

***Lactobacillus helveticus* és *Ligilactobacillus salivarius* eredetű parabiotikumok antimikrobás hatása**

Liebl Rebeka, hallgató, liebeka2011@gmail.com - **Dr. Bujna Erika**, egyetemi docens,
Bujna.Erika@uni-mate.hu - **Dr. Nguyen Duc Quang**, egyetemi tanár,
Nguyen.Duc.Quang@uni-mate.hu

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök
és Erjedéssipari Technológia Tanszék, 1118 Budapest, Ménesi út 45.

Összefoglalás

A probiotikumok jótékony élettani hatásának vizsgálata során, bizonyítást nyert, hogy az előnyök sokszor nem az élő sejtekhez kötődnek. Kutatásaink során ebből adódóan a parabiotikumok, vagyis a nem életképes baktériumok vagy baktérium sejtalkotók előállítására fókuszáltunk és a sejtfeltárási módszereket hasonlítottuk össze antimikrobás hatás szempontjából. A probiotikus *Lactobacillus* törzsekből előállított parabiotikumok antimikrobás hatásának értékelése során megállapítottuk, hogy az MRS tápközegben lévő glükóz trehalózra cserélése serkentően hatott az antimikrobás anyag termelődésére, azonban a trehalóz koncentrációjának változtatása nem fokozta ezt. A kémiai módszer volt a legjobb a sejtek inaktiválására a parabiotikumok antimikrobiális aktivitása szempontjából, míg a kombinált sejtfeltárás, azaz a hőkezelés és a kémiai módszer együttes alkalmazása nem fokozta az antimikrobás hatást. Megállapítottuk, hogy a probiotikum alapú parabiotikumok – különösen a *L. helveticus* és a *L. salivarius* eredetű - hatékonyan képesek gátolni az általunk tesztelt Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok szaporodását, mely ígéretes alkalmazási lehetőséget nyújt az élelmiszertartósítás területén.

Kulcsszavak: parabiotikum, sejtfeltárás, antimikrobás hatás, *Lactobacillus*

1. Bevezetés

A probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben alkalmazva egészségügyi előnyöket biztosítanak a gazdaszervezet számára (Hill *et al.*, 2014). A probiotikus baktériumok használatával kapcsolatban azonban felmerülnek kihívások, mint a megfelelő élősejtszám biztosítása az élelmiszer előállítása, tárolása, és fogyasztása során, továbbá a fiziológiai állapotuk a gazdaszervezetben, a mutáció vagy a genetikai stabilitásuk megőrzése (Monteiro *et al.*, 2023). Mivel a probiotikus hatás sokszor nem az élő sejtekhez, hanem inkább a sejtalkotókhoz vagy a poszt-metabolitokhoz kötődik, így a kutatók figyelme az utóbbi időben a nem életképes mikroorganizmusok vagy mikrobiális sejt kivonatok felé terelődött (Taverniti és Guglielmetti, 2011). Egyre nagyobb figyelmet kap a parabiotikumok használata, amelyek elhalt/inaktivált baktériumsejtek, sejtalkotók, sejttermelékek vagy sejtlyázatok is lehetnek és egészségügyi előnyökkel rendelkeznek, stabilak, valamint biztonságos a felhasználásuk (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018). A parabiotikumok előállítása ára alkalmazható módszerek mindegyike a mikrobák életképességének elvesztésére összpontosít a sejtmembránon okozott sérülés révén (Cuevans-González, 2020). Seyede és munkatársai (2023) által összegyűjtött adatok alapján a parabiotikumnak számító peptidoglikán, illetve a sejt falban lévő poliszacharidok is képesek modulálni az immunrendszert, és a helyes bélrendszeri egyensúlyt fenntartani, míg az N-acetilglükózamin a jótékony baktériumok szaporodását is serkenti. Mindezek mellett a sejt felszíni fehérjék gyulladáscsökkentő,

immunmodulációs hatással bírnak, valamint anti-adhéziós tulajdonságuk is van. Számos tanulmány beszámolt az egyes sejtalkotók vagy parabiotikumok antimikrobás hatásáról, amelyet nemcsak a Gram pozitív baktériumok ellen fejtenek ki, így kétségtelenül nagy potenciális előnyük van a jelen gyakorlatban is elterjedten alkalmazott bakteriocinek képviselőivel szemben (Wafaa, 2020; Cuevas-González *et al.*, 2020; Liebl, 2023). Mivel a parabiotikum előállításának módja hatással lehet a sejtek szerkezeti összetételére és befolyásolhatja immunmoduláló aktivitásukat (Taverniti és Guglielmetti, 2011), ezért kutatásaink során különböző módszereket terveztünk alkalmazni és összehasonlítani. A leggyakoribb probiotikumként alkalmazott fajok közül, a *Lactobacillus*-ok esetén inaktiválás után is bizonyították már hatékonyságukat (Wafaa, 2020), ebből a megfontolásból probiotikus *Lactobacillus* törzseket választottunk kutatásainkhoz. Vizsgálni kívántuk, hogy az előállított probiotikus tejsavbaktérium alapú parabiotikum készítmény rendelkezik-e azon jótékony hatásokkal, különös tekintettel a kórokozó mikroorganizmusok elleni antimikrobás hatásra, amelyek az élő probiotikus sejt alkalmazásával elérhetők.

2. Anyagok és módszerek

A kutatómunka során négy probiotikus tejsavbaktérium törzset vizsgáltunk (*Limosilactobacillus fermentum* HA-179, *Lactobacillus helveticus* R-52, *Ligilactobacillus salivarius* HA-118 és a *Lactobacillus crispatus* LCR01), melyeket 1% glükóz, valamint 0,5%; 1%; 2% trehalóz tartalmú MRS táplevesben szaporítottunk 18 órán keresztül.

A sejtfeltárást mechanikai- és nem-mechanikai módszerekkel is elvégeztük, illetve együttes alkalmazásukat is vizsgáltuk. A nem-mechanikai sejtlyízishez 0,45 g/l koncentrációjú cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB) oldatot használtunk, 3 ml összegyűjtött sejtekhez mintához 1,5 ml CTAB oldatot adtunk, majd erős vortexelés után 10 percig hagytuk hatni. A kémiai módszerek közül a 1%-os Triton X-100 oldatot is 1:2 arányban adtuk a mintákhoz, s a feltárást 30 perc hatóidővel végeztük. Mindkét kémiai oldat alkalmazása után a sejtszuspenziót többször, desztillált víz segítségével átmostuk.

Mechanikai módszerek közül a fagyasztás-felolvasztás műveletének hatszori egymást követő ismétlésével valósítottuk meg a feltárást. Ezen eljárás során a mintákat teljes fagyásig -18°C-ra helyeztük, majd szobahőmérsékleten hagytuk kiolvadni. A szonikálás alkalmazhatóságának vizsgálatához jéggel feltöltött ultrahangos vízfürdőt használtunk, 5 másodperces hatóidővel, melyet 5 másodperc szünet követett. Ezt a műveletet 10 percen keresztül ismételtük. A mechanikai és kémiai módszerek együttes alkalmazása során a CTAB oldatos feltárást követően hőkezelést (80°C, 10 perc) valósítottunk meg.

Az antimikrobás hatás vizsgálata a különböző módszerekkel feltárt sejtekből agardiffúziós módszerrel történt TSB agar felhasználásával. A teszt mikroorganizmusok az alábbiak voltak: *Enterococcus faecalis* NCAIM B01312, *Escherichia coli* 8739, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* ATCC 33090, illetve az *Enterobacter cloacae* NCAIM B02073. A 8 mm átmérőjű lyukakba 100 µl-t pipettáztunk a parabiotikumokból, majd a lemezeket 37°C-on 24 óráig inkubáltuk és a feltisztulási zóna méretéből következtettünk az antimikrobás hatás mértékére.

A szaporodás gátlását mikrotiter lemezben is követtük 37°C-on 20 óráig 100 µl tripton-szója táplevesben (TSB), melyhez 50 µl kórokozót tartalmazó tenyészelvet és 50 µl parabiotikumot adtunk. Az abszorbanancia mérése 600 nm-en 30 percenként történt 20 órán keresztül.

3. Eredmények és értékelésük

A kutatómunka kezdetén glükóz tartalmú MRS levesben felszaporított, mechanikai sejtfeltárással előállított parabiotikumok gátló hatását vizsgáltuk, melynek eredményeit az 1. táblázat tartalmazza. A módszerek közül a szonikálás esetében a *Limosilactobacillus fermentum* mikroorganizmusból kinyert parabiotikum gátló hatást fejtett ki az *Enterococcus faecalis* és az *Escherichia coli* 8739 ellen. A *L. helveticus* szonikálással feltárt sejtalkotói csak a *Listeria innocua* ellen, míg a *L. crispatus* esetében az *E. faecalis* ellen alakult ki minimális feltisztulási zóna. A *L. salivarius* esetében nem volt kimutatható gátló hatás egyik patogén ellen sem ezen módszer alkalmazásával (1. táblázat).

A nem-mechanikai módszerek közül a CTAB oldattal végzett kémiai feltárás eredményeként nem alakult ki gátló hatás a glükóz tartalmú MRS közegben felszaporított sejteknél, azonban megbizonyosodhattunk arról, hogy a kémiai kezelést követő atmosféri folyamatokkal kizárható a CTAB által okozott antimikrobás hatás. A fagyasztás- felolvasztás módszerével előállított parabiotikumok közül csak a *L. salivarius* eredetű mutatott antimikrobás hatást az *Enterobacter cloacae* ellen. Triton-X 100 oldattal végzett kémiai kezeléssel előlt tejsavbaktériumok, - mely permeabilizálással roncsolta a sejteket -, szintén nem gátolták a vizsgált kórokozókat (1. ábra).

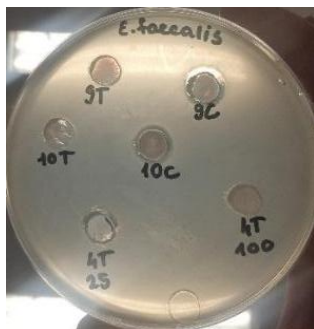
1. táblázat: Különböző sejtfeltárási módszerekkel előállított parabiotikumok hatékonysága kórokozó mikroorganizmusok ellen

Para-biotikum eredete	Módszer	Kórokozó törzsek				
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i> 8739	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. innocua</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>L. fermentum</i> HA-179	Szonikálás	+	+	-	-	-
	Fagyasztás-felolvasztás	-	-	-	-	-
	CTAB	-	-	-	-	-
	Triton-X 100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>L. helveticus</i> R-52	Szonikálás	-	-	-	+	-
	Fagyasztás-felolvasztás	-	-	-	-	-
	CTAB	+	+	+	++	+
	Triton-X 100	-	-	-	-	-
<i>L. salivarius</i> HA-118	Szonikálás	-	-	-	-	+
	Fagyasztás-felolvasztás	-	-	-	-	-
	CTAB	+	+	+	+	+
	Triton-X 100	-	-	-	-	-
<i>L. crispatus</i> LCR01	Szonikálás	+	-	-	-	-
	Fagyasztás-felolvasztás	-	-	-	-	-
	CTAB	+	+	+	+	+
	Triton-X 100	-	-	-	-	-

„-” nincs feltisztulási zóna, „+” 0,5 cm feltisztulási zóna, „++” 1 cm feltisztulási zóna,

Pranckute és munkatársai (2016) kutatásai megerősítették, hogy probiotikumok prebiotikus oligoszacharidokkal történő együttes szaporítása fokozza a bakteriocin termelést. Korábbi vizsgálatainkból is egyértelműen kiderült (Liebl, 2023), hogy az MRS tápközegben lévő glükóz trehalózra cserélése serkentően hat az antimikrobás anyag termelődésére. Ezek alapján megvizsgáltuk a trehalóz koncentráció változtatásának hatását (0,5%, 1%, 2%) is az *L. salivarius* törzsből készített parabiotikum esetén kórokozó mikroorganizmusokkal szemben. Eredményeink alapján megállapítható, hogy minimális hatékonyság növekedés érhető el a

trehalóz tartalom emelésével. 1% trehalóz esetében feltisztulási zóna növekedés volt megfigyelhető a 0,5% trehalóz alkalmazásához képest az *E. faecalis*, az *E. coli* O157:H7, *L. innocua* és az *E. cloacae* patogénekkal szemben is. Ellenben a koncentráció 1%-ról 2%-ra való növelése nem eredményezett jelentős gátló hatás növekedést egyik mikroorganizmus ellen sem (**1. ábra**), így további kísérleteinket 1% trehalóz tartalmú tápközegben felszaporított mikroorganizmusokkal végeztük.

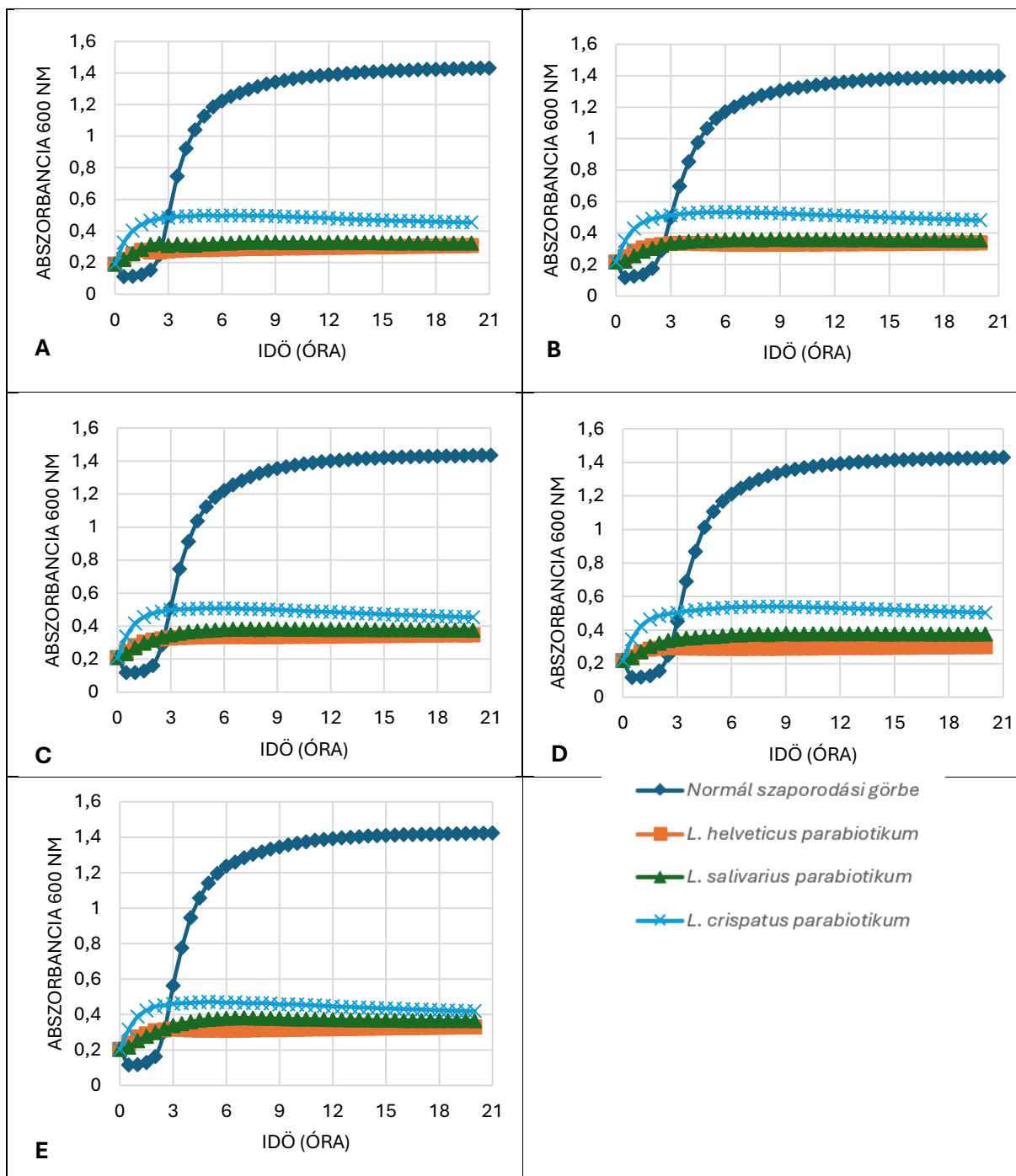


1. ábra: Különböző módszerekkel előállított parabiotikumok antimikróbás hatása *Enterococcus faecalis* ellen 9T: *L. salivarius* Triton-X 100 feltárva, 9C: *L. salivarius* CTAB feltárással, 10T: *L. crispatus* Triton-X 100 feltárva, 10C: *L. crispatus* CTAB feltárással, 4T25: *L. helveticus* 25 ml fermentléből, Triton-X 100 feltárva, 4T100: *L. helveticus* 100 ml fermentléből, Triton-X 100 feltárva

Szakirodalomban fellelhető a mechanikai és nem-mechanikai sejtfeltárás együttes alkalmazása az előállított parabiotikum hatékonyságának növelésére (Shehadul *et al.*, 2017). Kutatómunkánk során megvizsgáltuk a CTAB kémiai detergens és a hőkezeléses mechanikai sejtfeltárás együttes alkalmazhatóságát, a gátló hatás fokozhatóságának kimutatására, melyhez 1% trehalóz tartalmú MRS táplevesben szaporítottuk fel a tejsavbaktériumokat. A különböző tejsavbaktériumokból ily módon előállított parabiotikum tekintetében egyértelműen megállapítható volt, hogy az antimikróbás hatás nem fokozódott egyik tejsavbaktérium esetében sem a kombinált kezelés hatására.

A CTAB oldatos kémiai sejtfeltárással kinyert *L. helveticus*, *L. salivarius* és *L. crispatus* parabiotikumok patogén mikroorganizmusok szaporodására kifejtett gátló hatását mikrolemezben is követtünk (**2. ábra**).

A kontrollként használt 1% trehalóz tartalmú TSB tápközegben jól látható, hogy minden kórokozó megfelelően szaporodott, elérte az 1,4 abszorbancia értéket 12 óra alatt, majd a szaporodás a lassuló, végül a stacioner fázisba lépett. Megfigyelhető a vizsgált patogének parabiotikumok hozzáadása mellett felvett szaporodási görbéjén a csökkent mértékű növekedés. A legnagyobb gátlás a *L. helveticus* eredetű parabiotikummal érhető el az *E. cloacae* és *E. faecalis* törzsei ellen, melyeknél az abszorbancia nem haladja meg a 0,3 értéket. A *L. salivarius* sejttörmeleke esetén is hasonló a tendencia, az abszorbancia egyik kórokozó esetén sem haladja meg a 0,4 értéket, s leghatékonyabb az *E. cloacae* ellen. A legkisebb mértékű gátlást a *L. crispatus* eredetű parabiotikum mutatta, de alkalmazásával a kontrollhoz képest így is harmadára visszaszorítható a kórokozók szaporodása.



2. ábra A CTAB oldatos kémiai sejtfeltárással kinyert *L. helveticus*, *L. salivarius* és *L. crispatus* eredetű parabiotikumok patogén mikroorganizmusok szaporodására kifejtett gátló hatása A: *E. cloacae*, B: *E. coli* O157:H7, C: *E. coli* 8739, D: *E. faecalis*, E: *L. innocua*

4. Következtetések és javaslatok

Kutatásaink során probiotikus *Lactobacillus* törzsekből állítottunk elő parabiotikumot, melyek antimikrobás hatásának értékelése során megállapítottuk, hogy a törzsek felszaporítására szolgáló MRS tápközegben a glükóz helyett 1% trehalóz kiegészítést alkalmazva növelhető a gátló hatás mértéke a tesztmikroorganizmusokkal szemben. A vizsgálatok azt is bizonyították, hogy a trehalóz koncentrációjának változtatása nem fokozza az antimikrobás hatást.

Parabiotikumok CTAB és hőkezelési módszerrel is előállíthatók, ugyanakkor a CTAB oldattal feltárt parabiotikumok nagyobb gátló hatást mutattak a hőkezeléssel inaktivált társaikhoz képest. A kombinált sejtfeltárás, azaz a hőkezelés és a kémiai módszer együttes alkalmazása nem fokozta az antimikrobás hatást, azonban megállapítható e kísérletek alapján, hogy az antimikrobás hatást okozó komponens hőstabil.

Összességében elmondható, hogy a probiotikum alapú parabiotikumok – különösen a *L. hetveticus* és a *L. salivarius* eredetű - hatékonyan képesek gátolni az általunk tesztelt Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok szaporodását, s a legjobb hatást az *Enterococcus faecalis* ellen fejtették ki. Mivel a probiotikumok alkalmazása engedélyezett élelmiszeripari területen, így a belőlük készült parabiotikumok ígéretes jelöltek élelmiszertartósítási területen.

5. Irodalom

- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. 2018, Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114.
- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., & Aguilar-Toalá, J. E. 2020, Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. G, Flint, H. J., Salminen S., Calder, P. C, Sanders, M. E. 2014, The International Scientific Association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.
- Hosseini, S. H., Farhangfar, A., Moradi, M., & Dalir-Naghadeh, B. (2023). Beyond probiotics: Exploring the potential of postbiotics and parabiotics in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science*, 105133.
- Liebl R. 2023, Posztbiotikumok antimikrobás hatásának vizsgálata, Szakdolgozat, Budapest
- Monteiro, S. S., Schnorr, C. E., & Pasquali, M. A. D. B. 2023, Paraprobiotics and Postbiotics—Current State of Scientific Research and Future Trends toward the Development of Functional Foods. *Foods*, 12(12), 2394.
- Prancute, R., Kaunietis, A., Kuisien, N., Citavicius, D. J., 2016, Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 89: 669–676.
- Shehadul Islam M., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P. R., 2017, A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3), 83
- Taverniti, V., & Guglielmetti, S. 2011, The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*, 6(3), 261-274.
- Wafaa A. A. E., 2020, Paraprobiotics and postbiotics: Contemporary and promising natural antibiotics alternatives and their applications in the poultry field. *Veterinary Journal*, 10(3): 323–330

A kutatás a MATE Kiemelt Kutatócsoportok Programjának, valamint a TKP2021-NVA-22 projekt támogatásával készült.