

Süle, J., Kőrösi, T., Takács, G., Hucker, A. & Varga, L. (2012) Tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok élősejt-számának meghatározására szolgáló tenyésztési eljárások összehasonlító értékelése. *XXXIV. Óvári Tudományos Nap*. Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, pp. 381–385. [ISBN 978-963-9883-93-2]

TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÉS BIFIDOBAKTÉRIUMOK ÉLŐSEJT-SZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ TENYÉSZTÉSEK ELJÁRÁSOK ÖSSZEHALONLÍTÓ ÉRTÉKELÉSE*

SÜLE J.¹ – KÖRÖSI T.² – TAKÁCS G.¹ – HUCKER A.² – VARGA L.¹

¹ Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Intézet, 9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 15-17.

² Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft., 9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 24.

Összefoglalás

Kísérleteink célja az volt, hogy a savanyú tejtermékek előállításához legáltalánosabban alkalmazott probiotikus valamint nem probiotikus tejsavbaktérium- és bifidobaktérium-fajok (törzsek) tenyésztésére javasolt eljárásokat összehasonlítsuk szelektivitás szempontjából, és megállapítsuk, hogy a különféle kultúrakombinációkkal készülő termékek esetében miként valósítható meg a termékazonos mikroorganizmusok egymástól történő elkülönítése és élősejt-számuk meghatározása. A vizsgálatokat 9 fajhoz tartozó 14 törzsszel végeztük. Összesen 8 módszert alkalmaztunk: mindegyikkel teszteltük a 14 tejsavbaktérium-, illetve bifidobaktérium-törzs szaporodási és telepképzési tulajdonságait. Eredményeink azt mutatták, hogy a tenyésztési körülmények (tápközeg összetétele, inkubációs hőmérséklet, inkubációs időtartam, aerob/anaerob tenyésztés) célszerű megválasztásával a vizsgált baktériumtörzsek elkülöníthetővé és megszámlálhatóvá váltak.

Comparative evaluation of conventional plating methods for enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria cells

Summary

The objectives of this research were (1) to compare the selectivity of microbiological plating methods suitable for enumeration of probiotic and non-probiotic strains of lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria species widely used in the production of cultured milks and (2) to determine how the essential microbiota in fermented dairy foods manufactured with various culture combinations can be identified and enumerated. Fourteen LAB and bifidobacteria strains belonging to nine species were tested for growth and colony formation using a total of eight methods. The results showed that the proper choice of growth conditions in terms of composition of culture media, incubation time and temperature, aerobic/anaerobic conditions, etc. enabled selective enumeration of the bacterial species (strains) tested.

* A kutatás a "Talentum – Hallgatói tehetséggondozás feltételrendszerének fejlesztése a Nyugat-magyarországi Egyetemen" c. TÁMOP 4.2.2.B-10/1-2010-0018 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Bevezetés

A probiotikum elnevezés a *pro bios* kifejezésből ered, melynek jelentése: “az életért”. A probiotikumok jótékony hatásukat egyebek mellett a bélflóra kialakítása, az immunsejtek aktiválása, a vér lipidprofiljának javítása és a tumorsejtek szaporodásának gátlása terén fejtik ki. A legismertebb probiotikus törzsek a tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok közül kerülnek ki. E mikroorganizmusok előnyös tulajdonságainak és termékbeli jelenlétének igazolása kiemelkedő jelentőséggel bír gyártó és fogyasztó számára egyaránt. Manapság már csak az a cég képes piaci előnyre szert tenni, amely termékeivel valamiféle pluszt tud nyújtani a fogyasztónak, vagyis az élelmiszer a garanciális minőségén túl funkcionális minőséggel is rendelkezik. A probiotikus – és még inkább a prebiotikumokat is tartalmazó, ún. szinbiotikus – tejtermékek világszerte vezető gyártmányok az élelmiszer-iparban (Szakály, 2004).

Mivel a szakirodalomban gyakorta ellentmondásos közlések találhatóak az egyes probiotikus mikroorganizmusok (törzsek) szaporodásához, illetve szelektív elkülönítéséhez szükséges feltételekre vonatkozóan (pl. tápközeg összetétele, inkubációs hőmérséklet, inkubációs időtartam, aerob/anaerob tenyésztés stb.), jelen munkánkban ezeknek a kérdéseknek a tisztázására vállalkoztunk.

Vizsgálati anyagok és módszerek

A vizsgálatokat Mosonmagyaróváron, a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.-ben végeztük az alábbi 14 törzssel: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YC-X11 (FD-DVS YC-X11 Yo-Flex[®] joghurtkultúrából kitenyésztett törzs) és CH-2, *Streptococcus thermophilus* TH-4 és DSM 20479, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 és NCAIM B.02085, *Bifidobacterium breve* M-16 V, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* VK-256, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ATCC 19255, *Lactobacillus casei* MTKI-R és NCAIM B.01137, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MTKI-13 és ATCC 19435. A tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok élősejt-számának meghatározására szolgáló tápközégek megnevezése és az inkubációs körülmények részletei az **1. táblázat**ban láthatók.

1. táblázat: Tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok élősejt-számának meghatározására alkalmazott módszerek

| Sorszám | Tápközeg | Inkubációs | | |
|---------|---------------------------|------------------|---------|-------------|
| | | hőmérséklet (°C) | idő (h) | körülmények |
| 1. | TSZK agar ¹ | 37 | 72 | Anaerob |
| 2. | MRS pH 5,4 agar | 45 | 48 | Anaerob |
| 3. | MRS pH 5,4 agar | 37 | 72 | Anaerob |
| 4. | MRS pH 6,2 agar | 37 | 72 | Anaerob |
| 5. | M17 agar | 45 | 24 | Aerob |
| 6. | M17 agar | 37 | 48 | Aerob |
| 7. | MRS-CC agar ² | 37 | 72 | Anaerob |
| 8. | TOS-MUP agar ³ | 37 | 72 | Anaerob |

¹ Tejporos szója-kazein agar; ² Clindamycinnel és ciprofloxacinnal kiegészített De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar; ³ Lítium-mupirocinnal (MUP) kiegészített transzgalaktozilált oligoszacharid (TOS) agar.

Süle, J., Kőrösi, T., Takács, G., Hucker, A. & Varga, L. (2012) Tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok elősejt-számának meghatározására szolgáló tenyésztési eljárások összehasonlító értékelése. XXXIV. Óvári Tudományos Nap. Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, pp. 381–385. [ISBN 978-963-9883-93-2]

Eredmények és értékelésük

A *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YC-X11 törzse csak a 4. számú vizsgálati módszer paraméterei mellett (6,2-es pH-jú MRS agar, anaerob tenyésztés 37°C-on 72 óráig) szaporodott megfelelően. Ezzel szemben a másik törzs (CH-2) jól növekedett az 1., a 3. és a 4. módszer vizsgálati körülményei között is. A legnagyobb elősejt-számot ez utóbbi esetben is a 4. módszer alkalmazásával kaptuk. García-Cayuela és mtsai (2009) a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tenyésztéséhez MRS-fruktóz agart javasolnak 45°C-os inkubációs hőmérsékleten, a mi kísérleti eredményeink szerint viszont a 37°C-os hőmérséklet bizonyult optimálisnak. Némiképpen meglepő módon, a termofil *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 45°C-os hőmérsékleten nem szaporodott elfogadható mértékben. García-Cayuela és mtsai (2009) eredményeihez hasonlóan Tabasco és mtsai (2007) is az MRS-fruktóz agart találták megfelelőnek *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tenyésztéséhez. Az irodalmi források többsége 72 órás, anaerob inkubációt javasol, és ez egybecseng a mi eredményeinkkel, eltérés csupán az inkubációs hőmérséklet tekintetében van.

A *S. thermophilus* TH-4 jelű törzse az 1., az 5. és a 6., a DSM 20479 törzs pedig az 1. és a 6. sorszámú módszer alkalmazásakor szaporodott jól. Megállapítható tehát, hogy a *S. thermophilus* tenyésztéséhez a TSZKA (tejporos szója-kazein agar) tápközeg (37°C-on 72 óráig tartó anaerob inkubálással) vagy az M17 agar (37°C-on 48 óráig végzett aerob inkubációval) a legmegfelelőbb. Tabasco és mtsai (2007), illetve García-Cayuela és mtsai (2009) is ugyanezt a táptalajt és ugyanezeket az inkubációs körülményeket ajánlják. Megjegyzendő, hogy egyik táptalaj sem tartalmaz lítium-kloridot vagy nátrium-propionátot, mert ezek gátolják a *S. thermophilus* szaporodását (Lima és mtsai, 2009).

A *Lb. acidophilus* LA-5 és NCAIM B.02085 jelű törzse szinte valamennyi megvizsgált táptalajon jól szaporodott, kivételt csak a 45°C-on inkubált M17 agar és a TOS-MUP agar jelentett. Vinderola és Reinheimer (2000) a *Lb. acidophilus* szelektív tenyésztéséhez lítium-kloridot és nátrium-propionátot tartalmazó LP-MRS agart ajánl. Noha a TOS-MUP agar tartalmaz nátrium-propionátot és összetevői között megtalálható – jóllehet nem lítium-klorid formájában – a lítium és a klorid is, mégsem fejlődött rajta jól egyik törzsünk sem.

A *B. breve* M-16 V egyedül a 37°C-on 48 órán át aerob körülmények között inkubált M17 agaron szaporodott megfelelően, ami a szakirodalmi közlések tükrében meglepőnek mondható. Ugyanezt tapasztaltuk a probiotikus tulajdonságairól jól ismert *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 esetében, viszont ez utóbbi törzs szintén jól növekedett 37°C-on 72 óráig anaerob módon inkubált TSZK agaron és Li-mupirocinnal kiegészített TOS-MUP agaron is. Ez utóbbi tápközeg bifidobaktériumok szelektív tenyésztésére való alkalmasságát alátámasztják Rada és Koc (2000) valamint Kim és mtsai (2010) vizsgálati eredményei is.

A mezofil vajkultúra sav- és aromatermelő komponenseinek tenyésztésére vonatkozóan elvégzett vizsgálatok eredményei arról tanúskodtak, hogy a *Lc. lactis* subsp. *lactis* MTKI-13 összességében nagyon hasonlóan viselkedett, mint a *Lb. acidophilus* LA-5 és a *Lb. acidophilus* NCAIM B.02085. Ugyanez viszont már csak korlátozottan volt elmondható a *Lc. lactis* subsp. *lactis* másik tesztelt törzséről (ATCC 19435). A *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ATCC 19255 csak a tejporos szója-kazein agaron szaporodott megfelelően, a *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* VK-256 viszont emellett még az aerob körülmények között, 37°C-on, 48 órán keresztül inkubált M17 agaron is. Antunes és mtsai (2007) CHN-22 azonosító jelű vajkultúrával végeztek kísérleteket, amely *Lc. lactis* subsp. *lactis*-t, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*-t, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*-t és *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*-t tartalmazott. A vajkultúrát eltérő dicloxacillin-tartalmú MRS agarokra helyezték és vizsgálták a telepképződést. A kultúrakeverék komponensei a táptalajok nagy részén képesek voltak telepeket létrehozni.

Süle, J., Kőrösi, T., Takács, G., Hucker, A. & Varga, L. (2012) Tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok élősejt-számának meghatározására szolgáló tenyésztési eljárások összehasonlító értékelése. XXXIV. Óvári Tudományos Nap. Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, pp. 381–385. [ISBN 978-963-9883-93-2]

A *Lb. casei* MTKI-R és NCAIM B.01137 jelű törzsének eredményei nagyrészt hasonlóan alakultak ahhoz, mint amit a *Lb. acidophilus* két törzsével kapcsolatban az előzőekben elmondtunk. Különbség, hogy a *Lb. casei* törzsek nem szaporodtak megfelelően 5,4-es pH-jú, 45°C-on, 48 óráig, anaerob körülmények között inkubált MRS agaron. Meglepő viszont a NCAIM B.01137 törzs nagymértékű telepkezése M17 agaron. Ilyen értelmű közlést az áttekintett szakirodalmi forrásokban nem találtunk. Mortazavian és mtsai (2007) MRS-epe agart, Lima és mtsai (2009) pedig LC (*Lb. casei*) agart javasolnak *Lb. casei* szelektív tenyésztéséhez.

Következtetések

Eredményeink alapján az alábbi főbb megállapítások tehetők:

- Tejporos szója-kazein agaron az összes megvizsgált faj legalább egyik törzse kiválóan szaporodott, ezért ez a tápközeg, 37°C-on 72 órán keresztül anaerob körülmények között inkubálva, alkalmas a tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok összes élősejt-számának meghatározására.
- A tesztelt MRS tápközegek alkalmasnak bizonyultak a probiotikus laktobacillusok savanyú tejtermékekből történő szelektív elkülönítésére és számbeli meghatározására, amennyiben a kultúrakomponensek között nem volt jelen a *Lc. lactis* subsp. *lactis*.
- A *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 szelektív tenyésztésére kiválóan alkalmas a 37°C-on 72 óráig anaerob módon inkubált, lítium-mupirocinnal kiegészített TOS-MUP agar.
- Joghurt esetében a termékazonos mikroorganizmusok szelektív elkülönítése úgy valósítható meg leghatékonyabban, ha a mintákat M17 agaron, 37°C-on, 48 óráig, aerob módon (*S. thermophilus*), illetve 6,2-es pH-jú MRS agaron, 37°C-on, 72 óráig anaerob körülmények között (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) inkubáljuk.
- Ún. ABT-típusú probiotikus savanyú tejtermékek kultúra eredetű komponenseinek szelektív elkülönítését 45°C-on, 24 órán keresztül, aerob körülmények között inkubált M17 agaron (*S. thermophilus*), 37°C-on 72 órán át anaerob módon inkubált, lítium-mupirocinnal kiegészített TOS-MUP agaron (*B. animalis* subsp. *lactis*) és bármelyik, általunk tesztelt MRS agaron (*Lb. acidophilus*) célszerű végezni.
- A *Lb. casei* a *Lb. acidophilus*-éhoz és a *Lc. lactis* subsp. *lactis*-éhoz hasonló tenyésztési körülményeket igényel, a joghurtbaktériumoktól és a bifidobaktériumoktól viszont könnyen elkülöníthető.

Irodalomjegyzék

- Antunes, A.E.C., Grael, E.T., Moreno, I., Rodrigues, L.G., Dourado, F.M., Saccaro, D.M. & Lerayer, A.L.S. (2007) Selective enumeration and viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a new fermented milk product. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**, 173-177.
- García-Cayueta, T., Tabasco, R., Peláez, C. & Requena, T. (2009) Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *International Dairy Journal* **19**, 405-409.
- Kim, E.R., Cho, Y.H., Kim, Y.H., Park, S.O., Woo, G.J. & Chun, H.N. (2010) Comparison of bifidobacteria selective media for the detection of bifidobacteria in Korean commercial

Süle, J., Kőrösi, T., Takács, G., Hucker, A. & Varga, L. (2012) Tejsavbaktériumok és bifidobaktériumok élősejt-számának meghatározására szolgáló tenyésztési eljárások összehasonlító értékelése. XXXIV. Óvári Tudományos Nap. Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, pp. 381–385. [ISBN 978-963-9883-93-2]

fermented milk products. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources* **30** (1), 154-162.

Lima, K.G.C., Kruger, M.F., Behrens, J., Destro, M.T., Landgraf, M. & Franco, B.D.G.M. (2009) Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT – Food Science and Technology* **42**, 491-495.

Mortazavian, A.M., Ehsan, M.R., Sohrabvandi, S. & Reinheimer, J.A. (2007) MRS-bile agar: its suitability for the enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. *Milchwissenschaft* **62**, 270-272.

Rada, V. & Koc, J. (2000) The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft* **55**, 65-67.

Szakály, S. (2004) *Probiotikumok és Humánegészség. Vissza a Természethez!* G-Print Nyomda, Budapest, 52 pp.

Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C. & Requena, T. (2007) Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* **17**, 1107-1114.

Vinderola, C.G. & Reinheimer, J.A. (2000) Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* **10**, 271-275.