

Probiotikus tulajdonsággal rendelkező tejsavbaktériumok antibakteriális hatása

Antibacterial Activity of Probiotic Lactic Acid Bacteria

Activitatea antibacteriană a bacteriilor lactice cu proprietăți probiotice

Dr. BOTH Emese

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem,
Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda,
Szabadság Tér 1. sz., 530104, Tel.: +40-266-314-657, Fax: +40-266-372-099,
E-mail: csikszereda@sapientia.ro, www.sapientia.ro

ABSTRACT

In the present study, was investigated the antibacterial effect of 76 lactic acid bacterial isolates originated from traditional cheeses and human microbiota against different pathogenic bacteria. From the studied strains Enterococcus faecium SGt102.2.2. and Lactobacillus brevis Szj102.1. showed the wide inhibitory spectrum against Salmonella enteritidis. Bacteriocin production analyzed with poliacrylamid-gel electroforesis it was detected by the strain Lactobacillus brevis Szj102.1. This preliminarily work results show the potential application of this autochthonous lactic acid bacteria for the improvement of safety of traditional fermented foods.

ÖSSZEFOGLALÓ

Jelen tanulmányban 76 – tradicionális sajtokból, valamint csecsemők bél-mikrobiotájából izolált – tejsavbaktérium törzs antibakteriális hatását vizsgáltuk. A vizsgált baktériumtörzsek közül az Enterococcus faecium SGt102.2.2. és Lactobacillus brevis Szj102.1. törzsek esetén mutatható ki jelentősebb gátlás Salmonella enteritidis patogén baktériumra. Poliakrilamid-gélelektroforézis segítségével a Lactobacillus brevis Szj102.1 törzs folyékony tenyészetének felülúszójából peptid természetű bakteriocin volt kimutatható. Ezen kutatásban kapott eredmények alapján elmondható, hogy egyes autohton tejsavbaktériumok felhasználhatóak tradicionális élelmiszerek tartósításában.

Kulcsszavak: tejsavbaktérium, probiotikum, patogén, antibakteriális, bakteriocin

1. BEVEZETŐ

A probiotikumok a FAO/WHO (2002) meghatározása szerint olyan élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségére [1].

Probiotikumként leggyakrabban tejsavbaktériumokat alkalmaznak. A tejsavbaktériumokat régóta használják az élelmiszeriparban, mivel képesek a laktóz és más szénhidrátok tejsavvá való alakítására, ezáltal a termék pH-ját savas tartományig csökkentik (pH<4,5). Ezt a savas közeget a tejsavbaktériumok többnyire jól tolerálják, viszont sok más nemkívánatos baktériumra gátló hatással van (romlás- és kórokozók is akár) [7]. A savas pH denaturáló hatással van a sejtfelszíni enzimekre, valamint károsodásokat okoz a fehérjék és a DNS szerkezetében, a baktériumok anyagcsere folyamataiban. Emellett károsító hatása van a képződő szerves savak (tejsav, ecetsav) disszociálatlan molekuláinak is [10]. A tejsavbaktériumok szerves savak és oxidáló hatású hidrogén-peroxid termelése mellett fehérje természetű antimikrobás anyagok, ún. bakteriocinek termelésével is képesek gátolni más, elsősorban Gram-pozitív baktériumokat [7].

A tejsavbaktériumok Gram-pozitív baktériumok. A leggyakrabban előforduló probiotikus baktériumok a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* nemzetségbe tartoznak, de ide sorolhatóak más nemzetség tagjai is pl. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*. Ezen baktériumok a természetes bélflóra helyreállítását segítik, mint ismeretes: gyakran javasolják orvosok antibiotikus kezelések után [2].

Probiotikusnak mondható egy baktériumtörzs, ha rendelkezik a következő tulajdonságokkal és képességekkel:

- Sav- és epetolerancia: képesek legyenek élve eljutni a vastagbélbe és ott megtelepedni.
- Adhéziós képesség: legtöbb baktérium adhezinekkal rendelkezik a sejtfelszínén, ekképp tud kötődni a bélhámsejtekhez.
- A patogének szaporodásának gátlása: savtermelés, bakteriocin- és hidrogén-peroxid-termelés révén.
- Immunogén jelleg: növelik a „gyulladásgátló” (antiinflammatory) citokinek szekrécióját, valamint elfojtják a „gyulladáselőségitő” (proinflammatory) citokinek termelését [3].

Kutatásunk célja volt 37 nem kereskedelmi forgalomban kapható oltóval készített sajtból, valamint 39 anyatejes csecsemő székletéből izolált baktériumtörzs egyes probiotikus tulajdonságainak vizsgálata. Jelen tanulmányban ezen tejsavbaktériumok gátló hatását mutattuk ki egyes patogén mikroorganizmusokkal szemben. (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* 5973, *Bacillus cereus* 2, *Escherichia coli* ATCC 13706 és *Listeria monocytogenes*).

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Probiotikus tejsavbaktériumok antibakteriális hatásának vizsgálata

Jelen teszt célja kimutatni a tejsavbaktériumok gátló hatását különböző patogén mikrobák szaporodására nézve.

Az antimikrobiális hatás vizsgálatához 14 napig 37°C-on, MRS levesben előnevelt tejsavbaktériumtörzseket használtunk. A patogén baktériumokat *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* 5973, *Bacillus cereus* 2, *Escherichia coli* ATCC 13706 és *Listeria monocytogenes* Brilliant Green Phenol Red agar (*Salmonella enteritidis*), *Listeria mono* differenciál (*Listeria monocytogenes*), a többi patogén esetén nutrient agarba oltjuk lemezöntéssel. Majd az agar felületén létrehozott bemélyedésekbe a vizsgált tejsavbaktériumok felülúszóját pipettázzuk. Az így beoltott táparagokat 37°C-on inkubáltuk 48 órát.

Az inkubálást követően az antibakteriális hatást a gátlási zónák mérete alapján adjuk meg.

2.2. Bakteriocinek jelenlétének kimutatása

Azon tejsavbaktérium törzseket vizsgáltuk, amelyek bakteriosztatikus hatással rendelkeztek. Ezeket a tejsavbaktériumokat 10 napig folyékony MRS táplevesben neveltük 37°C-on. A folyékony tenyészetet lecentrifugálva a kapott felülúszót poliakrilamid géltre vittük fel (50V, 20 min, 150 V, 60 min). A próbák vizualizálására Coomassie Blue festéket használunk, a 95°C-ra melegített próbákat, 5 percig kezeljük: 20 µl felülúszóhoz 4 µl színezéket adunk.

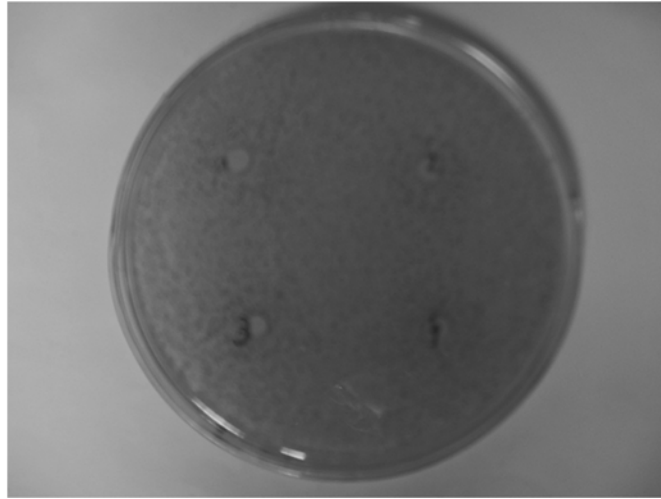
3. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Probiotikus tejsavbaktériumok antibakteriális hatásának vizsgálata

A tejsavbaktériumok antimikrobiális hatása abban áll, hogy csökkentik a közeg pH-ját, szerves savakat választanak ki, emellett hidrogén-peroxidot termelnek, ezek összhatása a bakteriocinek termelésével fokozódik.

Tagg és munkatársai (1976) definíciója szerint a bakteriocinek fehérje jellegű vegyületek, amelyek közel rokon baktériumokat képesek elpusztítani, bár ismertek olyanok is, amelyek rendszertanilag távolabbi baktérium-csoportok ellen is hatásosak.

Az általunk izolált tejsavbaktérium törzseket (39 törzs sajtból, valamint 37 törzs csecsemők bél-mikrobiotájából származik) használtunk fel patogén-gátlásuk megfigyelésére a következő bélpatógén baktériumokkal szemben: *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* 5973, *Bacillus cereus* 2, *Escherichia coli* ATCC 13706 és *Listeria monocytogenes*.

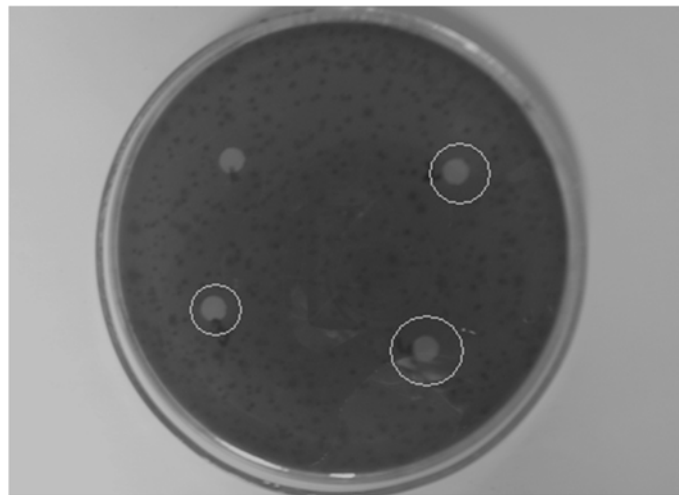


1. ábra

Bacillus cereus 2 esetén nem figyelhető meg gátlási zóna

A 10-15 napig, 37°C-on folyékony MRS táplevesben előnevelt tejsavbaktériumok táplevesét lecentrifugáltuk, majd a felülúszóval dolgoztunk a továbbiakban az antibakteriális hatás megfigyelése céljából. Az ábrán látható táptalajban és minden egyes tesztelt táptalajban patogén baktériumokat szuszpendálunk, a táptalajon látható mélyedésekben egyes tejsavbaktérium-törzsek felülúszóját pipettáztuk.

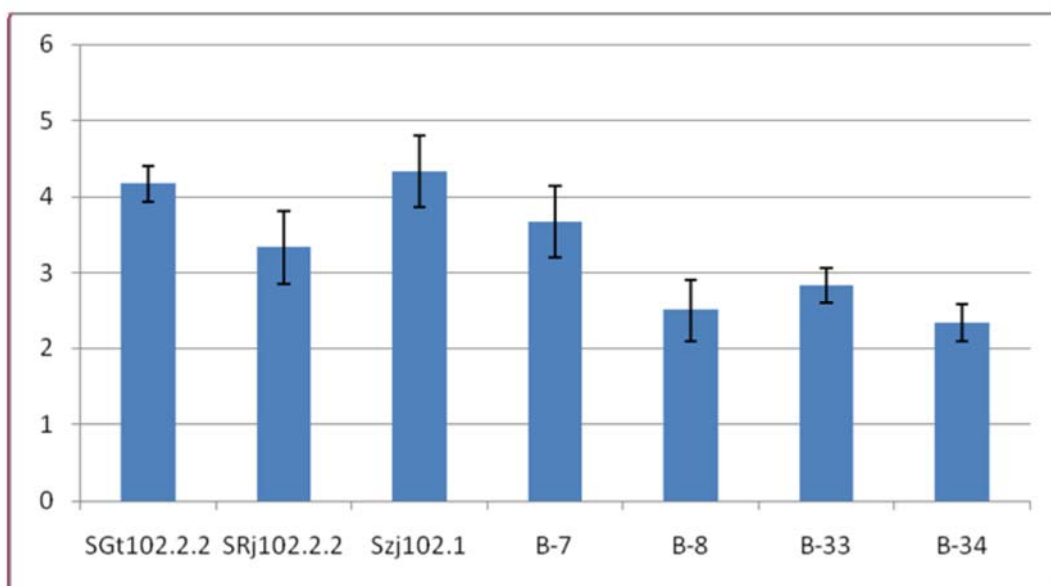
A 2. ábrán látható (*Salmonella enteritidis*) patogén baktérium esetén volt megfigyelhető a mikrobára gyakorolt gátlás egyes tejsavbaktérium esetében: SRj102.2.2., Szj102.1., SGt102.2.2. (ezek láthatók a 2. ábrán) és B-7, B-8, B-33 și B-34. A *Staphylococcus aureus* 5973, *Bacillus cereus* 2 (1. ábra), *Escherichia coli* ATCC 13706 és *Listeria monocytogenes* esetében nem figyelhető meg gátlás.



2. ábra

Salmonella enteritidis esetén a 2,3,4 minták esetén gátlási zónák figyelhetők meg a következő tejsavbaktériumoknál: SRj104.2., SRj102.2.2., Szj102.1., SGt102.2.2

A legszámottevőbb gátlás (legnagyobb gátlási zóna) az *Enterococcus faecium* SGt102.2.2. és *Lactobacillus brevis* Szj102.1. esetében észlelhető, itt a gátlási zóna 4,2-4,3 mm körüli érték (3. ábra). Kisebb gátlás figyelhető meg a B-7 törzsnél: 3,6 mm, az SRj 102.2.2 esetében 3,3 mm, a B-33, B-8 és B-34 baktériumtörzseknél a legkisebb a gátlás: rendre 2,8, 2,5 és 2,3 mm a gátlási zóna.



3. ábra

*Tejsavbaktériumok gátlási zónájának mértéke
a Salmonella enteritidis patogén baktériummal szemben (mm-ben kifejezve)*

A bakteriosztatikus hatás mibenlétének megismerésére a gátlást kifejtő baktériumok által extracellulárisan termelt fehérjék hőkezelésével megbizonyosodtunk arról, hogy a gátlást fehérje-természetű anyag okozza, mivel a gátlás megszűnik miután hőkezeljük a mintákat.

Emődon arra a következtetésre jutottunk, hogy a gátlást valamilyen fehérje-jellegű bakteriocin okozhatta.

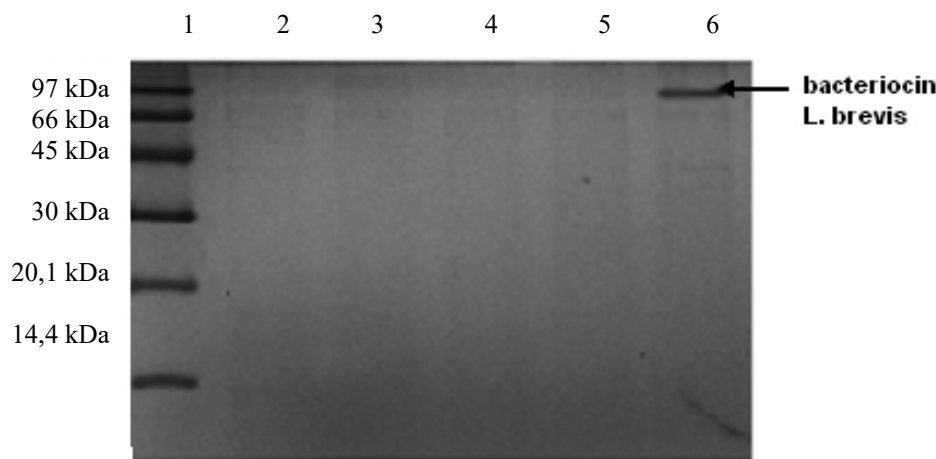
3.2. Bakteriocinek azonosítása molekulatömeg alapján

A bakteriocinek olyan fehérjeszerű (peptid) bakteriális termékek, amelyek bakteriosztatikus tulajdonsággal rendelkeznek. A bakteriocinek a riboszómákban szintetizálódnak, majd kikerülnek az extracelluláris térbe. Egyes tejsavbaktériumok által termelt bakteriocinokat élelmiszerekben is felhasználnak bio-tartósítószerként. A lantibiotikumok kis molekulatömegű peptidek (<5 kDa, I. bakteriocin csoport), egyesek közülük nagyon stabilak magas hőmérsékleten is [6,7,8].

A legismertebb tejsavbaktériumok által termelt bakteriocin a nizin, amely egy 34 aminosavból álló peptid. A nizin magas (90-100°C) hőmérsékleten is stabil. A nizin vegetatív sejtekkel szembeni antimikrobás hatása abban áll, hogy a citoplazma membránba beépülve azon pórusokat hoz létre, amelyeken keresztül kiegyenlítődik a membrán potenciál felépítésében szerepet játszó ionok koncentrációja.

A tejsav baktériumok által termelt bakteriocinek peptid- vagy fehérje-szerkezetűek bakteriosztatikus hatással. A bakteriocinek nagyrésze nem denaturálódik, nem veszít funkciójából 90-100°C hőmérsékleten sem. Az I. és II. bakteriocin csoportba tartozó peptidek 10 kDa-nál kisebb molekulatömegűek, míg a III. és IV. bakteriocin csoportba tartozó tagok fehérjék vagy fehérjekomplexek nagy molekulatömeggel [5,7]. A 10 napos folyékony tejsav baktérium-tenyészeteket lecentrifugálva a kapott felülúszót analizáltuk poliakrilamid gélelektroforézis során (SDS-PAGE).

A kapott gél fényképén (4. ábra) látható az, hogy a Szj 102.1. minta esetén a 97 kDa-os molekulatömeg-markerrel megközelítőleg egyvonalban megjelenik egy sáv. Az Szj 102.1. baktériumtörzs mint *Lactobacillus brevis* volt azonosítva. *Gautam és Sharma* (2009) *Lactobacillus brevis* tenyészetének felülúszójából izolált 93,74 kDa molekulatömegű bakteriocin [4], amely a III.-as bakteriocin (hőre érzékeny és 30 kDa-nál nagyobb molekulatömegű) családból származhat.



4. ábra

Poliakrilamid-gélelektroforézis gélképe - bakteriocin jelenlétének vizsgálata.

1. – molekulatömeg marker (Amersham), 2. – felülúszó B-34, 3. – felülúszó SRj102.2.2.,
4. – felülúszó SRj104.2., 5. – felülúszó SGt102.2.2., 6. – felülúszó Szj102.1.

Végső következtetésként elmondhatjuk, hogy mivel a tejsav baktériumok savanyító képessége elsőrendű szempont a fermentált élelmiszerek előállítása és tartósítási folyamata során, valamint a bakteriocinek termelése ráadásul gátló hatással van a nemkívánatos baktériumok elszaporodására, így a vizsgált tejsavbaktérium törzsek felhasználhatóak az elkövetkezőkben fermentált élelmiszerek eltarthatóságának növelésében. Ez az elképzelés összhangban van a megváltozott fogyasztói elvárásokkal, ugyanis egyre inkább a természetesebb állapotú, kevesebb kémiai tartósítószerrel tartalmazó termékeket igénylik a fogyasztók.

4. BIBLIOGRÁFIA

- [1]. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 2002. April, May. Guidelines for evaluation of probiotics in food.
- [2]. Both E., Bodor Zs., Lányi Sz., Ábrahám B., „Effect of microencapsulation on viability and survival in simulated gut conditions of probiotic bacteria”, University Politehnica of Bucharest, Scientific Bulletin Series B: Chemistry and Materials Science, 2012, 74/1, 27-32.
- [3]. Both, E., György, É., Ábrahám, B., Lányi, Sz., „Beneficial effects of probiotic microorganisms. A review”, in Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria, 2011, 4, 44-58.
- [4]. N. Gautam, N. Sharma, „Purification and characterization of bacteriocin produced by strain *Lactobacillus brevis* MTCC 7539”, in Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2009, 46, 337-341.
- [5]. G. Moll, W. Konings, A. Driessen, „Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation”, in Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76, 185-198.
- [6]. N. Sivakumar, R. Saif, A. Saif, „Partial Characterization of Bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*”, in Brazilian Archives of Biology and Tehnology, 2010, 53, 1174-1184.
- [7]. K. Szekér, „Tejsavbaktériumok és élelmiszer-eredetű romlás- és kórokozó baktériumok versengő kölcsönhatásának vizsgálata”- doktori tézis, 2007, 1-112.
- [8]. S. K. Raja Namasivayam, J. Ceely Rebaca Angel, R. S. Arvind Bharani, M. Y. Karthik, „Effect of media on bacteriocin production by *Lactobacillus brevis* and evaluation of anti-bacterial activity”, in Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2014, 5/5, 1129-1136.
- [9]. J. R. Tagg, A.S. Dajani, L.W. Wannamaker, „Bacteriocins of gram-positive bacteria”, in Bacteriological Reviews, 1976, 40/3, 722-756.
- [10]. C. Vanderpool, F. Yan, D. B. Polk, „Mechanisms of Probiotic Action: Implications for Therapeutic Applications in Inflammatory Bowel Diseases”, in Inflamm Bowel Dis, 14/11, 2008, 1585-1592.