

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Csibrikné Németh Edina

**PROBIOTIKUS ÉLELMISZER ELŐÁLLÍTÁSÁRA
ALKALMAS TEJSAVBAKTÉRIUMOK
HATÉKONYSÁGÁNAK ÉS
HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA**

Témavezető:

Dr. Halász Anna

Tudományos tanácsadó

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

Napjainkban egyre nő az igény arra vonatkozólag, hogy az élelmiszerekben alkalmazott kémiai adalékanyagok mennyiségét lecsökkentsék. A tejsavbaktériumokat már régóta használják tejtermékek, húsok és zöldségfélék tartósításához, mivel a tejsavbaktériumok által termelt anyagcseretermékek (tejsav, ecetsav, hidrogén-peroxid, bakteriocin stb.) visszaszorítják ill. megakadályozzák egyes kórokozó-és patogén mikroorganizmusok növekedését a fermentáció során. Ugyanakkor táplálkozási szempontból fontos elvárás, hogy a fermentált termékek a tárolás során is megőrizzék biológiai értéküket és kedvező élettani tulajdonságokkal rendelkezzenek.

A szervezet állapotát jótékonyan befolyásoló probiotikumok főként tejsavbaktériumokat és bifidobaktériumokat tartalmaznak. A legismertebb probiotikus tejsavbaktérium törzsek a *Lactobacillus* nemzetséghez tartoznak. A probiotikumok többek között azáltal fejtik ki pozitív hatásukat a szervezetre, hogy a bélmucosa epithel-sejtjein lévő receptorokhoz tapadva növelik a bél védelmi funkcióját, versenyeznek a patogén baktériumokkal a baktériumok megtapadásához szükséges receptorokért, aktiválják a mucosalis immunrendszert és szabályozzák annak cytokintermelését. Néhány tejsavbaktérium törzs módosítja a patogén baktériumok által a bél epithel-sejtjeiben kiváltott cytokintermelést, ezáltal hatékonyak egyes gyulladásos bélbetegségek megelőzésében és kezelésében. A tejsavbaktériumok anyagcseretermékei a bél epithel-sejtjeiben védő fehérjék (hősokk fehérjék) termelését idézik elő, melyek megakadályozhatják a káros baktériumok további bejutását a sejtekbe.

Az a tény, hogy a nem kolonizáló probiotikumok is képesek mérsékelni az enteropatogén baktériumok okozta sejtkárosodásokat, arra enged következtetni, hogy a hatásban egyéb mechanizmusok és antimikrobás vegyületek is szerepet játszanak. Ilyenek a

tejsavbaktériumok anyagcseretermékei, melyek lokális koncentrációja a bélcsatornában nagymértékben megnőhet.

A tejsavbaktériumok anyagcseretermékei közül a hidrogén-peroxid különös jelentőséggel bír. A hidrogén-peroxid okozta oxidatív-stressz a bélcsatornában megváltoztatja az epithel-sejtek áteresztőképességét, gyulladásszerű cytokinek termelését idézi elő és súlyos esetben sejthalálhoz vezethet.

Sajtokból izolált ún. nem-starter tejsavbaktériumoknak a tejtermékre kifejtett hatása széles körben ismert, azonban a fogyasztó egészségéhez való viszonyuk már kevésbé tanulmányozott. Annak érdekében, hogy a nem-starter tejsavbaktériumoknak egyes lehetséges probiotikus tulajdonságát mélyebben megismerjük és alkalmazhatósági lehetőségüket az élelmiszeriparban kibővítsük, a doktori munkámban az alábbi célokat tűztem ki:

- I. Céklalé fermentálhatóságának a vizsgálata korábbi előszelekció alapján (kis biogén amin termelés, kórokozó baktériumok növekedésének gátlása) kiválasztott három nem-starter tejsavbaktériummal (*Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2756 és *Lactobacillus curvatus* 2775) annak érdekében, hogy a fermentált termék magas élő csíraszámmal rendelkezzen és hosszan eltartható legyen hőkezelés nélkül. A tejsavbaktériumokkal szemben elvárás volt:
 - gyors savtermelő képességgel rendelkezzenek, és kevés hidrogén-peroxidot termeljenek.
 - anyagcseretermékeik hatékonyan gátolják a humán enteropatogén *Salmonella enteritidis* 857 növekedését.

- II. A három nem-starter tejsavbaktérium lehetséges probiotikus tulajdonságainak vizsgálata in vitro vékonybél hámsejteken. A kísérletek során a tejsavbaktériumok

immunrendszerre gyakorolt hatását, anyagcseretermékeik *Salmonella enteritidis* 857 fertőzéssel szembeni lehetséges védő mechanizmusát, a tejsavbaktériumok bélhámsejtekhez való kitapadását és egyes anyagcseretermékeik - különösen a hidrogén-peroxid - hatását tanulmányoztuk vékonybél epithel-sejteken.

- Nem-starter- és két probiotikus tejsavbaktérium (*Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus plantarum* 299v) és *Salmonella enteritidis* 857 hatásának vizsgálata Caco-2 sejtek interleukin-8 termelésére, továbbá a tejsavbaktériumok folyékony tenyészetének sejtmentes szűrlésével előkezelt *Salmonella enteritidis* 857 hatása Caco-2 sejtek interleukin-8 termelésére vonatkozólag. Probiotikus tejsavbaktériumok lehetséges védő mechanizmusának feltárása *Salmonella enteritidis* 857 fertőzéssel szemben.
- Nem-starter tejsavbaktériumok és folyékony tenyészetük sejtmentes szűrlésével előkezelt *Salmonella enteritidis* 857 befolyása Caco-2 sejtek hősokk fehérje 70 (Hsp70=70 kDa) termelésére.
- Nem-starter- és probiotikus tejsavbaktériumok tapadásának vizsgálata Caco-2 sejtekhez.
- A tejsavbaktériumok egyes anyagcseretermékeinek vizsgálata az epithel-sejtek életképességére vonatkozólag. A hidrogén-peroxid hatása a vékonybél hámsejtek interleukin-8 termelésre, a sejtmembrán átjárhatóságra és a sejthalálra.

II. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS BERENDEZÉSEK

Munkám során az alábbi vizsgálati módszereket és berendezéseket alkalmaztam.

A tejsavbaktériumok céklalén történő szaporodását **lemezöntéssel** követtem nyomon, míg a savtermelő képességüket **pH méréssel** igazoltam. A tejsav meghatározását **DL tejsavteszt** segítségével (Boehringer Mannheim/R-Biopharm) végeztem, a hidrogén-peroxid mennyiségét **kolorimetriásan** 400 nm-en határoztam meg.

A tejsavbaktériumok folyékony tenyészetének sejtmentes szűrletét az *Salmonella enteritidis* 857 növekedésére vonatkozólag **agar-diffúziós** módszerrel teszteltem.

A vizsgálatok során in vitro human vastagbél adenocarcinoma sejtvonalakat - Caco-2 és Caco-2 P - alkalmaztam, amelyek mind szerkezetileg mind működésükben teljes hasonlóságot mutatnak a vékonybél epithel-sejteihez.

A kísérletek során alkalmazott különböző kezelések (nem-starter- és probiotikus tejsavbaktériumok, *Salmonella enteritidis* 857 és tejsavbaktériumok folyékony tenyészetének sejtmentes szűrletével kezelt *Salmonella enteritidis* 857) hatását Caco-2 sejtek interleukin-8 termelésére **ELISA** módszerrel (ELISA teszt, Biosource) tanulmányoztam. A nem-starter tejsavbaktériumok és folyékony tenyészetük sejtmentes szűrletével kezelt *Salmonella enteritidis* 857 hatását Caco-2 sejtek Hsp70 termelésére **Western blottal** vizsgáltam.

A tejsavbaktériumok Caco-2 sejtekhez történő adhéziós képességének a meghatározásához **Gram-festést** követő baktériumszámlálást ill. **lemezöntést** használtam.

A Caco-2 P sejtek hidrogén-peroxiddal történő kezelése során a sejtek által termelt interleukin-8 mennyiségét a fentiekhez hasonlóan **ELISA** módszerrel határoztam meg. A Caco-2 P sejtekben a nekrozist **fluoreszcens DAPI** festéssel, míg az apoptózist a **kaszpáz-3 enzim** aktivitás méréssel és **fluoreszcens Annexin V-DAPI** festéssel követtem nyomon. A

Caco-2 P sejtekben a hidrogén-peroxid hatására bekövetkezett morfológiai változásokat **pásztázó elektronmikroszkóppal** vizsgáltam.

A Caco-2 P sejtek membránjának az átteresztőképességéről a transzepithelialis elektromos rezisztencia mérése ad információt, melynek méréséhez **Millicell-ERS Volt/Ohm métert** használtam.

A tejsavbaktériumok egyéb specifikus anyagcseretermékeinek a vizsgálata Caco-2 P sejtek életképességére vonatkozólag **Giemsa festést** követően, **spektrofotometriásan** történt.

A statisztikai elemzést **Minitab 13** szoftver (State College PA) segítségével végeztem.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- III.1 Igazoltam, hogy korábbi előszelekció alapján (kis biogén amin termelés, kórokozó baktériumok növekedésének gátlása) kiválasztott három nem-starter tejsavbaktérium (*Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2756 és *Lactobacillus curvatus* 2775) jól szaporodott céklalén, gyors savtermelő képességű volt, kevés hidrogén-peroxidot termelt (<0.04 mM) és folyékony tenyészetük sejtmentes felülúszója hatékonyan gátolta a *Salmonella enteritidis* 857 növekedését. A fermentált, nem-hőkezelt céklalében 2×10^6 - 10^8 CFU/ml tejsavbaktérium volt jelen 28 napos tárolás után.
- III.2 Megállapítottam, hogy a vizsgált nem-starter- és probiotikus tejsavbaktériumok (*Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus plantarum* 299v) interleukin-8 termelődést váltottak ki kripta- és villus-jellegű Caco-2 sejtekben egyaránt, de a termelődött interleukin-8 mennyisége szignifikánsan kevesebb volt, mint a *Salmonella enteritidis* 857 által előidézett interleukin-8 mennyiség.
- III.3 Bebizonyítottam, hogy a probiotikus tejsavbaktériumok nem csökkentették le a *Salmonella enteritidis* 857 által kripta- és villus-jellegű sejtekben előidézett interleukin-8 termelést, azonban a nem-starter- és probiotikus tejsavbaktériumok folyékony tenyészetének sejtmentes szűrletével előkezelt *Salmonella enteritidis* 857 hatására a kripta- és villus-jellegű Caco-2 sejtekben szignifikánsan kevesebb interleukin-8 termelődött, mint a kezeletlen *Salmonella enteritidis* 857 hatására.

III.4 Igazoltam, hogy a nem-starter tejsavbaktériumok és folyékony tenyészetük sejtmentes szűrletével előkezelt *Salmonella enteritidis* 857 hatása kripta- és villus-jellegű Caco-2 sejtekben Hsp70 termelődött.

III.5 Megállapítottam, hogy a nem-starter- és probiotikus tejsavbaktériumok egyaránt gyenge adhéziós képességet mutattak kripta- és villus-jellegű Caco-2 sejtekhez (< 1% - telepszámlálással és < 6% - Gram-festést követő baktériumszámlálással).

III.6 Kimutattam, hogy a membránon-tenyésztett Caco-2 P sejtek kevésbé voltak érzékenyek a hidrogén-peroxidos kezelésre, mint a nem-membránon tenyésztettek. 1 mM hidrogén-peroxid a nem-membránon tenyésztett Caco-2 P sejtek maximális interleukin-8 termelését idézte elő, ugyanakkor a membránon-tenyésztett sejtek esetében 10 mM hidrogén-peroxid mind apikálisan mind bazolaterálisan maximális interleukin-8 termelést eredményezett 24 órával a kezelés után. 40 mM hidrogén-peroxid a membránon-tenyésztett sejtek transzepithelialis rezisztenciájának szignifikáns csökkenését idézte elő.

Nem-membránon tenyésztett Caco-2 P sejtek esetében 1 mM hidrogén-peroxid-os kezelés ún. „késői” nekrozist okozott, míg membránon-tenyésztett sejtek esetében 40 mM hidrogén-peroxidos kezelés okozta a sejtek ún. „korai” nekrozisát.

A Na-acetát és Na DL-laktát Caco-2 P sejtek osztódását 50 %-ban gátló koncentrációja (85.8 mM és 84.4 mM) magasabb volt mint a hidrogén-peroxidé (1-2 mM), továbbá nem befolyásolták a hidrogén-peroxid kedvezőtlen hatását a sejtosztódásra vonatkozólag, azonban Na-piruvát semlegesítette azt.

IV. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

A nem-starter tejsavbaktériumok zöldségalapú fermentáció megvalósításában mutatott pozitív eredményei arra engednek következtetni, hogy az élelmiszeripari alkalmazhatósági körük a tejtermékeken kívül is indokolt. A nem-starter tejsavbaktériumoknak az emberi szervezetre kifejtett hatásmechanizmusuk további részletes vizsgálata után potenciális probiotikumává válhatnak és új terápiás készítmények hatóanyagául szolgálhatnak pl. egyes gyulladósos bélbetegségek kezelésében.

V. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Cikkek:

1. Baráth, Á., Halász, A., Németh, E. and Zalán, Zs. Selection of LAB strains for fermented red beet juice production, *European Food Research and Technology*, 2004, 218(2): 184-187. IF: 1.084
2. Zalán, Zs., Németh, E., Baráth, Á. and Halász, A. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains, *Food Technology and Biotechnology*, 2005, 43(3): 219-225. IF: 0.663
3. Németh, E., Fajdiga, S., Malago, J., Koninkx, J., Tooten, P. and Van Dijk, J. Inhibition of Salmonella-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp 70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli, *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 112(3): 266-274. IF: 2.499 (2005)
4. Németh E., Halász, A., Baráth, Á., Domokos, M. and Gálfí, P. Effect of hydrogen peroxide on interleukin-8 synthesis and death of Caco-2 cells, In press, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2007, 29(2): IF:0.557 (2005)
5. Németh, E., Halász, A., Baráth, Á. and Gálfí, P. Influence of lactic acid bacteria and their spent culture supernatant on hydrogen peroxide-induced interleukin-8 synthesis and necrosis of Caco-2 cells, Accepted, *Food and Agricultural Immunology*, 2007. IF: 0.385 (2005)
6. Malago, J., Németh, E., Koninkx, J., Tooten, P., Hendriks, H., and Van Dijk, J. Microbial products from *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus plantarum* 299v inhibit Salmonella-induced IL-8 synthesis and induce expression of heat shock protein 70 in enterocyte-like Caco-2 cells, Submitted to *Cell stress and Chaperones*, 2007. IF: 2.875 (2005)

Poszterek:

1. Németh, E., Koninkx, J. and Malago, J. Investigation of the role of lactobacilli in the strengthening of gut barrier function, *9th International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy*, 18-21 Apr. 2004, Budapest, Hungary.
2. Németh, E., Koninkx, J. and Malago, J. Investigation of the immune stimulative effect of lactobacilli and their spent culture supernatant, *2nd Central European Congress of Food*, 26-28 Apr. 2004, Budapest, Hungary.
3. Németh, E., Halász, A. and Baráth, Á. Production of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria as influenced by the media used for propagation of cells, *19th International ICFMH Symposium Food Micro*, 12-16 Sept. 2004, Portoroz, Slovenia.
4. Németh, E., Fajdiga, S., Malago, J., Tooten, P., Hendriks, H. and van Dijk, J. Inhibition of Salmonella- induced IL-8 synthesis and expression of Hsp 70 in enterocyte- like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli, *19th International ICFMH Symposium Food Micro*, 12-16 Sept. 2004, Portoroz, Slovenia.
5. Németh, E., Halász, A., Gálfi, P. and Baráth, Á. Investigation of the effect of lactic acid bacteria on Caco-2 cells, *The SAFE Consortium International Congress on Food Safety*, 11-14 Jun. 2006, Budapest, Hungary.

Magyar nyelvű előadások:

1. Németh, E., Koninkx, J. and Malago, J. A tejsavbaktériumok mikrobiális termékei gátolják a Salmonella által indukált interleukin-8 szintézist és hősokkfehérje 70 termelést idéznek elő Caco-2 sejtekben, *Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Scientific Symposium*, 6-7 Nov. 2003, Budapest, Hungary.
2. Németh, E., Gálfi, P., Halász, A. and Baráth, Á. A hidrogén-peroxid hatásának vizsgálata Caco-2 sejteken. *Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly Scientific Symposium*, 19-20 Oct. 2005, Budapest, Hungary.

3. Németh, E., Gálfi, P. and Koninkx, J. Tejsavbaktériumok hatása Caco-2 sejtekre, *SZIE, ÁOTK, Akadémiai Beszámolók*, 22-25 Jan. 2007, Budapest, Hungary.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Adányi, N., Németh, E., Halász, A., Szendrő, I. and Váradí, M. Application of electrochemical optical waveguide lightmode spectroscopy for studying the effect of different stress factors on lactic acid bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 573-574: 41-47. IF: 2.760
2. Halász, A., Baráth, Á., Németh, E., Zalán, Zs., and Lásztity, R. Új irányzatok a tejsavbaktérium szelekcióban. *Sütőiparosok, Pékek*, 2006, LIII. évf. 3.szám: 7-8.