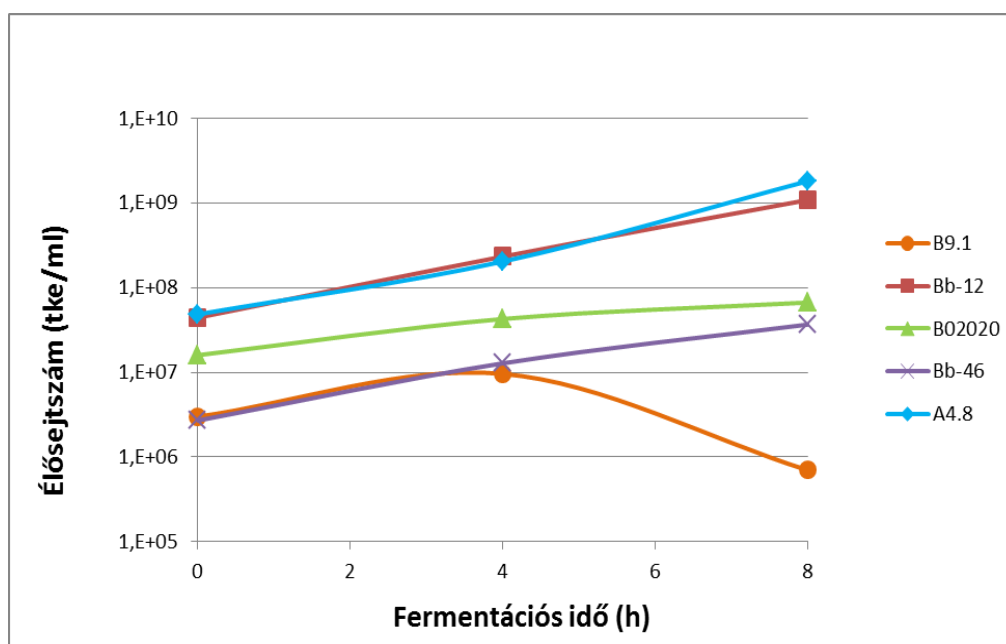
A mérés során az amino csoportokat hordozó szenzor felületén az antitest molekulákat kovalensen rögzítjük a 2,5%-os glutáraldehiddel.

Első lépésben az alapvonalat desztillált vízzel felvesszük, majd ezt követi az amino csoportok aktiválása glutáraldehid injektálásával. A feleslegben lévő glutáraldehidet pufferral lemosuk., majd miután a pufferes mosását követően a rendszer stabilizálódott 200 µl 2000* hígított antitestet injektáltunk. A felületen meg nem kötődött molekulák lemosására 0,05 M-os sósavat alkalmazunk. Ezt követően a felület alkalmassá válik a szójatej minták mérésére. A felületet minden mérési ciklus után 0,05 M sósavval regeneráljuk.

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 A bifidobaktérium törzsek erjesztőképességének összehasonlítása szójatej szubsztrátumon

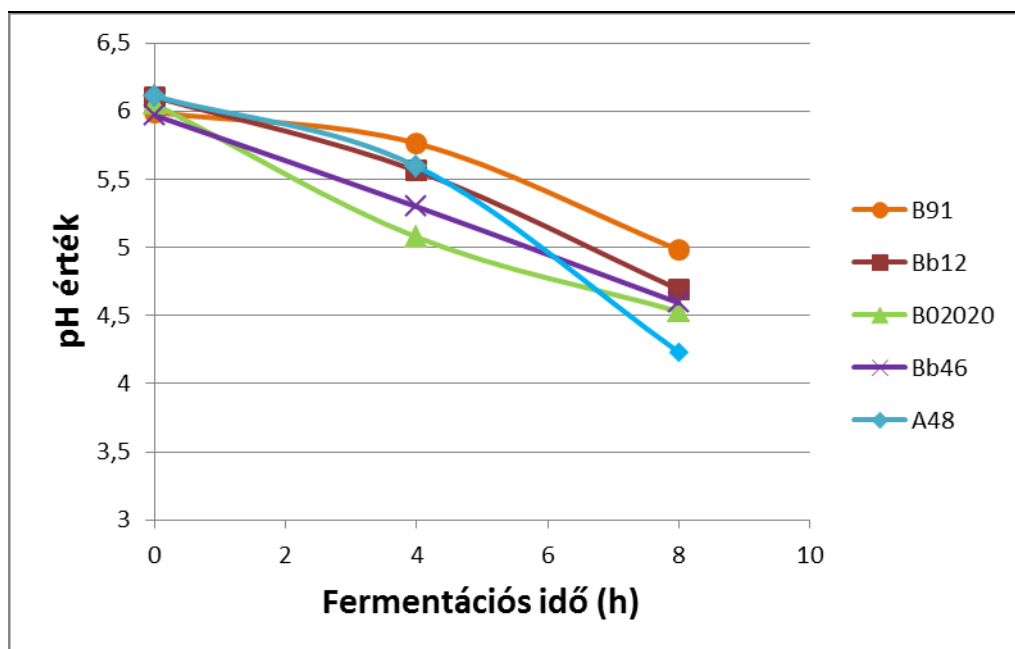
Kereskedelmi forgalomban kapható szójatejet erjesztettem különböző *Bifidobacterium* törzsek 24 órás tenyésztével. Az egyes fermentációkat 60 ml-es térfogatban 37°C-on anaerob körülmények között valósítottam meg. Vizsgáltam a fermentált termékek állagát, pH-ját, valamint élő csíraszámát. A fajlagos szaporodási sebességek függvényében választottam ki azokat a törzseket, melyeket alkalmasnak ítéltam a szójatej fermentálására. A vizsgálatokba két *Bifidobacterium lactis*, két *Bifidobacterium longum* és egy *Bifidobacterium breve* törzset vontam be. Ezek közül kettő kereskedelmi forgalomban kapható, élelmiszerek előállításában alkalmazott, széleskörűen tanulmányozott probiotikum. A fermentációk lefolyásának jellemzésére az élő csíraszám alakulása (9. ábra) és a pH lefutási görbék (10. ábra) szolgálnak.



9. ábra A vizsgált törzsek szaporodó képessége szójatej szubsztrátumon

Az 9. ábrán szereplő diagramon jól látható, hogy a szójatej fermentációk 10^6 és 10^7 nagyságrendű bifidobaktérium számmal indultak. A jelentős eltérés egyik magyarázata az lehet, hogy a vizsgálati technika segítségével nem az egyedi sejtek számát tudjuk kimutatni, hanem telepképző egységet határozunk meg. Egy telep összezsapódott sejtéből is származhat, az így a kapott eredmények hibával terheltek. A 8 órás fermentáció végére a *B. longum* (A4.8) és a *B. lactis* (Bb-12) erőteljes növekedést mutatott, 10^9 -es sejtszámot produkáltak, ami közel két nagyságrend növekedést jelent. A *B. lactis* (B02020) a kezdeti növekedést követően stagnált, míg a *B. longum* (Bb-46) gyengébben,

de exponenciálisan nőtt. Egyértelműen kimutatható volt azonban, hogy a *B. breve* (B9.1) szaporodása számára a szójatej nem biztosít megfelelő közeget, a fermentáció során szaporodása egy nagyságrenden belül maradt. További problémaként jelentkezett, hogy a sejtek életképessége is csökkent mértékű volt, így a fermentáció második felére az élő sejszáma a kiindulási érték alá csökkent.



10. ábra A pH értékek alakulása az első fermentáció során

Megvizsgálva a *Bifidobacterium* törzsek pH értékeinek alakulását elmondható, hogy a fermentált szójatej minták pH értéke nem csökken pH 4 alá, ezáltal egy nem túl savanyú terméket kapunk, ami mind fogyasztási szempontok, mind élelmiszerbiztonság tekintetében kielégítő. Megfigyelhető, hogy a legmagasabb savtermeléssel a legnagyobb mértékű növekedést mutató *B. longum* (A4.8) törzs rendelkezett, míg a *B. breve* (B9.1) pH-ja csupán pH 5 körüli értékre csökkent. A többi három törzs esetében megközelítőleg azonos mértékű savanyodást figyeltem meg, a 8 órás fermentáció során pH megközelítette a 4,5-es értéket.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a *B. breve* B9.1 törzs számára a szójatej szubsztrátum nem volt megfelelő, nagyon savérzékenynek bizonyult. Így a további kísérleteket a két *B. longum*, valamint a két *B. lactis* törzsszel folytattam. E törzsek szaporodási tulajdonságainak jellemzésére becsültem fajlagos szaporodási sebességeket, illetve az ebből származtatható generációs időket (10. táblázat) az adott fermentációs körülmények között. A számításokat a fermentáció teljes ciklusára vonatkozóan végeztem el, mivel olyan nagy inokulum mennyiséggel indítottam az inkubációt, hogy a lag szaporodási szakasz nem volt megfigyelhető.

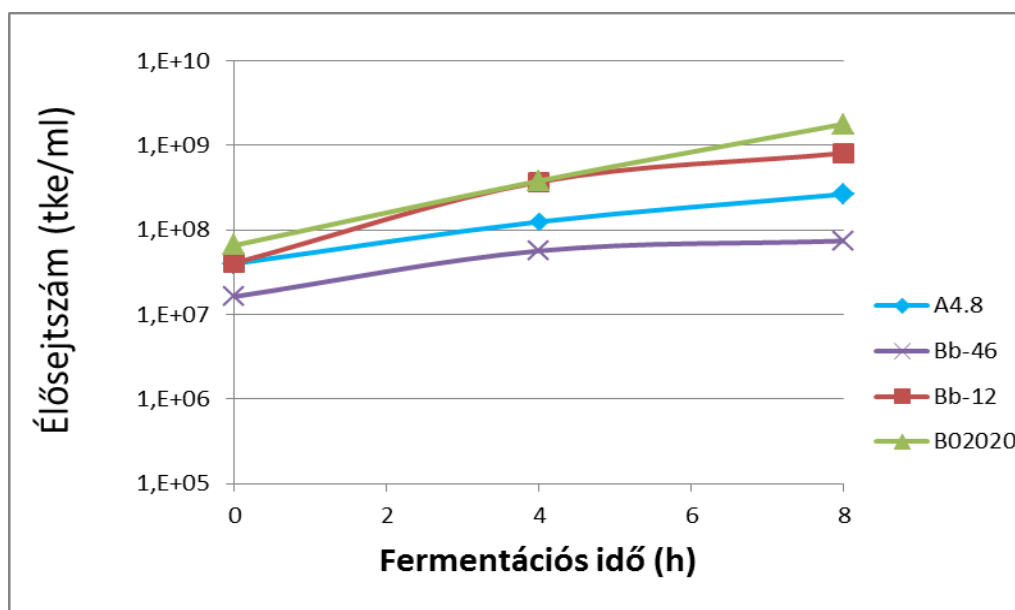
10. táblázat A szójatej fermentálására alkalmas törzsek szaporodási paramétere

JELLEMZŐ PARAMÉTER	Bifidobaktérium törzsek			
	<i>B. lactis</i>		<i>B. longum</i>	
	B02020	Bb-12	A4.8	Bb-46
Fajlagos szaporodási sebesség μ [1/óra]	0,18	0,40	0,45	0,33
Generációs idő [óra]	2,41	1,61	1,49	1,81
Sejtszaporulat	$3,05 \cdot 10^9$	$6,23 \cdot 10^{10}$	$1,06 \cdot 10^{11}$	$2,04 \cdot 10^9$

A 10. táblázat adataiból kiolvasható az is, hogy a szaporodási tulajdonságok nem faji sajátágnak tekinthetők, hanem sokkal inkább törzsfüggő jellemzők.

5.2 A szójatej fermentáció megvalósítása

A szójatej fermentációhoz kiválasztott négy törzssel erjesztési kísérleteket végeztem 200 ml-es térfogatban. Ezáltal információt nyerhettem az egyes törzsek viselkedésére vonatkozóan a léptéknövelés során.



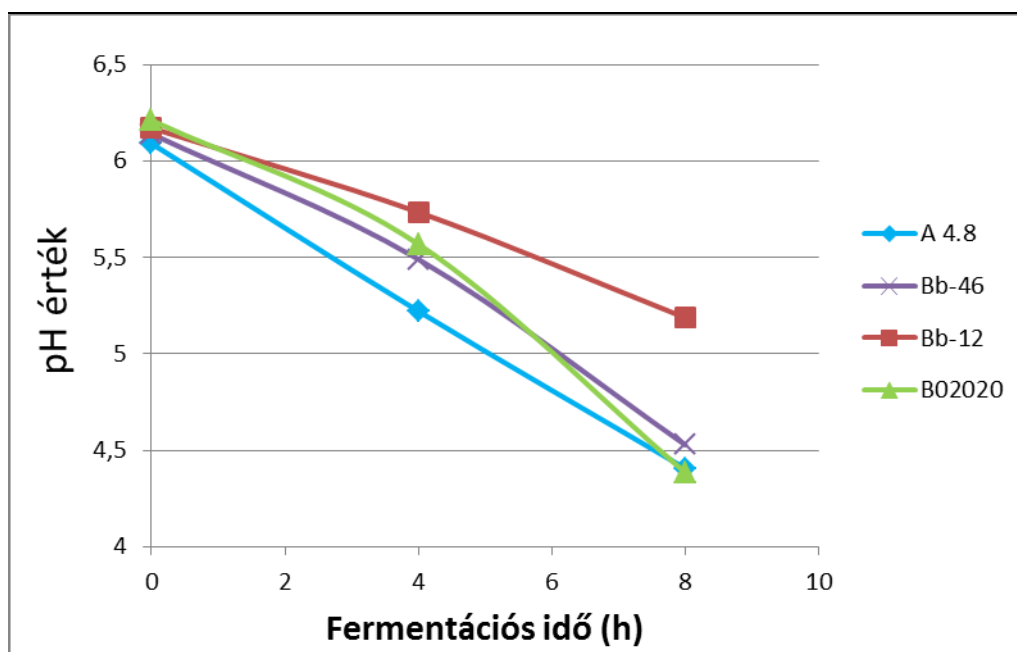
11. ábra A léptéknöveléssel megvalósított fermentációk szaporodási görbéi

A 11. ábrán látható diagram adataiból is kiolvasható, hogy az indulási sejtszámok 10^7 nagyságrendben voltak. A léptéknövelés eredményeképpen megfigyelhető, hogy az első fermentációhoz képest változás történt a legjobban növekvő törzsek között, ugyanis míg korábban a *B. longum* (A4.8) mutatta a legnagyobb növekedést, addig jelen esetben két *B. lactis* törzs szaporodott erőteljesebben. A korábbi fermentációhoz hasonlóan a *B. longum* (Bb-46) kevésbé nőtt és egy idő után stagnált.

A sejtszaporulat tekintetében a következő eredményekre jutottam:

- Az első fermentáció alatt a bifidobaktériumok növekedése az alábbi sorrendet mutatta:
 - A4.8, Bb-12, B02020, Bb-46,
- A nagyobb térfogatban megvalósított fermentációnál ez a sorrend a következőképpen módosult:
 - B02020, Bb-12, A4.8, Bb-46

Megvizsgálva a minták pH értékét, melyet a 12. ábra szemléltet, megállapítható, hogy növekedése ellenére a *B. lactis* esetében észleltem a legkisebb pH csökkenést. Kiemelendő azonban, hogy a legmagasabb savtermeléssel változatlanul két törzs a *B. longum* (A4.8) valamint a *B. lactis* (B02020) rendelkezett. Ebből arra következtettem, hogy az utóbbi két törzs meglehetősen jól növekedik a szójatejben, szaporodásuk számára a szójatej megfelelő tápközegeként szolgál.

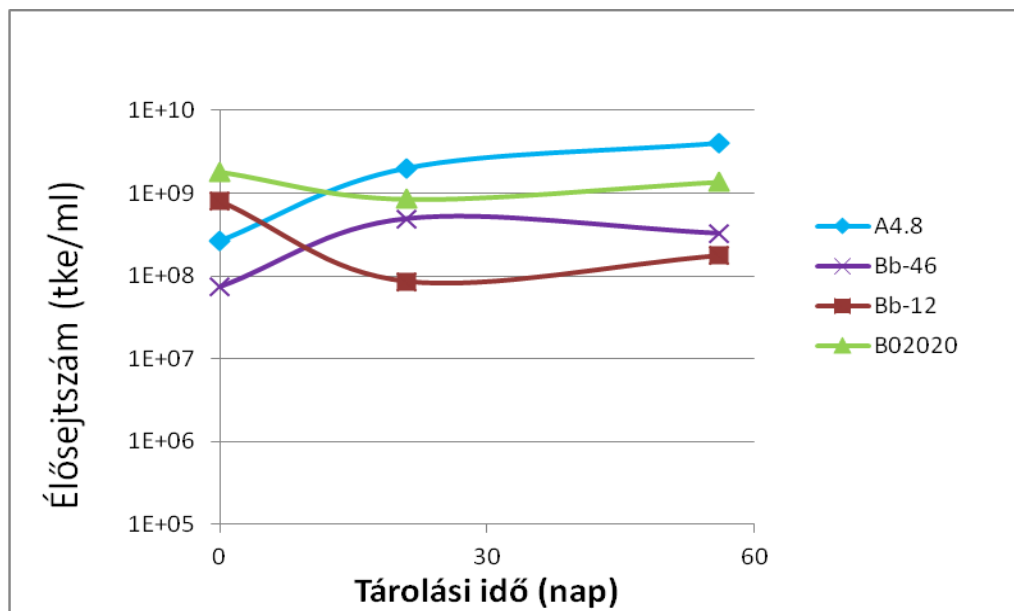


12. ábra A vizsgált törzsek által előidézett pH változás fermentáció során

5.3 A tárolási kísérlet eredményei

A fermentáció eredményeként kapott joghurt-típusú termékben 4°C-on, 8 hetes időtartamig vizsgáltam a bifidobaktériumok túlélési képességét. Ennek megítélésére rendszeresen meghatároztam az élősejtszámokat, valamint követtem a pH alakulását. A 13. ábrán látható, hogy a korábban kiemelt két törzs a *B. longum* (A4.8) valamint a *B. lactis* (B02020) a tárolás során is erőteljes növekedést mutatott. A *B. longum* (Bb-46) a kezdeti szaporodást követően kismértékben csökkent, míg a *B. lactis* (Bb-12) esetében nagyobb mértékű csökkenés volt megfigyelhető. A tárolási kísérlet bebizonyította, hogy a szójatej optimális feltételeket teremt bizonyos *Bifidobacterium* törzsek szaporodásához, melyek 4°C-os tárolás során is megőrzik életképességüket. Megállapítható, hogy mind a négy vizsgált törzs messzemenően kielégíti mind az előflórás mind a probiotikus termékekre vonatkozó követelményeket, amelyekben rendre a szavatossági időszak végén minimálisan 10^7 , illetve 10^6 élősejtnak kell jelen lennie grammonként. Az általam előállított fermentumokban a tárolás időszak végén a két probiotikumként regisztrált törzs élősejtszáma 10^8 grammonként. A másik két laboratóriumi törzs élősejtszáma 10^9 nagyságrendben volt.

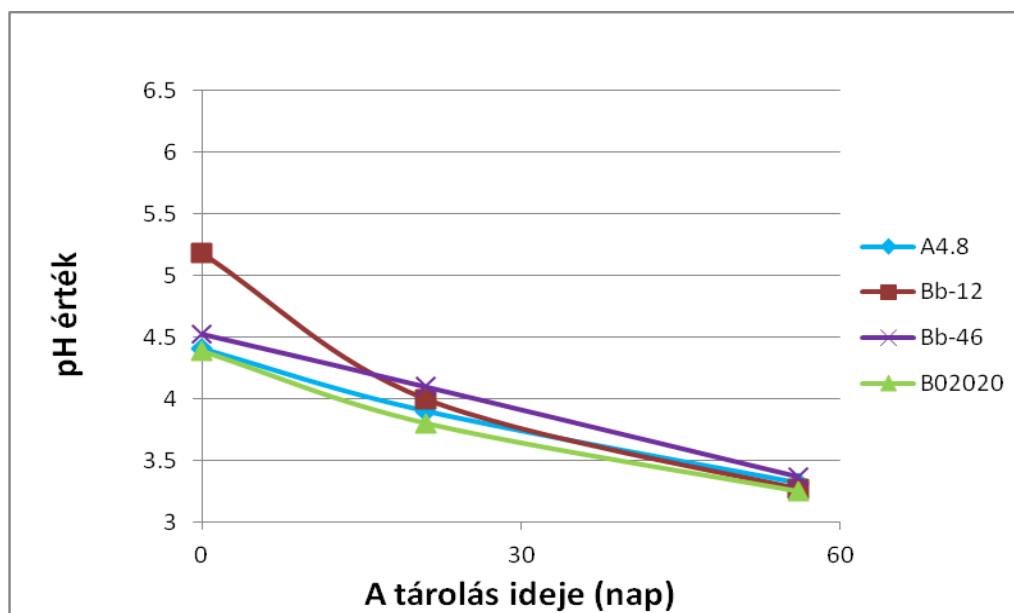
Az eredmények megerősítésére és további információk szerzése céljából a két legígéretesebb törzssel megismételtem a fermentációkat.



13. ábra Az élősejtszám alakulása tárolás során

A pH értékek tekintetében, melyeket a 14. ábra szemléltet, elmondható, hogy a savtermelés mindegyik *Bifidobacterium* törzs esetében jelentős, tehát a 4°C-os hőmérséklet nem akadályozta a

baktériumok élettevékenységét. A diagramról leolvasható, hogy egy hónap elteltével csökkent a fermentált minták pH értéke pH 4 alá, ami azért jelentős, mert az egy hónapos szavatossági idő alatt sem vált a termék élvezhetetlenül savanyúvá.

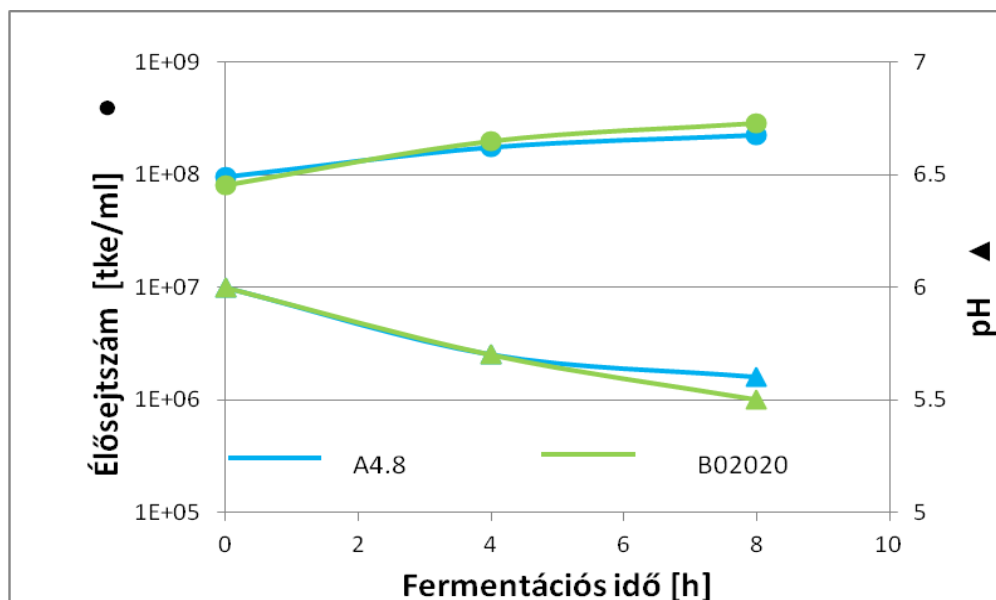


14. ábra A pH értékek alakulása tárolás során

5.4 Fermentált szójatej előállítása és jellemzése, valamint a bifidobaktériumok életképességének vizsgálata hűtve tárolás során

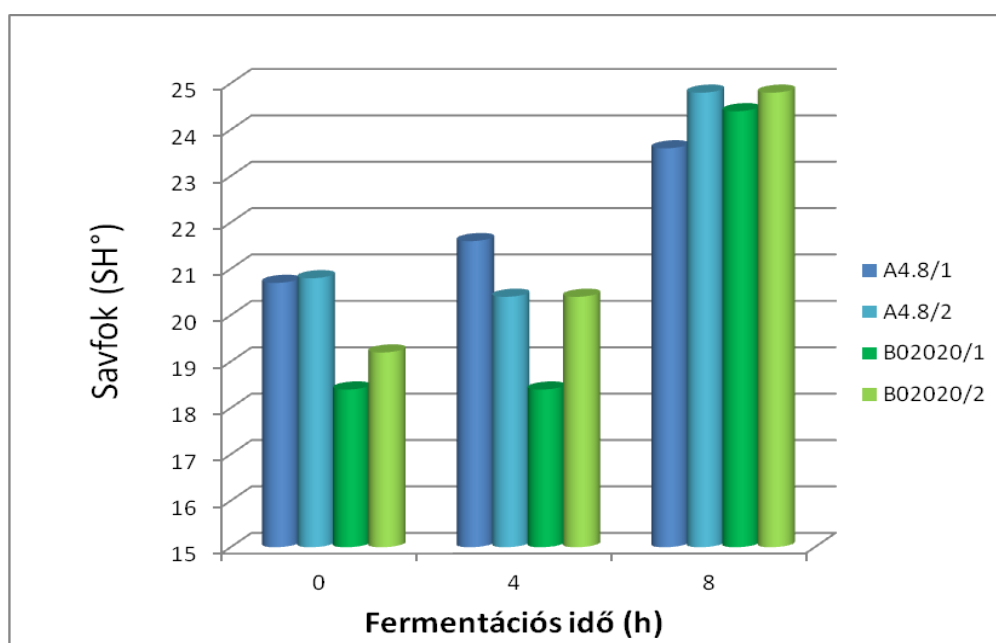
A kiválasztott két legjobban növekvő törzzsel újabb 8 órás fermentációt indítottam a korábbi eredményeim megerősítése végett. Az inkubálás alatt 4 óránként mértem a minták savfokát, valamint élőcsíraszám meghatározást és HPLC vizsgálatot is végeztem a szénhidrátok és savak koncentrációjának meghatározására. A fermentációs idő letelte után tárolási kísérletet kezdtem, mely 4°C-on 8 héten át tartott. A 15. ábra bemutatja a vizsgált törzsek szaporodási görbéit és a pH alakulását a fermentáció során.

A diagramról leolvasható, hogy az inkubáció indítása közel 10^8 élősejtszámmal történt. A kísérleti adatokból a korábbiakhoz hasonló sejtszám növekedést detektáltam, ugyanakkor a fajlagos szaporodási sebességek elmaradtak az előző kísérletek értékeitől, melynek az lehet az oka, hogy a sejtek számára rendelkezésre álló térfogat korlátozta a szaporodást. A vontatott növekedést bizonyítja az is, hogy az adott fermentációs időn belül a pH csökkenés sem volt jelentős, azaz a fermentáció végén mért pH értékek 5,5-5,6 tartományban változtak.



15. ábra A vizsgált törzsek szaporodási görbéi és a pH alakulása a fermentáció során

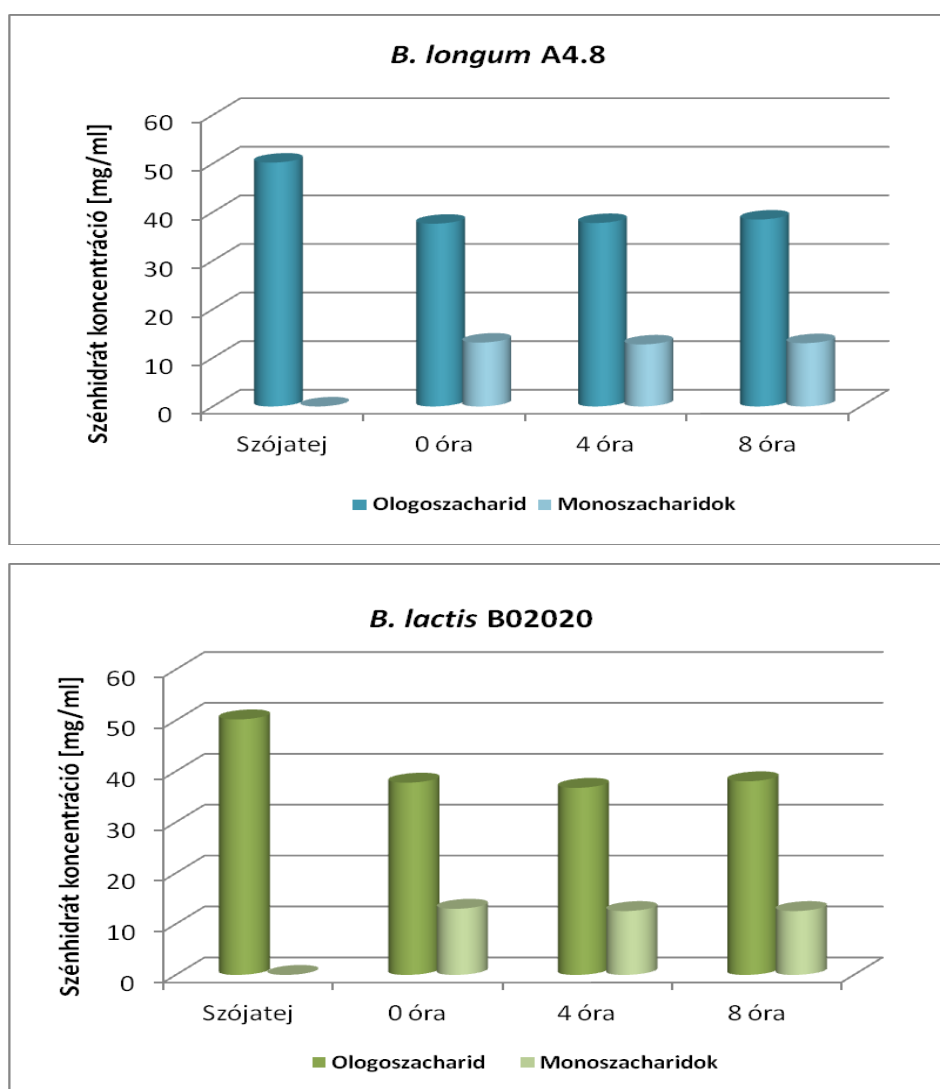
A fermentáció során tapasztalt csekély pH csökkenés miatt meghatároztam a termékek savfokát. A kapott eredményeket a 16. ábrán szemléltetem, melyről leolvasható, hogy a fermentáció kezdetén meghatározott savfok elég magasnak bizonyult a viszonylagos nagy sejtszámnak köszönhetően. Közvetlenül a beoltás után a *B. longum* (A4.8) esetén 20 körüli, míg a *B. lactis* (B02020) törzseknél 18 körüli savfokot mértem. A fermentáció 4. órás mintavételénél egy kisebb mértékű növekedés figyelhető meg, majd a fermentáció végére egyértelműen kimutatható a törzsek metabolikus aktivitását alátámasztó savfok növekedés. Az inkubációs idő végére mindkét törzs megközelítette a 25-ös savfokot.



16. ábra A savfok alakulása a fermentáció során

A bifidobaktériumok szacharolitikus baktériumok, minden törzs erjeszti a glükózt, a galaktózt, valamint a fruktózt. Szénhidrát anyagcseréjük különbözik mind a homo- mind a heterofermentatív tejsavbaktériumok anyagcsere útjától. A cukorbontás végterméke az ecetsav és a tejsav 3:2 mól arányban szén-dioxid képződése nélkül. (Biaviti *et al.*, 2000)

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével vizsgáltam a szójatej minták szénhidrát valamint tejsav és ecetsav tartalmát a fermentáció során. A szénhidrátok alakulását a 17. ábrán szemléltetem.



17. ábra A szójatejfermentációk során az oligoszacharidok és a monoszacharidok koncentrációinak alakulása

A bifidobaktériumok hatékonyan bontják az oligoszacharidokat (verbaszkóz, sztachióz, raffinóz, szacharóz) kisebb polimerizáltságú oligoszacharidokat és galaktózt eredményezve. Az alkalmazott HPLC mérési technika nem tette lehetővé a verbaszkóz mennyiségi meghatározását. Így az adatok

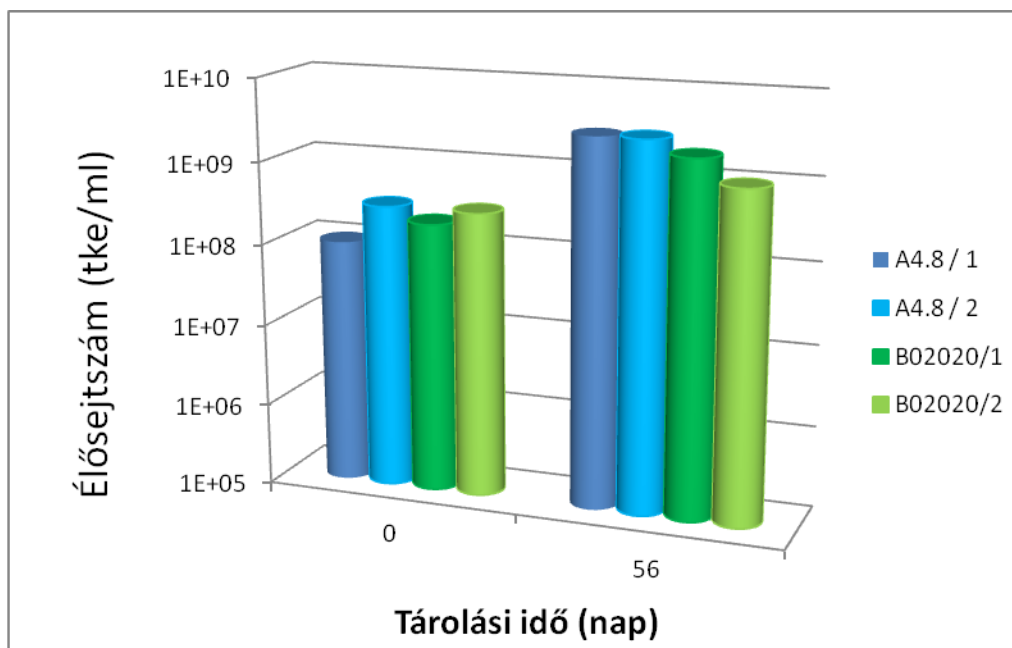
csak tájékoztató jellegűek. A 17. ábrán látható, hogy a kiinduláskor a szójatej oligoszacharid tartalma 50 mg/ml volt, azonban a bifidobaktériumok már közvetlenül a beoltás után megkezdték szénhidrát anyagcseréjüket és a keletkező monoszacharidok lebontási termékei között megtalálhatóak a szerves savak. A cukorbontás végterméke az ecetsav és a tejsav. A szójatej fermentációja során a tejsav és az ecetsav koncentrációk alakulását a 11. táblázatban összegzem.

11. táblázat A szójatej fermentációk során a tejsav és az ecetsav koncentrációk alakulása az időfüggvényében

A vizsgált törzs	Ferm. idő [óra]	Tejsav [mg/l]		Ecetsav [mg/l]	
		Átlag	Szórás	Átlag	Szórás
<i>B. longum</i> A4.8	0	0,44	0,035	229	115
	4	0,48	0,021	355	53
	8	0,44	0,014	233	56
<i>B. lactis</i> B02020	0	0,51	0	285	53
	4	0,45	0,014	222	64
	8	0,44	0,035	207	82

Kiinduláskor a szójatej minta tejsav tartalma 0 mg volt literenként, azonban a beoltást követően a bifidobaktériumok metabolizmusának köszönhetően ez az érték 0,4-0,5 mg/l-re növekedett. Az inkubáció során a 0. órában figyeltem meg a legjelentősebb tejsav mennyiséget a *Bifidobacterium lactis* (B02020) törzsszel beoltott mintákban. A fermentáció előrehaladtával kismértékben csökkent a fermentumok tejsav tartalma, ami azzal magyarázható, hogy gyakran eltolódik a fermentáció egyensúlya a piruvát foszforilolitikus hasítása következtében az ecetsav, hangyasav és etanol javára. Mindenképp kiemelendő azonban, hogy a tejsav csökkenés igen kismértékű, a 8 órás fermentáció végén is meghaladja a minták tejsav tartalma a 0,4 mg-ot literenként.

A fermentáció 4. órájában az A4.8 törzsnél figyelhető meg ecetsav termelődés, majd az inkubáció 8. órájára a tejsav tartalom ismét csökkent, átlagosan 200 mg/l tartalomig. A magyarázat az acetil-foszfát etanolra történő reakciója lehet, ami eltolta a fermentációt egyéb savak irányába.



18. ábra Bifidobaktériumok életképességének megőrzése fermentált szójatejben 4 °C-on történő tárolás során

A *Bifidobacterium longum* (A4.8) valamint a *B. lactis* (B02020) törzsekkel egyenként párhuzamosan végzett fermentációt követő tárolási kísérletből (18. ábra) jól látható a szaporodás mindkét törzs esetében. A *B. longum* nagyobb mértékű növekedést mutat a *B. lactis*nál, azonban a különbségek szinte elhanyagolhatók, hisz mindkét törzs sejtszáma eléri és meg is haladja a 10^9 -en értéket, ami A Magyar Élelmiszerkönyv 1-3/51-1 számú előírásának – miszerint az élőflórás termékek sejtszáma a tárolás végén minimum 10^7 -en élőcsíra/g kell legyen – megfelel. Ma a fermentált tejre vonatkozó szabvány kimondja, hogy a bifidobaktériumokat tartalmazó fermentált tejben a sejtszámnak 10^7 -en tke/g élelmiszer kell lennie, és a tárolás végéig meg kell, hogy tartsa a 10^6 -on tke/g élelmiszer koncentrációt.

A fermentált szójatej alapú termék tehát alkalmasnak bizonyul a fermentált tejtermékek kiváltására. (Ishibashi & Shimamura, 1993)

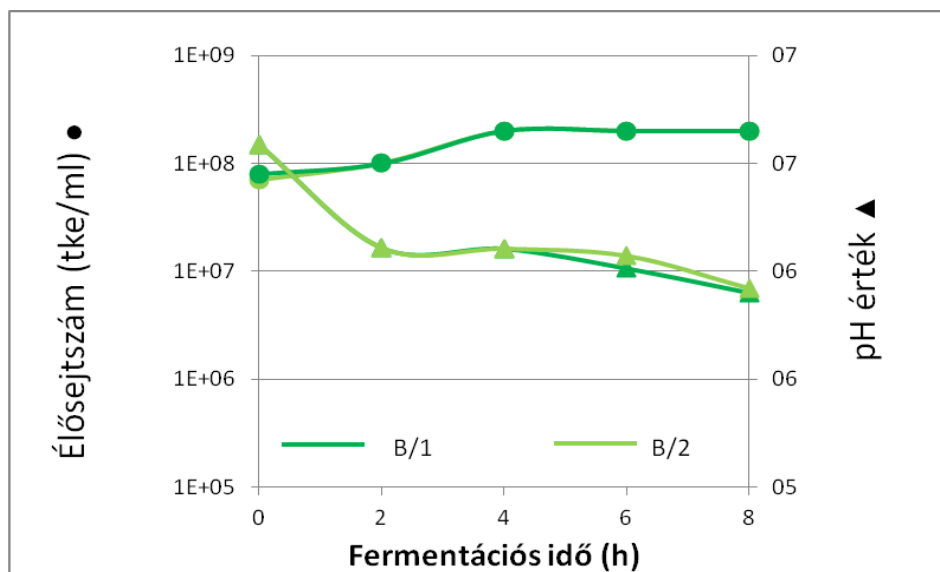
5.5 Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia vizsgálat

Kutatómunkámban célul tűztem ki azt is, hogy a mikrobiológiai vizsgálatokkal meghatározott sejtszámok alakulását összevetsem immunalitikai bioszenzor által kapott eredményekkel.

5.5.1 A vizsgálati minta elkészítése és jellemzése

A szójatej beoltásához a *Bifidobacterium longum* (B01819) törzset alkalmaztam, mely a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Élelmiszer-analitikai Osztályán is elérhető. A részletesebb vizsgálat érdekében a szaporodási görbe felvételét 2 óránkénti mintavételezéssel

határoztam meg a 8 órás fermentáció során. Ebben a fejezetben először a klasszikus mikrobiológiai módszerrel kapott eredményeket összegzem a fermentáció során mért pH értékekkel (19. ábra).

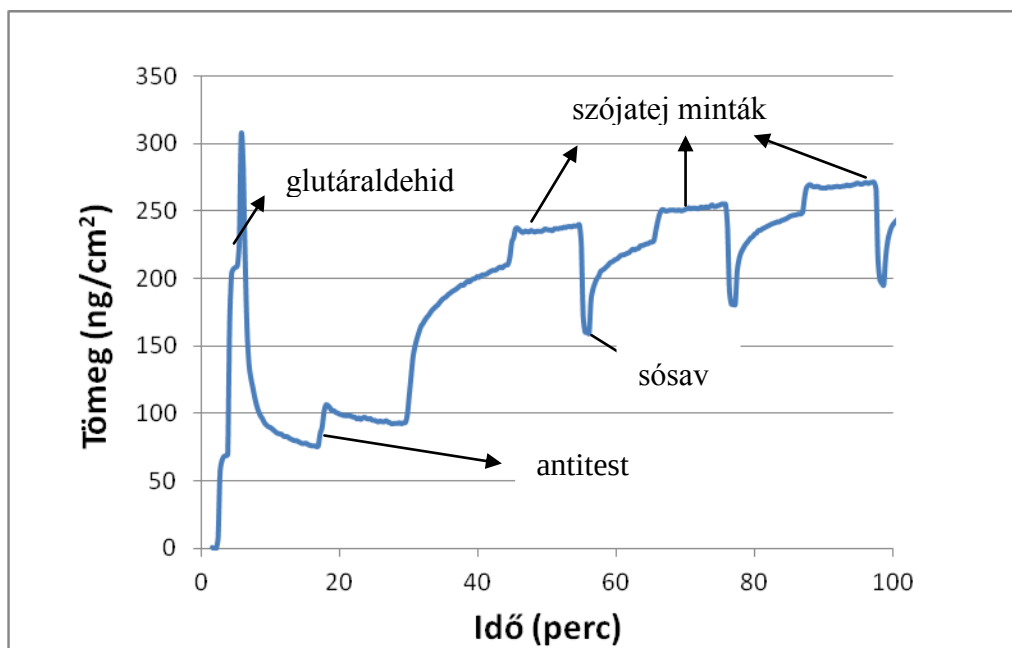


19. ábra A mikrobiológiai módszerrel meghatározott élősejtszám és a pH alakulása a fermentáció során

Az ábrán látható, hogy a *B. longum* törzs szaporodási görbéi az előző fermentációban részt vevő *B. longum* (A4.8) és *B. lactis* (B02020) törzsekhez hasonló lefutást mutatnak. A növekedés a fermentáció 4. órájára stabilizálódik. A pH értékek változása is alátámasztja a korábbi fermentációhoz hasonló vontatott szaporodást, a 8 órás inkubációs idő letelte után 5,8-as pH értéket mértem. Ugyanakkor a kevésbé savas pH kedvezően hat a *Bifidobacterium longum* szaporodására.

5.5.2 Immunanalitikai bioszenzor készítése

A szenzor összeállításához az amino-szilanizált szenzor felszínéhez glutáraldehiddel rögzítettük a vizsgálni kívánt bifidobaktérium törzs (*Bifidobacterium longum* B01819) antitestét. A folyamat megvalósítását mutatja a 20. ábra. A glutáraldehid egy bifunkciós vegyület, amelynek az egyik aldehid csoportja a felszíni amino-csoportokhoz kötődik és a másik aldehid csoportokhoz kötjük az antitestet. A glutáraldehid felvitele a 2. percben történt, majd a 16 percben vittük fel az antitestet. A nem rögzült antitestek pufferes lemosását a 27. percben indítottuk. Ezzel az immunszenzor érzékenyítése befejeződött. A szenzor tesztelését szójatej mintákkal végeztem. Az egyes szójatej minták lemosása 0,05 mM sósavval történt. A bioszenzor az alapvonal eltolódását figyelembe véve reprodukálható eredményeket adott. Ezt követően alkalmassá vált a fermentált termékekben lévő *Bifidobacterium* törzs mennyiségi meghatározására.

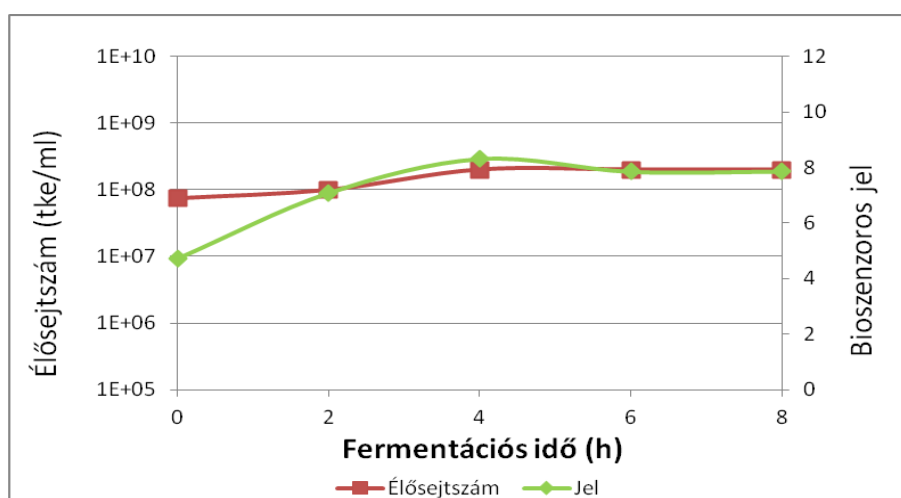


20. ábra A bioszenzor elkészítésének és tesztelésének folyamata

A fermentált szójatejek sejtszámának értékelése előtt meghatároztuk, hogy mely hígításban kapunk megbízhatóbb szenzor jeleket. Az itt meghatározott értékek alapján az ezerszeres hígítást alkalmaztam a méréseim során és ezzel készítettem el a standard egyenest is.

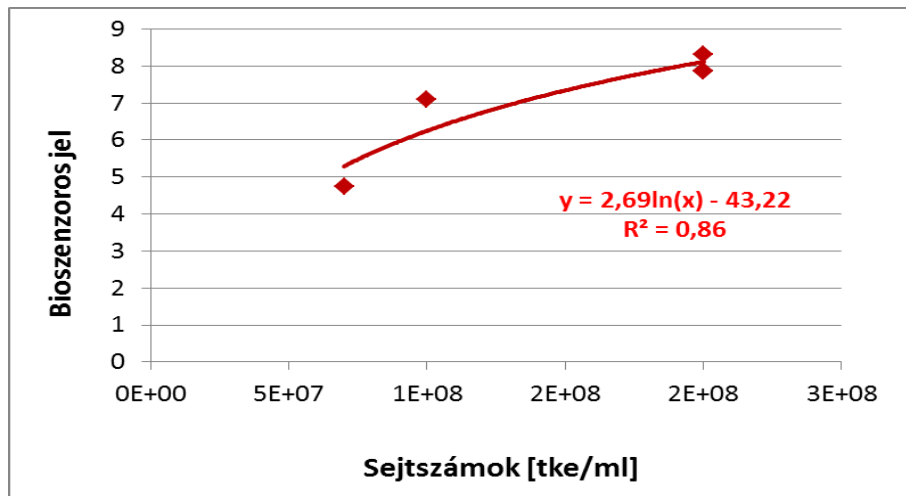
5.5.3 A bioszenzor alkalmazhatósága baktériumok sejtszámának meghatározására

A bioszenzor által mért értékeket a mikrobiológiai módszerrel meghatározott sejtszámokkal is összevettem, amit a 21. ábrán szemléltetek. A diagramon egyértelműen megfigyelhető, hogy a szenzor jelei által kapott görbe lefutása egyezik a telepszámlálással meghatározott görbével.



21. ábra A telepszámlálással és a bioszenzorral mért értékek összehasonlítása

Az eredmények megbízhatóságának matematikai értékelésére összefüggést kerestem a mikrobiológiai úton meghatározott sejtszámok és a bioszenzor által adott jelek között.



22. ábra A bioszenzorral mért és a mikrobiológiai úton meghatározott eredmények összehasonlítása

A diagramról megállapította, hogy a bioszenzor által adott jelek és az általam telepszámlálós módszerrel meghatározott értékek között logaritmikus összefüggés van. A korrelációs koefficiens értéke: 0,86, ami biológiai rendszerek esetében jónak mondható. Az összefüggés segítségével a bioszenzoros mérések alapján következtethetünk a fermentált termék sejtszámára. Így jelentősen lerövidíthető a vizsgálati idő az általánosan alkalmazott tenyésztési módszerrel szemben.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Táplálkozás-élettani szempontból rendkívül fontos a fehérjék, különösen az aminosavak biztosítása szervezetünk megfelelő működéséhez. Sajnos a XXI. században egyre több ember szenved valamilyen ételallergiában vagy intoleranciában. Mivel a tej és tejtermékek az emberi táplálkozásban fő kalciumforrásnak számítanak, ezért e termékek elkerülése a laktóz intoleranciában, illetve tejfehérje allergiában szenvedő személyek számára kalcium hiány és csontritkulás kialakulásához vezethet. Közülük is a tejfehérje allergiában szenvedő egyének vannak kedvezőtlenebb helyzetben, ugyanis nem fogyaszthatják az alacsonyabb fehérjetartalmú erjesztett tejtermékeket sem.

Munkám során célul tűztem ki olyan fermentált termék előállítását, melyet a laktóz intoleranciában és tejfehérje allergiában szenvedő betegek is fogyaszthatnak, valamint vizsgálni kívántam ezen termékben a tárolás során bekövetkező változásokat.

Számos, táplálkozási célra is megfelelő növényi eredetű fehérjeforrás áll rendelkezésünkre, ezek közül is kiemelkednek a hüvelyes növények, különösen a szójabab, ugyanis fehérjetartalma, valamint aminosav- és vitamin tartalma nagyobb, mint a többi növényé.

A koleszterin, glutén és laktózmentes szójatej egyaránt alkalmas élelmiszer a laktóz intoleranciában szenvedő fogyasztóknak, vegetáriánusoknak és tejfehérje allergiában szenvedőknek.

Céljaim között szerepelt kereskedelmi forgalomban kapható szójatej erjesztése különböző *Bifidobacterium* kultúrák alkalmazásával, valamint a késztermék 4°C-on történő tárolásának vizsgálata. Az inkubáció oxigénmentes körülmények között zajlott az erre a célra kifejlesztett anaerob munkahelyen (bugbox). A mikroorganizmusok szaporodását telepszámlálós módszerrel követtem, mértem a minták pH értékét, savfokát, valamint HPLC segítségével vizsgáltam a szerves sav és szénhidrátok koncentrációját.

Eredményeim rámutattak arra, hogy a mind a hat vizsgálatokba bevont bifidobaktérium törzs növekedési szubsztrátumként hasznosította a szójatejet. A *Bifidobacterium breve* B9.1 törzs a fermentációs folyamat során nem tartotta meg életképességét. Legeredményesebben a *Bifidobacterium longum* A4.8, valamint a *Bifidobacterium lactis* B02020 törzsek erjesztették a szójatejet. Segítségükkel joghurt állagú, kellemes vanília illatú, enyhén savas terméket kaptam, mely a 8 hetes, 4°C-on történő tárolási idő végén is megőrizte állagát, és eleget tett a Magyar Élelmiszerkönyv 1-3/51-1 számú előírásának, miszerint az élőflórás termékek sejtszáma a tárolás végén minimum 10^7 élőcsíra/g kell legyen. Kiemelendőnek tartom azt a tényt, hogy az alacsony hőmérsékleten történő tárolás során nemcsak megtartották életképességüket a baktériumok, hanem további szaporodást is tapasztaltam, mely pH csökkenést is eredményezett. Így a termék mikrobiológiailag is biztonságosnak tekinthető.

Céljaim között szerepelt egy olyan vizsgálati módszer adaptálása is, mely lehetővé teszi egy adott mikroorganizmussal készített termékben a sejtszámok alakulásának gyors követését. Ennek érdekében az adott mikroorganizmus antitestét rögzítettem egy bioszenzor felületére és vizsgáltam a bioszenzoros jel alakulását a baktériumszám függvényében. Megállapítottam, hogy az immunszenzoros vizsgálat és a telepszámlálós módszer között logaritmikus összefüggés van, tehát a mérési módszer alkalmas lehet a baktériumszám meghatározására a gyártási folyamat és a tárolás során. Így alkalmazásával kiváltható az idő, munka- és anyagigényes tenyésztési vizsgálati módszer. A bioszenzoros vizsgálat rutinszerű bevezetése javasolható a minőségbiztosítás céljaira, a fermentált termékek gyors és megbízható ellenőrzésére.

7 FELHASZNÁLT IRODALOM

- Altieri A., Bevalacqua A., D'amato D., Alessandro M., Sinigaglia M.** (2008) Modelling the survival of starter lactic acid bacteria and
- Balikó S., Bódis L., Kralovánszky U.** (2005) A szója termesztése, Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Balikó S., Bódis L., Kralovánszky U.** (2007) A szója feldolgozása, felhasználása Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Barna É. (szerk.)** (2000) A táplálkozás egészségkönyve, Kossuth Kiadó, Budapest
- Barna M.** (1998) Magyar táplálékallergia és táplálék intolerancia adatbank, Kossuth Kiadó, Budapest
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V.** (2000): Bifidobacteria: history, ecology, Bifidobacterium bifidum in single and simultaneous cultures, International Journal of Food Microbiology 25 (2008) 729-734
- Bodánszky H.** (2003) Tejcsukor érzékenyek könyve, Anonymus Kiadó, Budapest
- Chou Ch., Hou J.** (2000): Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the
- Csapó J., Csapóné Kiss Zs.** (2002) Tej és tejtermékek a táplálkozásban, Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Deák T.** (2000) Általános Mikrobiológia, Dialóg Campus Kiadó, Budapest
- Deák T.** (2006) Élelmiszer-mikrobiológia, Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Farkas J.** (1990) Az élelmiszertartósítás elméleti alapjai, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Élelmiszeripari Kar, Budapest
- fermented soymilk drink during storage, International Journal of Food Microbiology 56 (2000) 113–121
- Gomes A.M.P., Malcata F.X.** (1999): Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science & Technology, 10 (4-5) 139-157. p.
- Ishibashi N. & Shimamura S.** (1993) Bifidobacteria: Research and developmant in Japan, Food Technology 6:126-135.
- Magyar Élelmiszerkönyv 1-3/51-1 számú előírása** (2009)
- Mayer Á., Seiler H. & Scherer S.** (2003) Isolation of Bifidobacteria from Food and Human Faeces and Rapid Identification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Annals of Microbiology. 53 (3): 299-313
- physiology and applications. Annals of Microbiology, 50 (2) 117-131. p.
- Szekér K.** (2006) Élet, Erő, Probiotikum, Élet és Tudomány, 2006/22: 684-686.o
- Varga Zs., Juhászné, M. Tóth Á.** (2002) Fermentált tejkészítmények előállításának lehetőségei, Élelmezési ipar, (56.ÉVF.) 3. 75.o.
- Vörös J., Ramsden J. J., Csúcs G., Szendrő I., De Paul S. M., Textor M., Spencer N. D.** (2002) Optical grating coupler biosensors. 23 (2002) 3699–3710
- Wang Y. C., Yu, RC, Chou CC.** (2004) Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermentedsoymilk after drying, subsequent rehydration and storage, International Journal of Food Microbiology 93 (2004) 209-217

Szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek,

Rezessyné dr. Szabó Juditnak
és
Adányiné dr. Kisbocskói Nórának

*akik időt és fáradságot nem ismervé segítették munkámat és osztották meg velem
szakértelmüket.*

Köszönettel tartozom

Bujna Erikának

*aki laboratóriumi kísérleteim során rengeteg segítséget nyújtott és hasznos
tanácsokkal segítségemre volt.*

valamint
családomnak
és
barátaimnak
a biztató szavakért és a türelmükért.