



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

TÉT_16_CN-1-2016-0004 „Zöldségek és gyümölcsök biológiai úton történő tartósítása Magyarországon és Kínában, különös tekintettel az élelmiszer-biztonsági és a humán egészségügyi szempontokra” című Magyar- Kínai Ipari Kutatás-fejlesztési Együttműködési Pályázat

A projekt tartalma és célja

A biológiai kontroll, mint egy alternatív, a nyersanyag romlását okozó mikroorganizmusok tevékenységét háttérbe szorító, így a romlást megelőző technológia, a kémiai tartósítószereket alkalmazó módszerek egy lehetséges kiváltója lehet. A mezőgazdasági terményekre -, amelyek az élelmiszerelőállítás alapját képezik, - jellemző a természetes és nagyszámú mikroorganizmus jelenléte, amely előidézhetheti a betakarított növényi rész gyors romlását, ezáltal befolyásolja annak felhasználhatóságát, tárolhatóságát és biztonságát. A betakarítást követő ún. postharvest romlás egyrészt jelentős (gazdasági) károkat okoz, amelynek csökkentése egyértelműen fontos feladat, másrészt élelmiszerbiztonsági kockázatot jelenthet az esetlegesen feldolgozott, de már fertőzött nyersanyag tekintetében.

A mezőgazdasági termények közül a zöldségek és gyümölcsök, azok magas víztartalma miatt, különösen ki vannak téve a betakarítás utáni gyors romlási folyamatoknak. Ezen romlásban nagy szerepet játszanak a különböző penészgombák, főként a *Penicillium*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Fusarium* és *Rhizopus* fajok.

Ezen romlási folyamatok megakadályozására a vegyszeres kezelés egyik alternatívája olyan biológiai tartósítási módszer alkalmazása, ahol olyan mikroorganizmusokat alkalmaznak, amelyek kifejezetten ezen romlást okozó penészek ellen hatékonyak, miközben a nyersanyag tulajdonságait nem befolyásolja, arra nincs negatív hatással.

A tejsavbaktériumok természetesen előfordulnak a növényi részekben, anélkül, hogy annak romlását okoznák, miközben káros egészségi hatásai sincsenek. Ismert, hogy számos baktérium termelhet olyan antifungális anyagot (többek között kitinázokat), amely visszaszorítja a penészek szaporodását.

Célunk volt olyan mikroorganizmusok, illetve azok keverékének tudományos alapon történő szelektálása, amelyek jól alkalmazhatóak növényi nyersanyagok post harvest romlásának megakadályozására.

A projekt eredményeinek általános összefoglalása

A projekt keretében kínai partnereinkkel olyan mikroorganizmusokat kutattunk, amelyek hatékonyan alkalmazhatóak biológiai kontrollként zöldségek és gyümölcsök romlást okozó penészeinek gátlására. A vizsgálat egyik fókuszpontjába a kitináz aktivitást helyeztük, amely tulajdonsággal rendelkező mikroorganizmusok képesek lehetnek lebontani a romlást okozó penészek kitin-tartalmú sejtfalát, így gátolva azok szaporodását. Széleskörű vizsgálatokat végeztünk a kitináz kódoló gén, a kitináz-szerű fehérjék és a kitin-bontásban szerepet játszó kitin-kötő fehérjék feltárása érdekében. A szelektált mikrobákkal kevert tenyészeteket alakítottunk ki, amelyek penészgátló hatása még nagyobb lett a különálló mikrobákhoz képest.

A legígéretesebb kevert kultúrák és egyedi törzsek gyakorlati alkalmazhatósága érdekében ipari tárolási kísérletet végeztünk, amelynek eredményéből megállapítottuk a leghatékonyabb és legjobban alkalmazható mikrobákat. A kínai partnerekkel történő együttműködés által ezen biokontroll mikroorganizmusokat széles körben, különböző terményeken és körülmények között is megvizsgáltuk és hatásukat igazoltuk. A biokontroll mikrobákat allergenitási vizsgálatnak vetettük alá, valamint a velük kezelt terményeket *in vitro* emésztési modellben és a béltraktusban jelenlévő jótékony baktériumokra kifejtett hatásuk alapján is vizsgáltuk, hogy egészségügyi, élelmiszerbiztonsági szempontból is megfeleljenek.

A jelen projekt keretében elvégzett kísérleti fejlesztés és alkalmazott ipari kutatás alapján sikerült egy baktériumot (*L. rhamnosus* VT1) és egy baktérium kevert tenyészetet (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B397 - *L. acidophilus* N2) kiválasztanunk, illetve kialakítanunk, amelyek hatékonyan és biztonságosan alkalmazhatóak gyümölcs és zöldség betakarítás utáni penészes romlásának gátlására. Ezen mikrobák az alma és répa penészesedésének 84-98%-os gátlására is képesek. Emellett olyan *Pseudomonas-Lactobacillus* kevert kultúrát is sikerült kialakítanunk, amellyel sikeresen gátolható a mandarinok *Penicillium*-os penészes romlása.

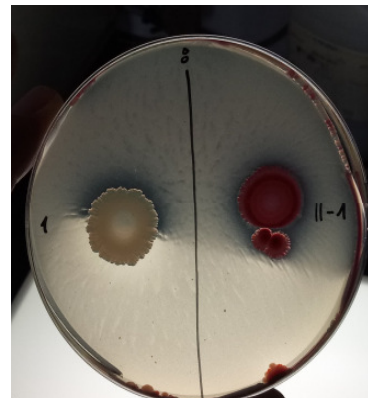
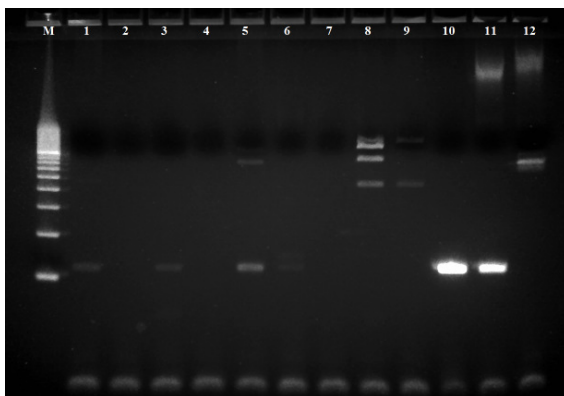
Ezen hasznos mikroorganizmusok alkalmazásával csökkenthető a kémiai kezelés, a vegyszerek használata a tárolás során, illetve kisebb mértékű romlás következik be egy nem kezelt nyersanyaghoz képest, így a biológiai tartósítás által egy természetesebb, kezelésektől mentes tartósítás valósítható meg, csökkentve a gazdasági veszteséget és az élelmiszerbiztonsági kockázatot. A mikroorganizmusok biotartósításban történő alkalmazhatóságát meghatározó tulajdonságai akár törzsenként is nagymértékű eltérést mutathatnak, ezért szelekciójukhoz körültekintő kutatás szükséges. Ugyanakkor az eltérő környezeti feltételek, földrajzi körülmények között különböző mikroorganizmus fajok/törzsek fordulnak elő, amelyeknek a megszokottól eltérő körülmények közötti vizsgálatával, alkalmazásával plusz információkat és hatékonyságukban fokozott mikroorganizmusokat

szelektálhatunk, amely vizsgálatokhoz a kínai és magyar fél eltérő környezeti feltételei ideálisak voltak.

A projekt részletes eredményei

2017-2018.

Az első részfeladatban molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk a kísérletbe vont, törzsgyűjteményből, illetve élelmiszerekből izolált baktériumok esetén a kitináz termelést kódoló gének jelenlétét a mikroorganizmusokban. A kísérletekben és a biokontroll organizmusként főként tejsavbaktériumokat, azon is belül a széles körben előforduló, könnyen és általánosan alkalmazható *Lactobacillus* nemzetség tagjait alkalmaztuk. Hogy igazoljuk a kísérletbe vont baktériumok *Lactobacillus* nemzetségbe tartozását, *Lactobacillus* specifikus primert alkalmaztunk. A kitináz kódoló gének jelenlétére, azaz, hogy az adott baktériumban megvan-e a képesség a kitináz termelésére, irodalmi adatok alapján kétféle primert használtunk. Öt *Lactobacillus* esetén találtunk az egyik primerre (chiA) adott jelek alapján kitináz kódoló gén jelenlétét. Megvizsgáltuk a kísérletbe vont baktériumok, - mind tejsavbaktériumok, mind a nemtejsavbaktériumok - és élesztők esetén, különböző kitin-tartalmú táptalajon magának a kitináz enzim termelését, aktivitását, a kitin bontása által.

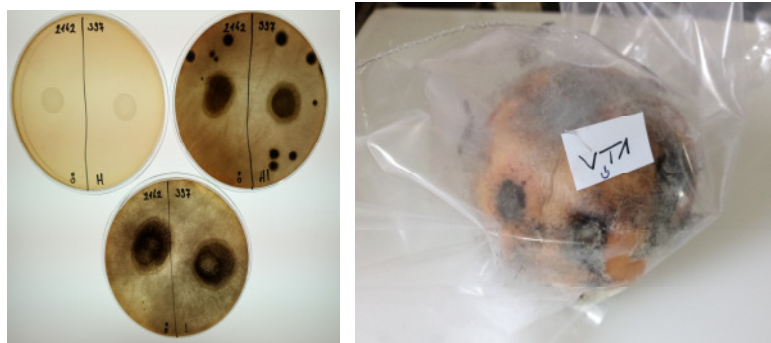


A kísérleteink alapján sikerült szelektálnunk olyan *Lactobacillus* törzseket, amelyek a genetikai információk alapján képesek lehetnek kitináz termelésre, ezáltal jelentős penészgátlásra. Ezen eredmény tudományos jelentősége, hogy az általunk ismert irodalmi adatok alapján a *Lactobacillus* törzsek nem, illetve nagyon kis százalékban rendelkeznek kitináz génnel, kitinbontó aktivitással rendelkező törzsek nem nagyon fordulnak elő. Ugyanakkor a kitinbontó aktivitásukat normál körülmények között nem tudtuk igazolni.

A második részfeladatban a kitinbontó aktivitásuk indukálása, a gén kifejeződésének környezeti paramétereinek meghatározása, illetve a tényleges penészgátló aktivitás és az esetleges kitináz aktivitás közötti kapcsolat feltárása volt a célunk. Ehhez kolloidális kitint állítottunk elő a kitinbontó aktivitás jobb megfigyelhetősége érdekében; adaptációs kísérletet a törzsek kitinhez történő alkalmazkodása céljából; módosított tápközegben vizsgáltuk a kitináz aktivitás kifejeződését; statisztikai kísérlettervezéssel vizsgáltuk a tápközeg összetétel és a környezeti paraméterek hatását a kitinbontó képességre. A pozitív kontrollként alkalmazott *Serratia* törzsek esetén megállapítottuk a kitináz aktivitásra legnagyobb hatással bíró paramétereiket.

A valódi penészgátlás meghatározása érdekében romlást okozó penészeket izoláltunk termelői piacról, kiskertből, illetve zöldségkutató intézetből származó zöldség-, és gyümölcs mintákról. Összesen 11 különböző penészt izoláltunk sárgaréparól, paradicsomról, málnáról, őszibarackról, szederről, kopaszbarackról (nektarin) és mandarinról, amelyekkel szemben kétféle módszerrel megvizsgáltuk a kísérletbe bevont baktériumok és élesztők gátló hatását. A gátlás mértéke nagymértékben függött az adott, gátolandó penész fajtájától, mindazonáltal mind a tejsavbaktériumok, mind a nem-tejsavbaktériumok és az élesztők esetén is találtunk a többi vizsgált törzshöz képest statisztikailag is kimutatható, jelentős gátló hatással rendelkező törzset. A kitináz-aktivitással rendelkező, pozitív kontrollként alkalmazott *Serratia* törzsek gátló hatásában egyértelműen megmutatkozott a kitináz termelés és a penészgátlás közötti összefüggés, azonban *Lactobacillus*-ok és azok penészgátló hatása és a kitináz kódoló gén jelenléte között nem volt összefüggés.

A gyakorlati alkalmazhatóság érdekében előkísérletben megvizsgáltunk szelektált *Lactobacillus*-ok gátló aktivitását penészekkel fertőzött zöldségen és gyümölcsön. A penészek számára ideális magas hőmérséklet és páratartalom ellenére egyes tejsavbaktérium törzsek jelenlétében kisebb mértékű penésznövekedést figyeltünk meg.



2018-2019.

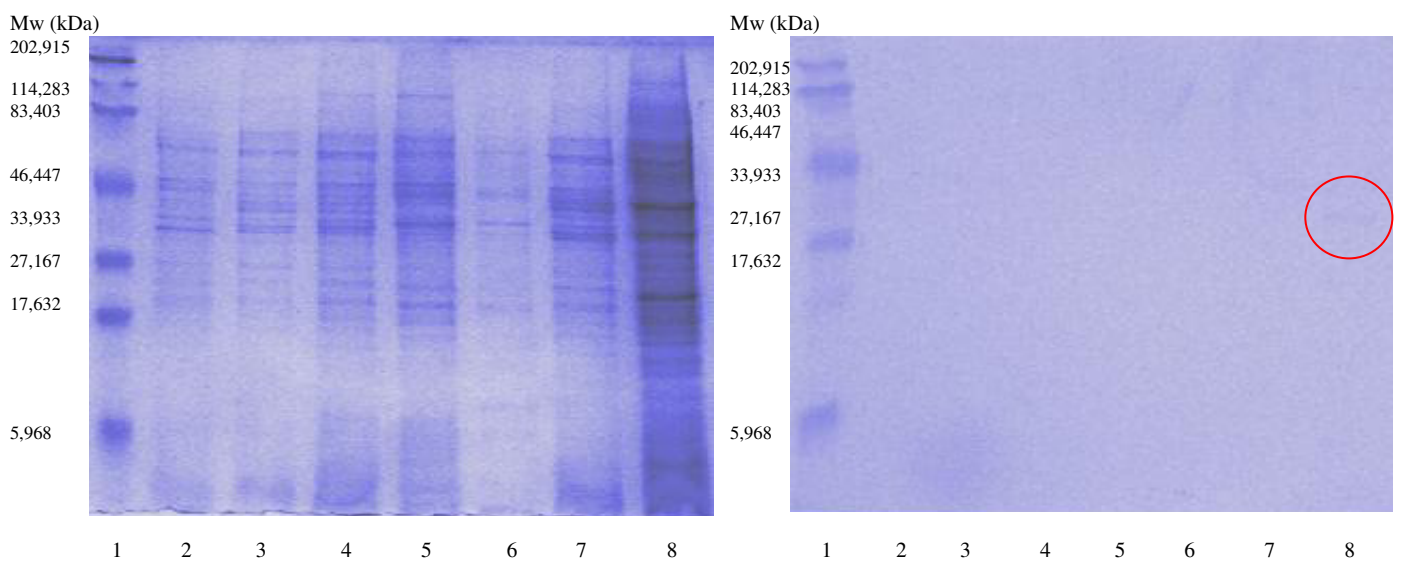
A harmadik részfeladat célja volt egyrészt elválasztani és kimutatni a korábban szelektált, kitináz kódoló gént tartalmazó *Lactobacillus* törzsek kitinázait, másrészt a kitinázok aktivitásában szerepet játszó, a kitináz termelő törzsek által kiválasztott kitináz-fehérjék meghatározása, mennyiségüket, aktivitásukat befolyásoló tényezők vizsgálata.

A kísérleteket a molekuláris biológiai vizsgálatok alapján kiválasztott kitináz gént tartalmazó *Lactobacillus* törzsekkel végeztük: a kitináz-aktivitást Zimmogram módszerrel; a kitináz és kitinázzal homológ fehérjék kimutatását pedig immunblot technikával tanulmányoztuk. Feltérképeztük a szelektált baktérium törzsek fehérje-eloszlását, majd az extracellulárisan képződő fehérjék elektroforetikus mintázatát is elemeztük. A vizsgált tejsavbaktérium törzsek nem mutattak keresztreaktivitást az ellenanyaggal, szemben a kontroll *S. marcescens* törzsszel, ahol 30 kDa körül kaptunk immunreaktív sávot. A kitináz termelésének meghatározásához, a fehérje tisztításához gardiens elúciós nagy hatékonyságú folyadékromatográfiás (HPLC) módszert adaptáltunk, amely igazolta a kitinázhoz hasonló szerkezeti és kémiai tulajdonságú fehérjék jelenlétét.

A kitináz enzim aktivitását fotometriás módszerrel vizsgáltuk, kitin-azúr szubsztrát alkalmazásával. A pozitív kontroll *Serratia marcescens* esetén sikerült kimutatnunk a kitináz

enzimrendszerének aktivitását, azonban a tejsavbaktériumok esetén nem kaptunk detektálható aktivitást.

A részfeladat során a korábbi eredményeink alapján kiválasztott 6 *Lactobacillus* törzs kitin-kötő fehérjét is vizsgáltuk, amelyek fontos szerepet játszanak a kitin lebontásában. A kitin-kötő fehérjét a koloidális kitinhez való kötődésének vizsgálatával igazoltuk. Az alkalmazott módszerrel a 40-43 kDa molekulatömeg tartományban mindegyik törzs esetében, a 30-33 kDa körüli tartományban a egy törzs kivételével szintén mindegyik törzsnél sikerült fehérjesávot kimutatni, a kapott eredmény kitin-kötő fehérje jelenlétére utal. A kitin-kötő fehérjék termelődésének indukálása céljából különböző környezeti paraméterek (hőmérséklet, élesztőkivonat-, penész jelenléte) mellett vizsgáltuk a koloidális kitinhez kötődő felülúszó fehérjemintázatát.



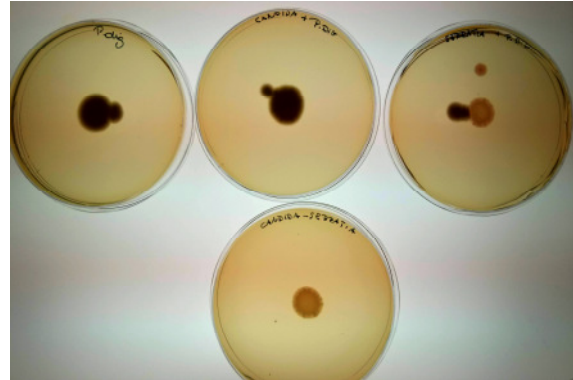
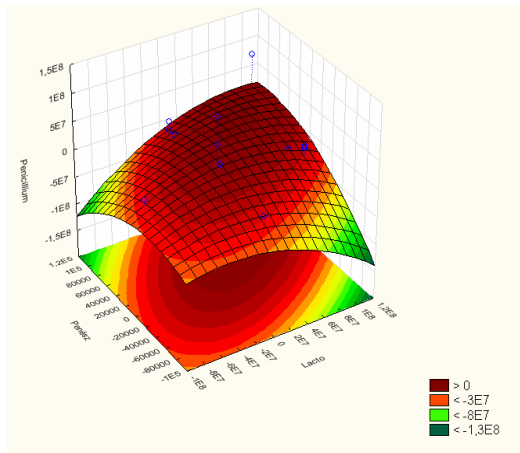
A negyedik részfeladat célja volt a korábbi részfeladatokban szelektált mikroorganizmusok alkalmazásával kevert tenyészetek kialakítása, hogy az egyes törzsek gátló hatásának ily módon történő additív vagy szinergens hatásvövedése által megnöveljük penészgátló hatékonyságuk.

A kísérleteket a molekuláris biológiai vizsgálatok (1. részfeladat), a tényleges penészgátló aktivitás (2. részfeladat) és a kitináz enzim és kitin-kötő fehérje termelése (3. részfeladat) alapján kiválasztott *Lactobacillus* törzsekkel végeztük.

Első lépésként megvizsgáltuk a korábban szelektált törzsek egymásra kifejtett hatását egy esetleges kevert tenyészetben történő alkalmazhatóságuk érdekében, amelyet agardiffúziós spot-módszerrel végeztünk. A 14 vizsgált mikroorganizmus 182 féle párosítási lehetőségéből 21 olyan párosítást találtunk, ahol egyik tag sem gátolta a másik szaporodását, amelyek közül 12 párosítás került kiválasztásra a további vizsgálatokhoz. A kevert tenyészet egyes tagjainak sejtkoncentrációja, az össz-sejtszám és a tagok egymáshoz viszonyított sejtszám-aránya alapján 7 párosítást választottunk ki a további vizsgálatokhoz.

A szelektált, együtt szaporított keverékek penészgátló hatását 5 Magyarországon és három Kínában izolált romlást okozó penész ellen vizsgáltuk a keverékek gátló hatását hasonlítva a

kevert tenyészetben szereplő egyes mikrobák adott penésszel szembeni egyedi gátló hatásához képest. Az eredmények alapján öt kevert tenyészet öt vizsgált penész esetén jelentősen nagyobb ($p < 0,05$) gátló aktivitást mutatott, mint az egyes, keveréket alkotó mikroorganizmusok külön-külön.



2019-2020.

A gyakorlati megvalósíthatóság érdekében az ötödik részfeladatban meghatároztuk azt a technikát, amellyel a leghatékonyabban felvihetők a post harvest biokontroll mikrobák a termés felületére, majd tárolási kísérleteket végeztünk ipari körülmények között, hűtőházban, ahol vizsgáltuk a biokontroll mikrobák életképességét a terményen, valamint a romlást okozó penészek szaporodását. A tárolási kísérletet elvégeztük nem-ipari, pince-tárolás során is, modellezve a különböző tárolási körülményeket. A mikroorganizmusok védő hatása mellett vizsgáltuk a termés saját, kitinázon alapuló védekező mechanizmusát is.

A kilenc hónapos tárolási kísérlet során alma és répa terményeken hűtőházi- és pince tárolási körülmények között meghatároztuk a biokontroll mikrobák túlélését a terményen, valamint a post harvest romlást okozó penészek számát, amelyből meghatároztuk a penészgátló hatás mértékét. Almán több mint 90%-os, répán egyes esetekben több mint 80%-os penész-szaporodás gátlást értünk el. Sőt, egyes kezelések esetén a kiindulási penészszámhoz képest csökkent értéket mértünk. Az eredmények alapján almára és répára is meghatároztuk a leghatékonyabb biokontroll mikrobát, illetve mikroba keveréket. Emellett megállapítottuk, hogy bizonyos esetekben a termés saját, kitinázon alapuló védekező mechanizmusa is szerepet játszhat a penészes romlás megakadályozásában. Sikertült egy baktérium törzset (*L. rhamnosus* VT1) és egy baktérium kevert tenyészetet (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B397 - *L. acidophilus* N2) kiválasztanunk, amelyek a gyakorlati körülmények között is nagy penészgátló hatékonysággal rendelkeznek. A kínai partnerrel végzett közös munka eredményeképpen olyan *Pseudomonas-Lactobacillus* kevert kultúrát is sikerült kialakítanunk, amellyel sikeresen gátlható a mandarinok *Penicillium digitatum*-os romlása.



A hatodik és hetedik részfeladatban élelmiszerbiztonsági szempontból is vizsgáltuk az alkalmazandó védőkultúrákat, ehhez immunológiai vizsgálatot végeztünk az esetleges allergenitási tulajdonságuk meghatározása érdekében, valamint a túlélésük *in vitro* emésztési modellben, továbbá a bélflóra jótékony baktériumaira kifejtett hatásuk is tanulmányoztuk.

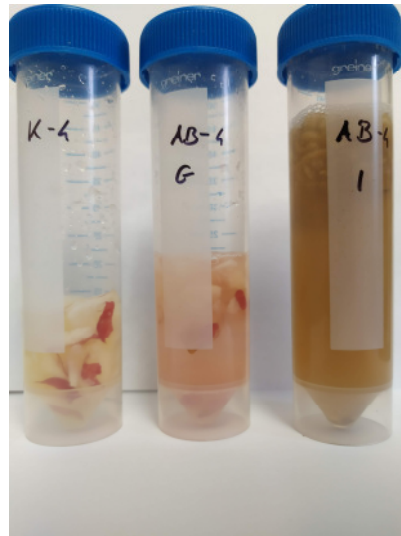
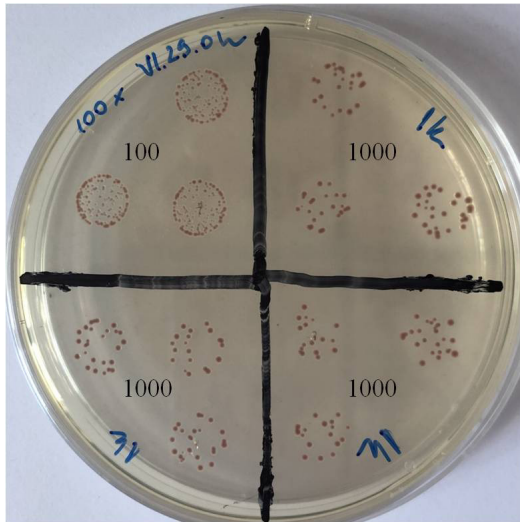
A humán szérumokkal végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a tanulmányozott tejsavbaktérium törzsek fehérjéi között van kitináz fehérjével homológ fehérje, amelyeket a szérumok lehetséges IgE immunreaktív fehérjeként felismertek. Ezen fehérjéről feltételezhető, hogy egyes egyéneknél előidézhetnek allergiás reakciókat, de nem kaptunk erős, és egyértelmű immunreaktív sávot. A baktérium eredetű kitinázok molekulatömegtartományában (20-80 kDa) azonban nem találtunk immunreaktív fehérjesávokat.

Az *in vitro* emésztési modellben történő vizsgálataink eredménye alapján a biokontroll mikroorganizmusok képesek túlélni a béltraktusban, ha a post harvest kezelésen átesett növényi termékkel bejutnak a fogyasztó szervezetébe. Ugyanakkor eredményeink arra is rámutattak, hogy a mikrobák túlélése nagymértékben függ magától a terménytől, az emésztés során kialakuló mátrixtól, valamint az emésztés paramétereitől (pl. gyomor pH) és az adott törzstől is.

A valóságnak leginkább megfelelő, ahhoz legjobban hasonlító kísérleti megvalósítás érdekében a bélflórára kifejtett hatást az *in vitro* emésztésen átesett mintákkal végeztük. A bélflórára kifejtett hatás vizsgálatok leginkább a jótékony baktériumokra kifejtett hatást vizsgáltuk, hogy megállapítsuk, a post harvest biokontroll kezelést követően a zöldségről, gyümölcsről esetlegesen a fogyasztó szervezetébe kerülő, majd az emésztést túlélő mikrobák vannak-e, és ha igen, milyen hatással a bélflóra jótékony baktériumaira. Modell mikroorganizmusként egy, a vastagbéltre egyik legjellemzőbb jótékony baktérium-nemzetség, a bifidobaktériumok egy tagját (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) választottuk.

Egyes mikrobák, illetve azok kevert tenyésztete jelen vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján megbízhatóan alkalmazhatóak biokontroll mikrobaként, anélkül, hogy a fogyasztó béltraktusába esetlegesen bekerülve, negatívan befolyásolná a hasznos bélbaktériumok működését.

Az ipari tárolási kísérlet és az élelmiszerbiztonsági kockázat meghatározása alapján el tudtuk dönteni, hogy melyik biokontroll mikrobák alkalmazhatók hatékonyan és biztonságosan.



TÉT_16_CN-1-2016-0004 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a TÉT_16_CN pályázati program finanszírozásában valósult meg.

Szakmai résztvevők:



**Dr. Antal Otilia
Dr. Hegyi Ferenc
Horváthné Dr. Szanics Enikő
Klupács Adél
Koppányné Dr. Szabó Erika
Dr. Nagy András
Némethné Dr. Szerdahelyi Emőke
Perjéssy Judit
Pék József
Sólyom Katalin
Dr. Takács Krisztina
Dr. Zalán Zsolt**

**Dr. Jianquan Kan
Dr. Muying Du
Zhirong Wang
Mengyao Jiang
Dr. Kewei Chen
Dr. Kaituo Wang**