

Kilin Ákos, Urbán Imola, Rezessyné Szabó Judit, Klosz Katalin,  
Nguyen Duc Quang

## Probiotikus *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid szintézisének tanulmányozása

### A szerzők elérhetősége

Kilin Ákos | kutatási munkatárs | levelező szerző  
kilin.akos@stud.uni-mate.hu

Urbán Imola | hallgató  
imolaun@gmail.com

Rezessyné Szabó Judit | egyetemi magántanár  
rezessyne.szabo.judit@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-3465-227X>

Klosz Katalin | egyetemi tanársegéd  
klosz.katalin@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8668-7509>

Nguyen Duc Quang | egyetemi tanár  
nguyen.duc.quang@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-8548-4854>

### A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Biomérnök és Erjedéssipari Tehnológia Tanszék  
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-45.



### Összefoglalás

A kutatómunka során nyolc probiotikus *Lactobacillus* törzs szaporodási tulajdonsága, illetve azok hidrogén-peroxid termelésének nyomonkövetése került meghatározásra. Az ígéretesnek tűnő törzsek termelőképességének fokozása a környezeti tényezők (törzsfenntartáshoz alkalmazott tápközeg megválasztása, aerob szakaszban alkalmazandó hőmérséklet optimalizálása, levegőztetés, valamint a szénhidrát ellátottság) változtatásával történt. A *L. crispatus* LCR01 törzs bizonyult a legjobb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelőnek függetlenül a termelő szakaszban alkalmazott szénhidrát minőségétől. A hidrogén-peroxid szintetizáló képesség alapján ezt a *L. helveticus* R-52, és a *L. fermentum* HA-179 törzsek követték. Az alkalmazott szubsztrátumok közül a maltóz bizonyult a legjobb szénhidrát forrásnak, tenyésztőközegként pedig a LAPTg. A környezeti paramétereket tekintve pedig a 37 °C és rázatott körülmény (250 perc<sup>-1</sup>).

### Bevezetés

Az evolúció során évmilliók alatt az állati és emberi szervezetben milliárdnyi mikroorganizmus telepedett meg. Az emberi mikrobiális közösséget (ökoszisztémát) a nagyszámban egymással kapcsolatban lévő és élő mikroorganizmus hálózat sűrű populációja adja, amely megtalálható az orrban, szájban, torokban, vastagbélben, bőrön, húgycsőben és a vaginában (Goldstein et al., 2015; Crucitti, 2017). A *Lactobacillus* nemzetség az egyik legjelentősebb és legnagyobb fajszámú nemzetsége a tejsavbaktériumoknak. Az élelmiszerek, valamint az emberi és állati szervezetek

**Kulcsszavak:** *Lactobacillus*, hidrogén-peroxid, optimalizálás

természetes, hasznos mikrobiótájának alkotói és ebből adódóan starter és védő kultúráként is alkalmazható. Bizonyított, hogy egyes fajok probiotikus tulajdonsággal is bírnak, ami jótékony hatást fejt ki a humán szervezetre. Ilyen többek között a koleszterinszint csökkentése, gyomor-bél mikrobiótáinak egészségre gyakorolt pozitív hatása a hasmenés kezelése, az allergia elleni rezisztencia kifejlesztése stb. (Crucitti, 2017). Számos *Lactobacillus* fajt alkalmaznak fermentálásra, ami egyedi ízt és aromát kölcsönöz az élelmiszereknek, továbbá tartósításkor ezek a tejsavbaktériumok olyan anyagokat szintetizálnak (alkohol, CO<sub>2</sub>, szerves savak, antimikrobás anyagok stb.), ami a romlást okozó mikrobák, patogének növekedését

gátolja (Kaewnoppa et al., 2013, Kovachev, 2017). A szakirodalomban bőséges információ található a laktobacillusok sav és bakteriocin termeléséről, viszont szűkebb az ismeret a hidrogén-peroxid szintézisükről, noha oxigén jelenlétében a tejsavbaktériumok hidrogén-peroxidot is szintetizálhatnak a flavoprotein-oxidáz, ill. a nikotinamid-adenin-dinukleotid-peroxidáz aktivitásuk által, és mivel kataláz negatívak nem képesek lebontani azt (Zalán et al., 2005; Goldstein et al., 2015). A hidrogén-peroxid antimikrobás hatása jól ismert, ez a vegyület citotoxikus, mivel reaktív gyököket (hidroxil, szuperoxid) generál, melyek erősen oxidatívak. A hidroxil szabadgyökök képzése mellett a hidrogén-peroxid a nyálkahártya-szekréciókban aktiválhatja a laktoperoxidáz-rendszert, mely hatására hipotiocianát-ionok keletkeznek, melyek a legjelentősebb kórokozó baktériumok, vírusok és gombák ellen is hatásosnak bizonyultak (Denev, 2006). Ezért a kutatómunka célja különböző *Lactobacillus* törzsek  $H_2O_2$  szintézisének vizsgálata, amelynek aktualitása, hogy fontos élettani szerepe lehet mind azon testüregekben, ahol az oxigén jelenlétével és a potenciális patogének megtelepedésével számolhatunk.

## Anyagok és módszerek

### Alkalmazott mikroorganizmusok

A kutatómunka során nyolc probiotikus *Lactobacillus* törzs: *Lactobacillus crispatus* LCR01, *Lactobacillus helveticus* R-52, *Lactobacillus fermentum* HA-179, *Lactobacillus reuteri* HA188, *Lactobacillus salivarius* HA118, *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus plantarum* 299V, *Lactobacillus acidophilus* La5 hidrogén-peroxid szintézis nyomónkövetése történt. A törzseket a Probiotal, a Lallemand Health Solutions és a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM, Budapest) biztosította.

### A baktériumok törzsfenntartása

A laktobacillusok tenyésztése 37 °C-on, 24 órás inkubációs idő mellett LAPTg (pepton 15 g/l, tripton 10 g/l, glükóz 10 g/l, élesztőkivonat 10 g/l, tween80 1 ml) vagy MRS (pepton 10 g/l, húskivonat 8 g/l, élesztőkivonat 4 g/l, glükóz 20 g/l, tween80 1 ml,  $K_2HPO_4$  2 g/l, Na-acetát  $\cdot 3H_2O$  5 g/l, triammónium citrát 2 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g/l,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0,05 g/l) táplevesben történt. A fermentáció friss 24 órás kémcsőtenyésztéssel 1 v/v %-nyi mennyiséggel indult.

### A laktobacillusok előszelekciója hidrogén-peroxid szintézis kvalitatív kimutatásával

Friss, 24 órás tenyészetek szélesztése különböző összetételű (LAPTg, MRS) agarral kiegészített szilárd tápközegre. A tápközegre peroxidáz enzim mellett,

kromogén reagensként 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) szolgált, így a zöldeskék elszíneződés detektálhatóvá tette a  $H_2O_2$  termelést (Rabe & Hillier, 2002).

### A hidrogén-peroxid termelés mennyiségi meghatározása

(Villegas & Gilliland, 2006; Zalán et al., 2005 nyomán)

A felszaporított *Lactobacillus* törzseket tartalmazó 40 ml tenyészlezből a sejtek összegyűjtése centrifugálással (10000 rpm, 4 °C, 10 perc) történt. Ezt követte a kinyert biomassa kétszeri átmosása 40-40 ml fiziológiás sóoldattal, majd a sejtek felszuszpendálása 40 ml vizsgálati közegben.

Az alkalmazott vizsgálati közegek: 0,5 M nátrium-foszfat puffer (pH=6,5) valamint 1(m/v)% szénhidrátot tartalmazó pufferolt közegek. A vizsgálatokba bevont szénhidrátok: glükóz, galaktóz, laktóz, maltóz és szacharóz.

Az előállított sejtuszpenziókat különböző környezeti paraméterek között tartva folyamatos mintavételezés mellett meghatározásra került a szintetizált hidrogén-peroxid mennyisége.

A  $H_2O_2$  koncentráció meghatározása során használt peroxidáz enzim módszer lényege, hogy peroxidáz (POD) enzim katalizálja  $H_2O_2$ -ről az elektronok átvitelét a kromogén 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) reagensre. A  $H_2O_2$  mennyiséggel arányos abszorbancia érték 414 nm-en spektrofotométerrel határozható meg (Chin és Cortes, 1982). Az abszorbancia értékek és a hidrogén-peroxid mennyiségek közötti összefüggést az előzetesen felállított kalibrációs egyenes meredekségéből (1,4504) állapítható meg:

$$H_2O_2 \left[ \frac{\mu g}{ml} \right] = \left[ \frac{\text{Abszorbancia}_{[414 \text{ nm}]}}{1,4504} \right] * \text{hígítás}$$

## Eredmények és értékelésük

Az előszelekció során egyértelműen kiderült, hogy a vizsgált törzsek hidrogén-peroxid termelését befolyásolta a törzsfenntartásra alkalmazott tápközeg összetétele. Megállapítható, hogy a LAPTg tápközeg sokkal előnyösebb a hidrogén-peroxid termelés szempontjából, mint az MRS tápközeg. Ennek magyarázata feltételezhetően az, hogy a LAPTg feleannyi glükózt tartalmaz, mint az MRS, ugyanakkor a szerves nitrogén források koncentrációja jelentősen nagyobb és szervesen sókat sem tartalmaz.

Az alkalmazott nyolc probiotikus *Lactobacillus* törzs hidrogén-peroxid kvalitatív kimutatása kromogén reagenst és peroxidáz enzimet tartalmazó LAPTg és MRS szilárd tápközegen történt. Az törzsek tenyésztése

48 órán át 37 °C-on anaerob körülmények között zajlott, majd levegővel való expozíció eredményeként kialakuló zöldes elszíneződés utalt a hidrogén-peroxid szintézisre. Az így kapott eredmény az **1. táblázatban** összefoglalva található.

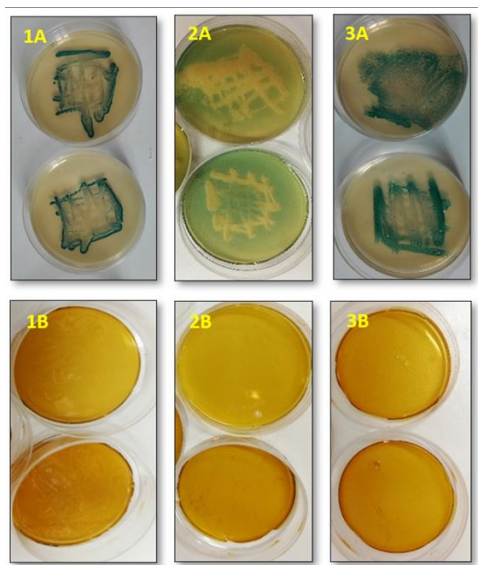
**1. táblázat:** Az alkalmazott *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid szintézisének kvalitatív kimutatása

<i>Lactobacillus</i> törzsek	Tápközegek	
	LAPTg	MRS
<i>L. casei</i> 01	+	+
<i>L. plantarum</i> 299V	+	-
<i>L. acidophilus</i> La5	-	-
<i>L. fermentum</i> HAI79	+	-
<i>L. helveticus</i> R52	+	-
<i>L. reuteri</i> HAI88	+	-
<i>L. salivarius</i> HAI18	-	-
<i>L. crispatus</i> LCR01	+	-

Jelmagyarázat: + kimutatható a hidrogén-peroxid termelés; - nem detektálható hidrogén-peroxid termelés

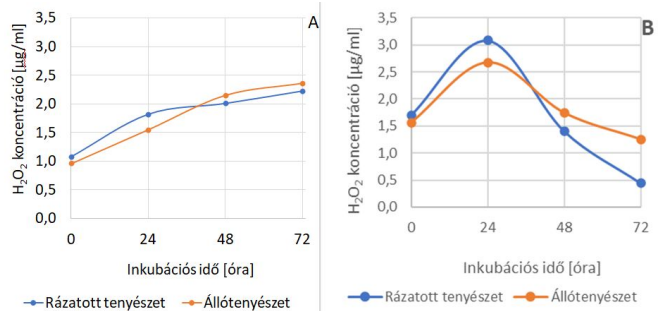
A legintenzívebb színváltozást adó hidrogén-peroxid termelő törzsnek (**1. ábra**) a *L. fermentum* HAI79, *L. helveticus* R52 és *L. crispatus* LCR01 mutatkoztak, ugyanakkor ezen törzsek esetében nem sikerült hidrogén-peroxid szintézist kimutatni MRS táptalajon. Az így kapott eredmények birtokában, a továbbiakban a LAPTg tápközegben előnevelt *Lactobacillus* törzsek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szintézisének részletes vizsgálatával folytatódott.

Az előszelekciónál a legjobbnak ítélt hidrogén-peroxid termelő törzs – a *Lactobacillus crispatus* LCR01 – alkalmazásával került a hidrogén-peroxid szintézis optimális körülményeinek meghatározására. A hidrogén-peroxid szintézis szempontjából kedvező hőmérséklet összehasonlítása 5 °C-on, amelyen e vegyület bomlása visszaszorítható, valamint a terápiás célt szem előtt



**1. ábra:** A kiválasztott *Lactobacillus* törzsek hidrogén-peroxid szintézisének kimutatása LAPTg (A) és MRS (B) tápközegeken (1. *L. fermentum* HAI79, 2. *L. helveticus* R52, 3. *L. crispatus* LCR01)

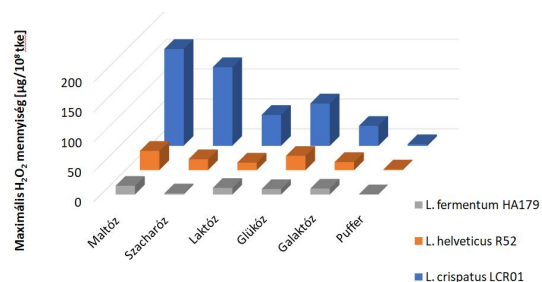
tartva 37 °C-on. Az oxigénellátás szükségessége álló és rázatott körülmények (250 perc<sup>-1</sup>) alkalmazásával került felmérésre (**2. ábra**).



**2. ábra:** A *L. crispatus* LCR01 hidrogén-peroxid szintézise különböző környezeti feltételek mellett pH=6,5 nátrium-foszfát pufferben (rázatás fordulatszáma: 250 perc<sup>-1</sup>) A: 5 °C, B: 37 °C

Megállapítható, hogy 5 °C-on kapott eredmények még a 72 órás vizsgálati időtartamon belül is elmaradtak a 37 °C-on mért maximális értéktől, amely a vizsgálat 24. órájában tapasztalható. Továbbá megállapítható az is, hogy míg kezdetben a rázatás pozitív hatást gyakorolt a hidrogén-peroxid szintézisére, addig 48 órás inkubálás során már tapasztalható a hidrogén-peroxid lebomlást fokozó hatása. A fentiek alapján a további kísérletek 37 °C-on, rázatott körülmények (250 perc<sup>-1</sup>) beállítása mellett folytatódtak.

A különböző szénhidrátok – glükóz, galaktóz, laktóz, maltóz és szacharóz – hatását vizsgálva a hidrogén-peroxid szintézisre megállapítható, hogy a hidrogén-peroxid termelő törzsek szénhidrátok jelenlétében nagyságrendekkel magasabb termelési szintet mutattak a Na-foszfát pufferben szintetizált hidrogén-peroxid mennyiségnél (**3. ábra**). A *L. crispatus* LCR01 törzs bizonyult a legjobb hidrogén-peroxid termelőnek függetlenül az alkalmazott szénhidrát minőségétől. Továbbá a maltóz bizonyult a legjobb hidrogén-peroxid szintézist támogató szénhidrát-forrásnak a szelektált törzseknel. A *L. crispatus* LCR01 által szintetizált mennyiségekhez – maltóz 162 µg/10<sup>8</sup> tke, szacharóz 132 µg/10<sup>8</sup> tke, laktóz 28 µg/10<sup>8</sup> tke, glükóz 71 µg/10<sup>8</sup> tke, galaktóz 18 µg/10<sup>8</sup> tke és Na-foszfát puffer 3 µg/10<sup>8</sup> tke jelenlétében – viszonyítva a *L. helveticus* R52 törzs által szintetizált H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiség tizennygy és negyvenegy



**3. ábra:** A vizsgált *Lactobacillus* törzsek által szintetizált maximális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségek különböző szénhidrátok jelenlétében (37 °C, 250 perc<sup>-1</sup>)

százalék között változott. Az egyik legnagyobb eltérés a szacharóz esetén tapasztalható, hiszen csak 14%-a volt a *L. crispatus* LCR01 által termelt mennyiségnek. A *L. fermentum* HA179 törzs esetén még kisebb értékek tapasztalhatóak, ami szacharóz esetében csupán 1,4%-a, laktóz és galaktóz esetében 21 és 30%-a volt a *L. crispatus* LCR01 által szintetizált mennyiségeknek.

## Következtetések, javaslatok

A *Lactobacillus crispatus* a női hüvely természetes lakója és az itt található glikogén és bomlás termékei (maltóz, glükóz) szolgálhatnak szubsztrátumként metabolizmusához. A *Lactobacillus helveticus* a szájüregben található, ahol a táplálékok elsődleges lebontási termékei szolgáltatnak szubsztrátumot e baktérium faj számára. A *Lactobacillus fermentum* a könnyen hozzáférhető szénhidrátokban szegény anaerob vastagbélben őshonos, talán ezzel magyarázható gyengébb hidrogén-peroxid szintetizáló képessége.

Összességében megállapítható, hogy a hatékony hidrogén-peroxid szintézist elsődlegesen a törzsek genetikai tulajdonságai határozzák meg, amelyekre hatást gyakorolhat az ökológiai környezet is. Ugyanakkor nagyon fontos tényező a szénhidrátellátottság is.

Gyakorlati alkalmazás szempontjából cél lehet a klór kiváltása hidrogén-peroxiddal mind az élelmiszer-feldolgozásban, mind a fertőtlenítésben.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatómunka a KFI\_16-1-2017-0077 és EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 projektek anyagi támogatásával készült.

## Irodalomjegyzék

- Chin, H.S., Cortes, A., (1982): Determination of hydrogen peroxide: A comparison between the potentiometric titration method and an enzyme catalyzed procedure. Unpublished Draft. National Food Processors Assn., 1950 Sixth Street, Berkeley, CA 94710
- Crucitti, T. (2017): Eve's garden: myths, legends and secrets unmasked. *Research in Microbiology*, 168: 773-781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.07.004>
- Denev, A.S.(2006): Role of lactobacilli in gastrointestinal ecosystem. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12:63-114. <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.11.2448>
- Goldstein, E.J.C., et al. (2015): *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60, (2):98-107. <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>
- Kaewnoppara, S., Dangmanee, N., Kaewnoppara, N., Srichana, T., Chulasiri, M., Settharaksa, S. (2013): *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 22:6-13. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.04.009
- Kovachev, S. (2017): Defence factors of vaginal lactobacilli. *Crit Rev Microbiol.*, 44(1):31-39. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2017.1306688>
- Rabe, L.K., Hillier, S.L. (2002). Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7):3260-3264. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.3260-3264.2003>
- Villegas, E., Gilliland, S.E. (2006): Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* I at 5 °C. *Journal of Food Science*, 63(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15857.x>
- Zalán, Zs. et al. (2005): Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotechnol.*, 43(3):219-225.

## Study of hydrogen peroxide synthesis of probiotic *Lactobacillus* strains

Kilin Á., Urbán I., Rezessyné Szabó J., Klosz K., Nguyen D.Q.

### Abstract

During the research work, the reproductive properties of eight probiotic *Lactobacillus* strains were determined, and their of their hydrogen peroxide production was monitored. The productivity of promising strains was increased by changing the environmental factors (choice of nutrient medium used for strain maintenance, optimisation of the temperature used in the aerobic phase, aeration, and carbohydrate supply). The strain *L. crispatus* LCR01 proved to be the best H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producer regardless of the quality of the carbohydrate used in the production stage. Based on the ability to synthesize hydrogen peroxide, this was followed by *L. helveticus* R-52 and *L. fermentum* HA-179 strains. Among the substrates used, maltose proved to be the best carbohydrate source, and LAPTg was the culture medium. In terms of environmental parameters, the condition is 37 °C and shaken (250 min<sup>-1</sup>).

**Keywords:** *Lactobacillus*, hydrogen peroxide, optimisation