

# Fermentumok hatásvizsgálata

GINOP\_PLUSZ-2.1.1-21-2022-00189

*(Pulykahibridek megbetegedésének csökkentése új  
takarmánytermék család kutatás-fejlesztésével)*

**Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba**  
**Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék**  
**Természettudományi és Informatikai Kar**  
**Szegedi Tudományegyetem**

**Szeged, 2025. 06. 02.**



# MIKROBIOLÓGIAI TESZTEK



## Partnertől kapott kísérleti fermentációk paramétere

	<b>Búza őrlemény</b>	<b>Szójadara</b>	<b>Dextróz</b>	<b>Kukorica dara</b>	<b>Árpa őrlemény</b>	<b>Élesztő</b>	<b>NaCl</b>
<b>Táptalaj 1</b>	60	18	2	0	20	0	0
<b>Táptalaj 2</b>	20	27	3	50	0	0	0
<b>Táptalaj 3</b>	10	20	0	0	50	19,5	0,5
<b>Táptalaj 4</b>	0	50	2	10	0	37,5	0,5

<b>Jel</b>	<b>Fermentáció hőmérséklete °C</b>	<b>Fermentáció ideje (óra)</b>	<b>Táptalaj típus</b>	<b>Táptalaj mennyiség (%)</b>	<b><i>Lactobacillus</i> kultúra (%)</b>	<b>Víz (%)</b>
<b>L</b>	32	24	1	0,5	0,25	99,25
<b>M</b>	35	72	2	0,5	0,25	99,25
<b>N</b>	37	96	3	0,5	0,5	99,0
<b>O</b>	35	96	4	1,0	0,5	98,5
<b>P</b>	30	96	4	1,0	1,0	98,0
<b>Q</b>	35	72	4	10,0	1,0	89,0
<b>R</b>	35	96	4	20,0	1,0	79,0

# Mikrobiológiai tesztek

## A tesztek során vizsgált mikrobiológiai paraméterek

- összes gombaszám (CFU/ml)
- kóliformok (CFU/ml)
- szulfátredukáló *Clostridium* (CFU/ml)
- *Salmonella*
- mezofil aerob összes élőcsíra (CFU/ml)



## 12. melléklet a 65/2012. (VII. 4.) VM rendelethez

### Takarmányok mikrobiológiai határértékei

M = tolerancia határérték  
(az „M” értéket meghaladó csíramennyiség nem elfogadható!)

1. Kórokozó mikroorganizmusok	Referenciamódszer	M
Salmonella spp.	MSZ EN ISO 6579*	0/25 g
2. Technológiai higiéniai körülményeket jellemző mikroorganizmusok	Referenciamódszer	M
E. coli	MSZ ISO 16649-2*	10 <sup>2</sup> /g
(kivéve a hőkezelt takarmányokat)		

Clostridium perfringens	MSZ EN ISO 7937*	10 <sup>2</sup> /g
(csak hőkezelt takarmányokban)		
3. Környezeti eredetű szennyeződést jelző mikroorganizmusok	Referenciamódszer	M
Mezofil aerob mikrobaszám	MSZ EN ISO 4833*	10 <sup>6</sup> /g
csak granulált takarmányokban (a probiotikumot tartalmazó készítmények és takarmányok nem vizsgálandók)		
Enterobacteriaceae sp.	MSZ ISO 21528-2*	10 <sup>3</sup> /g
(csak hőkezelt takarmányok esetében)		

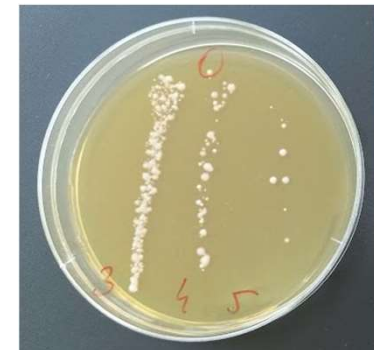
\*: a szabvány legújabb kiadása

## Fermentáló baktériumok izolálása és molekuláris azonosítása

- A tenyésztési és izolálási körülményeket úgy alakítottuk ki, hogy előnyben részesítsék azokat a baktériumokat, amelyek feltehetően szerepet játszottak a fermentációs folyamatokban.
- A kiválasztott izolátumokból tisztatenyészeteket állítottunk elő, amelyekből DNS-izolálás történt további molekuláris vizsgálatokhoz..
- A fajszerű azonosítást a 16S rRNS gén PCR-alapú amplifikációjával végeztük, specifikus primerek alkalmazásával. Az amplifikált szakaszok szekvenciáit összevetettük a GenBank adatbázisában szereplő referencia-szekvenciákkal, szekvenciahomológia-elemzés révén.

Három domináns baktériumot izoláltunk és azonosítottunk:

- ***Leuconostoc lactis***
- ***Lacticaseibacillus (Lactobacillus) rhamnosus***
- ***Lacticaseibacillus (Lactobacillus) paracasei***



- Ezek a fajok jól ismert fermentációs aktivitással rendelkeznek, és fontos szereplői lehetnek a célzott mikrobiális közösségek kialakításának.

## **Leuconostoc lactis – Jellemzés és jelentőség**

### **Morfológiai és fiziológiai jellemzők:**

Gram-pozitív, fakultatív anaerob, nem spóráképző, kokkoid vagy rövid pálcika alakú baktérium.  
Optimális növekedési hőmérséklet: 20–30 °C.

### **Anyagcseretípus:**

Heterofermentatív tejsavbaktérium – a glükózt tejsavvá, etanollá/acetáttá és CO<sub>2</sub>-vé fermentálja.

### **Előfordulás:**

Számos fermentált élelmiszerből (pl. savanyított zöldségek, tejtermékek) izolálható; a természetes fermentációk gyakori és jelentős szereplője.

### **Biotechnológiai jelentőség:**

Savanyítási folyamatokban íz- és aromaanyagokat (pl. diacetilt) termel.  
Antimikrobiális anyagokat (pl. bakteriocineket) is képes előállítani.  
Fontos szerepe van mikrobiális konzorciumok tagjaként a fermentációs dinamika irányításában.

## **Lacticaseibacillus (Lactobacillus) rhamnosus – Jellemzés és jelentőség**

### **Morfológiai és fiziológiai jellemzők:**

Gram-pozitív, nem spóráképző, fakultatív anaerob pálcika. Optimális növekedési hőmérséklet: 37 °C körül. Kiváló sav- és epesó-tűrőképesség jellemzi.

### **Anyagcsere:**

Homofermentatív tejsavtermelő: a glükóz főként L(+)-tejsavvá alakul. Stabil fermentációs környezetet biztosít.

### **Előfordulás:**

Az emberi bél mikrobiom természetes tagja. Gyakori a fermentált élelmiszerekben és probiotikus készítményekben.

### **Biotechnológiai jelentőség:**

Kiemelkedő probiotikus törzsei (pl. *L. rhamnosus* GG) bizonyítottan jótékony hatásúak az emésztőrendszer egészségére.

Gátolja a patogének megtelepedését, támogatja a nyálkahártya immunitást.

Élelmiszeripari fermentációkban stabilizálja a mikrobiális közösségeket.

## **Lacticaseibacillus (Lactobacillus) paracasei – Jellemzés és jelentőség**

### **Morfológiai és fiziológiai jellemzők:**

Gram-pozitív, nem spórás, pálcika alakú, fakultatív anaerob baktérium. Optimális növekedési hőmérséklet: 30–40 °C..

### **Anyagcseretípus:**

Homofermentatív (fakultatív heterofermentatív – szénhidrátokat főként tejsavvá alakít, de képes kisebb mennyiségben ecetsavat, etanolt és CO<sub>2</sub>-t is termelni).

### **Előfordulás:**

Fermentált tej- és növényi eredetű élelmiszerekben gyakori.

Előfordul a humán béltraktusban is, bizonyos törzsei probiotikusak.

### **Biotechnológiai jelentőség:**

Használják fermentált tejtermékek és savanyított zöldségek előállításánál.

Stabilizálja a fermentációs folyamatokat, javítja az ízprofilt.

Probiotikus törzsei hozzájárulhatnak a bélflóra egyensúlyához, immunmoduláló hatással bírhatnak.

## Fermentumokból izolált domináns fajok élettani jelentősége

### ***Leuconostoc lactis***

A *L. lactis* termelte glükózil-transzferáz enzim lehetővé teszi különféle oligoszacharidok és glükó-oligoszacharidok bioszintézisét. Az így képződött oligoszacharidokról kimutatták, hogy erőteljes immunstimuláns hatásúak: növelik több jelentős immunválasz faktor – például a foszforilált P38, ERK1/2 és JNK – szintjét.

### ***Lacticaseibacillus rhamnosus***

A *L. rhamnosus* kiváló nyálkahártyához kötődő képessége révén hatékonyan képes gátolni különféle patogének, például *Salmonella* és *Shigella* fajok megtelepedését. Klinikai vizsgálatok szerint alkalmazása gyermekeknél csökkenti a hasmenés időtartamát és a kórházi eredetű fertőzések kockázatát. Továbbá eredményesen alkalmazható irritábilisbél szindrómában szenvedő betegeknél, valamint *Clostridium difficile* okozta visszatérő colitis kezelésében is

### ***Lacticaseibacillus paracasei***

A *L. paracasei* több törzse enyhíti az allergiás légúti megbetegedések tüneteit, csökkentve az IL-5 szintet. Immunmoduláló hatásuk révén elősegítik az IFN- $\gamma$  és IL-10 termelődését, valamint csökkentik a PM2.5 által kiváltott légúti allergiás reakciókat. Emellett hatékonyan bizonyultak atópiás dermatitisz, hasmenés, *Helicobacter pylori* fertőzés és irritábilisbél szindróma esetén is.

## Fermentumok antimikrobiális hatása

Vizsgált minták: partnertől kapott fermentumok.

Teszt baktériumok:

- *Escherichia coli* SZMC 0582
- *Bacillus subtilis* SZMC 0209
  
- Teszt élesztőgomba:
- *Saccharomyces cerevisiae* SZMC 0644



„R” fermentum hatása a *S. cerevisiae* növekedésére

Eredmény: A baktériumok intenzívebb növekedése nem volt tapasztalható a leoltott fermentumok hatására, tehát alkalmazásuk ilyen kockázatot nem generál. Az „R” fermentum enyhe gátló hatást gyakorolt a *S. cerevisiae* és a *B. subtilis* növekedésére.

## Fermentáló baktériumok és élesztőgombák kölcsönhatása

Teszt mikroorganizmus: izolált *Leuconostoc lactis* törzs.

Szám	Élesztőgomba törzs	Azonosító
1.	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CBS 4688
2.	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CBS 441
3.	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	CBS 684
4.	<i>Debaryomyces vindobonensis</i>	SZMC 26599
5.	<i>Debaryomyces prosopidis</i>	SZMC 26719
6.	<i>Debaryomyces hansenii M8</i>	SZMC 26004
7.	<i>Debaryomyces hansenii III/1</i>	SZMC 26738
8.	<i>Debaryomyces hansenii M19</i>	SZMC 26615
9.	<i>Hansenula anomala</i>	SZMC 0731

Szám	Élesztőgomba törzs	Azonosító
10.	<i>Saccharomyces diastaticus</i>	SZMC 0643
11.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SZMC 0644
12.	<i>Candida zeylanoides M12</i>	SZMC 26608
13.	<i>Candida zeylanoides M33</i>	SZMC 26629
14.	<i>Candida utilis</i>	SZMC 0053
15.	<i>Yarrowia galli III/2</i>	SZMC 26739
16.	<i>Yarrowia divulgata</i>	SZMC 26729
17.	<i>Yarrowia alimentaria</i>	SZMC 26709
18.	<i>Yarrowia galli II/9</i>	SZMC 26730

A *Leuconostoc lactis* csak a *Hansenula anomala* és a *Zygosaccharomyces mellis* törzsek növekedését gátolta. A többi élesztőgomba növekedésére nem gyakorolt hatást.

## Partner által biztosított fermentlevek prebiotikus hatása

A prebiotikumok olyan táplálék-összetevők, amelyek szelektíven serkentik a kedvező élettani hatású mikroorganizmusok – azaz probiotikumok – növekedését és aktivitását a gazdaszervezet bélrendszerében..

Teszt mikroorganizmusok:

- *Leuconostoc citreum*
- *Lactobacillus curvatus*

Módszer: OD<sub>620</sub> mérése mikrotiter lemezen, a 0. és 24 órás inkubációt követő időpontokban.

**Eredmények:**

*L. citreum*: jellemzően neutrális hatás a növekedés vonatkozásában.

*L. curvatus*: kifejezett prebiotikus hatás az „R” fermentum vonatkozásában.

## Fermentumok előállítása laboratóriumi körülmények között

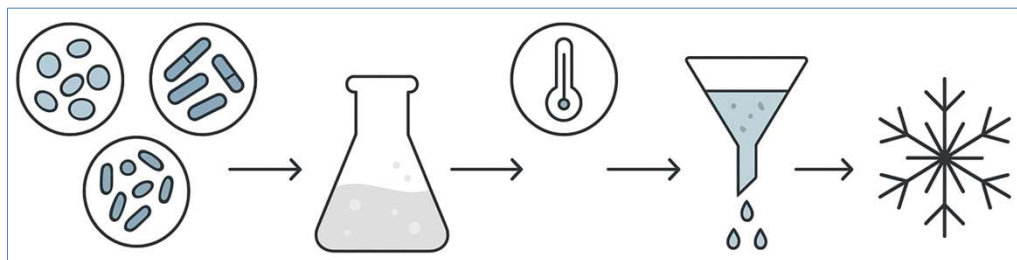
Fermentumokat laboratóriumi körülmények között újra előállítottuk – reprodukálhatóság ellenőrzése.

A fermentációhoz a korábban izolált baktériumtörzseket használtuk fel:

- *Leuconostoc lactis*
- *Lacticaseibacillus rhamnosus*
- *Lacticaseibacillus paracasei*
- 1/3-1/3-1/3 arányú keverék

A fermentációkat a partnertől megkapott paraméterek szerint hajtottuk végre.

Inkubációt követően a fermentleveket sterilre szűrtük, fagyasztva tároltuk (-20 C)..



## Prebiotikus hatás vizsgálata laboratóriumi fermentumokkal

### Teszt mikroorganizmusok:

- *Leuconostoc citreum*
- *Lactobacillus curvatus*
- Mikrotiter lap / OD<sub>620</sub> / 0 és 24 óra.

PREBIOTIKUS HATÁS		
Enyhe	Van	Nincs
<b><i>L. curvatus</i></b>		
	R	L, P, M, P, K
<b><i>L. citreum</i></b>		
N, Q	R, M, L	O, P

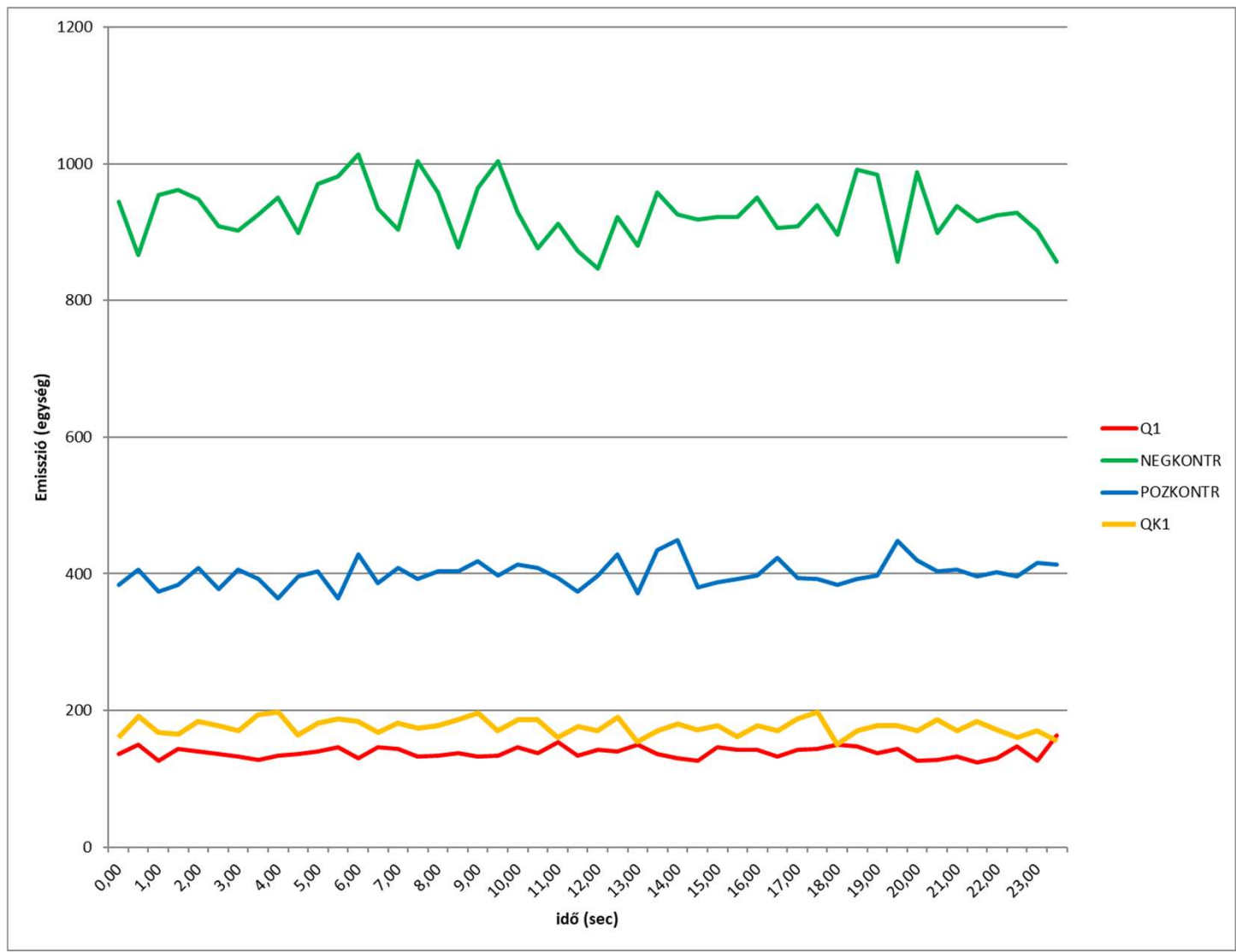
### Eredmények:

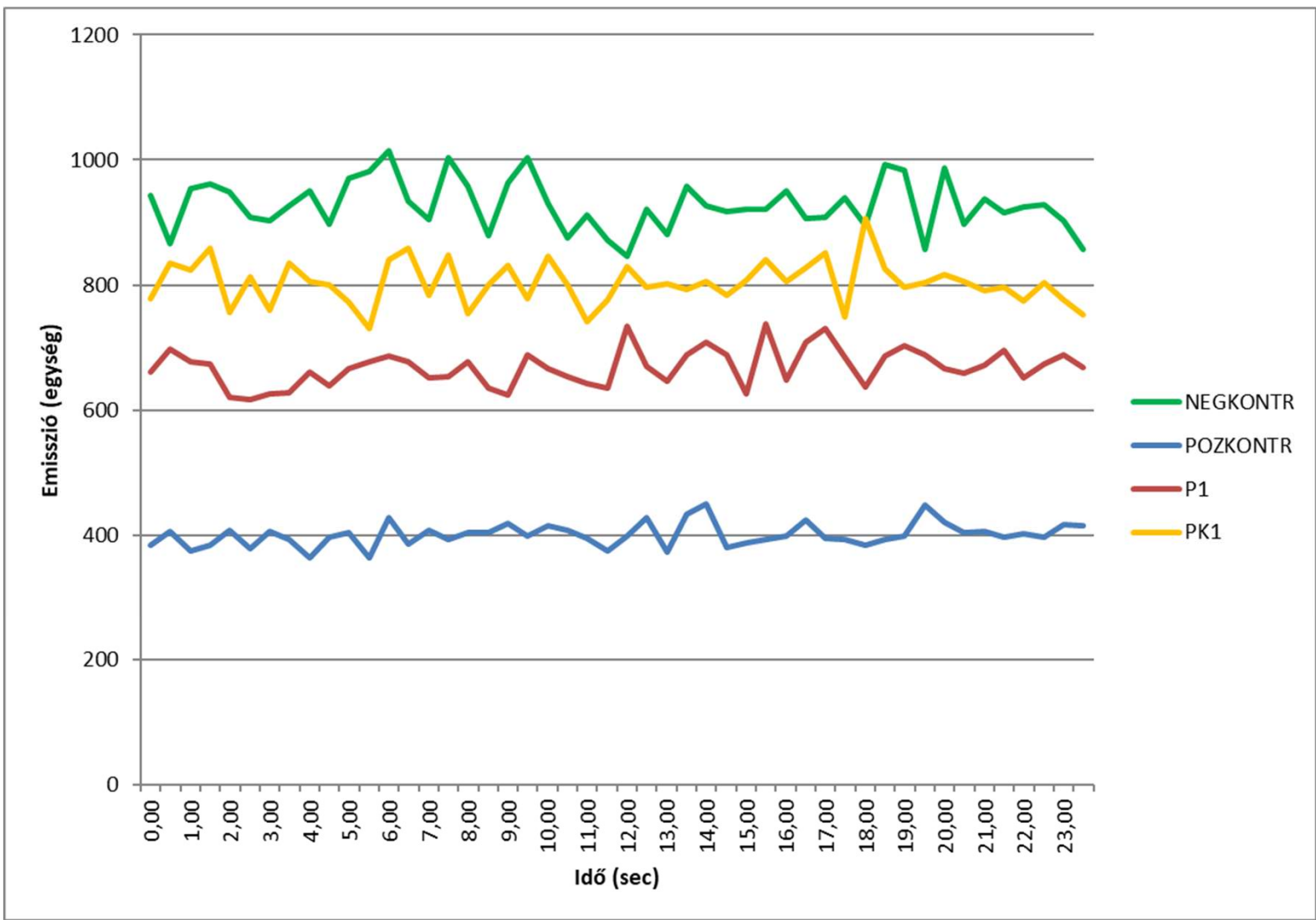
- Az eredmények alapvetően összhangban vannak a partner fermentumainak mérési eredményeivel.
- *L. citreum*: prebiotikus hatás valamivel erősebb, mint a kapott fermentumoknál
- *L. curvatus*: megegyezik a korábbi mérésekkel; kifejezett prebiotikus hatás az „R” fermentum vonatkozásában.

## Bioaktív vegyületek jelenlétének detektálása fermentlevekben

- A kísérletek során laboratóriumi körülmények között előállított fermentleveket alkalmaztunk.
- A bioaktív vegyületek jelenlétét és a fermentáció során bekövetkező mennyiségi változásukat biolumineszcencián alapuló detekciós módszerrel követtük nyomon.
- E célra egy környezeti minták vizsgálatára kifejlesztett rendszert adaptáltunk (*Tox cuvette teszt*, LCK 488), amely fagyasztva szárított lumineszcens baktériumot (*Vibrio fischeri* NRRL-B-11177) tartalmaz.
- A biolumineszcencia gátlásának mértéke alapján megállapítottuk, hogy a fermentáció során képződő bioaktív anyagok mennyisége jelentős mértékben függött a használt fermentációs rendszertől. Több jellegzetes típusú bioaktív fermentlé is azonosításra került.





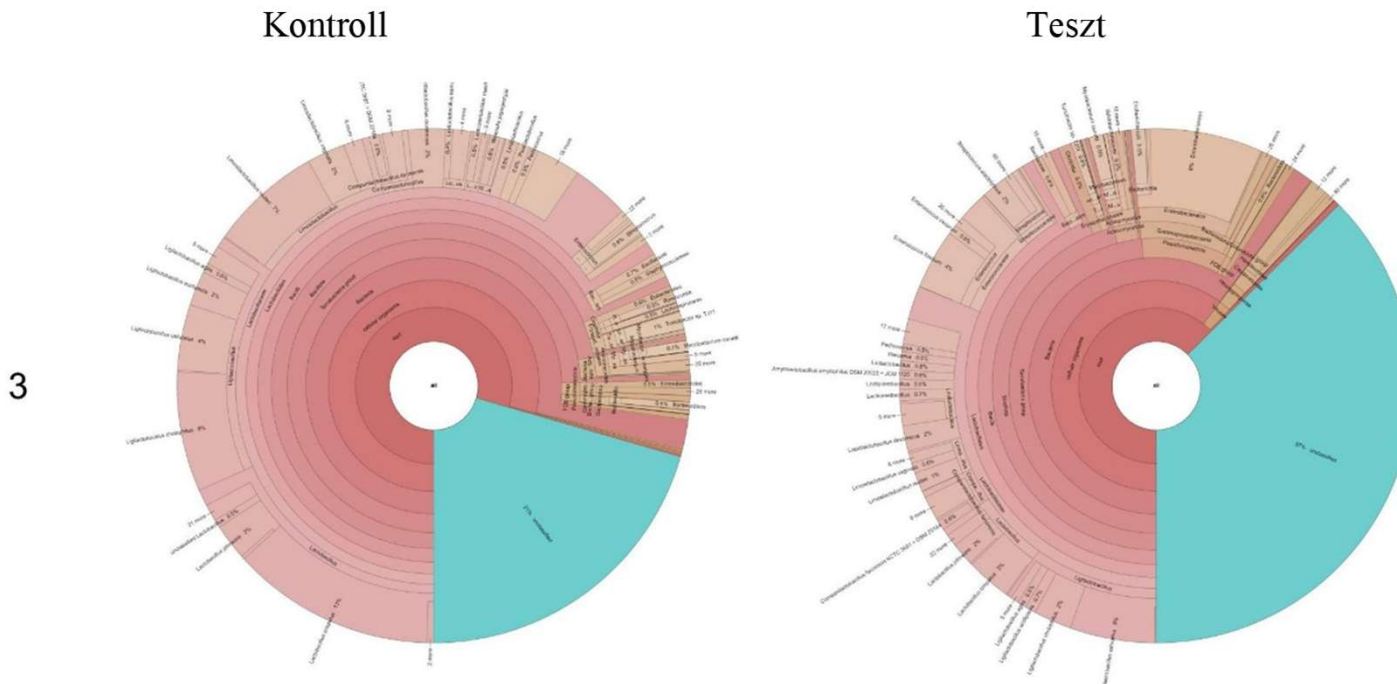




# ÁLLATETETÉSI KÍSÉRLETEK

## Állatetelési kísérletek

- A projekt munkatervének része különböző tápok állatkísérletekben történő tesztelése.
- Metagenomikai vizsgálatokat végeztünk különböző etetési kísérleteket követően a vastagbél mikrobiomra vonatkozóan – nem tapasztaltunk negatív változásokat.



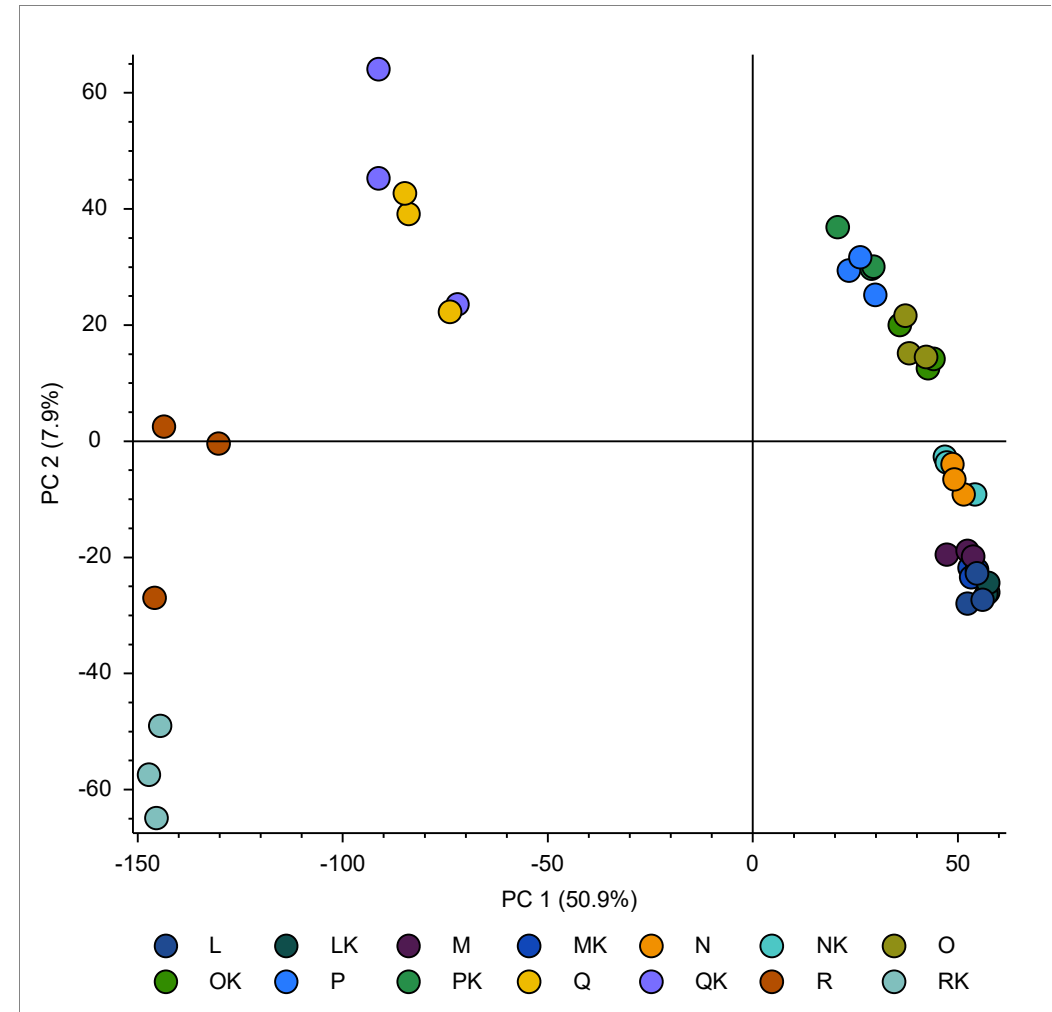
3 minta Metagenomikai elemzése (Krona ábra)



# **ANALITIKAI VIZSGÁLATOK**

## Fermentumok analitikai vizsgálata

- UHPLC-HRMS (*ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*) módszerrel vizsgáltuk a fermentációs kiindulási tápközegek és a kész fermentumok összetételét.
- A fermentáció minden fermentum esetében hatással volt az összetételére.
- A fermentum jellegét elsősorban a kiindulási táptalaj szárazanyag tartalma és a mikrobiális inokulum nagysága befolyásolta.
- A nagy kiindulási szárazanyag tartalmú (10% feletti) és megnövelt mikrobiális inokulummal (1%) induló fermentációs közegek mutatták a legnagyobb változást.
- Jellemzően a hidroxizsírsavak mennyisége mutatott egy nagyságrendnyi növekedést a fermentáció eredményeképpen (főkomponens analízis).



## Hidroxizsírsavak (hidroxilcsoportot tartalmazó zsírsavak – HFA-k)

Különféle biológiai és kémiai folyamatokban játszanak fontos szerepet.

### Sejtmembrán integritása:

A HFA-k a sejtmembránok alkotóelemei, hozzájárulnak azok szerkezetéhez és működéséhez.

### Komplex lipidek építőkövei:

Számos komplex lipid alapját képezik, amelyek többek között a bőrben és különféle szövetekben található meg.

### Gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatások:

Egyes HFA-k, mint például a lipoxin és resolvinek gyulladáscsökkentő és neuroprotektív tulajdonságokkal rendelkeznek.

### Baktericid és daganatellenes hatás:

Bizonyos HFA-k baktericid és daganatellenes aktivitást mutatnak.

## Összefoglalás

- Alkalmazott fermentációs folyamatok értékes biológiai aktivitással rendelkező fermentumokat hoztak létre.
- A kiindulási és fermentációs paramétereikben jelentősen eltérő kísérleti fermentációk lehetővé tették az legoptimálisabb adalékok kiválasztását.
- A fermentumok mikrobiológiai szempontból reprodukálhatóan előállíthatók voltak.
- A fermentációk domináns mikroorganizmusai, illetve a komplex fermentumok különböző kísérleti rendszerekben igazolták kedvező mikrobiológiai sajátosságaikat.
- A kísérleti anyagokon (alapanyagok, fermentumok) végzett tesztek minden esetben a takarmányokra előírt mikrobiológiai minőségnek megfelelő paramétereket rendelkeztek.

**Köszönöm a figyelmet!**