

Eltérő laktóz átalakítási módszerek továbbfejlesztése és optimalizálása

TDK DOLGOZAT

Készítette: Vincze Otília

Biológia BSc szakos hallgató, III. évfolyam

Témavezetők: Dr. habil. Forgó Péter - főiskolai tanár

Dr. habil. Kiss Attila - főigazgató és tanszékvezető főiskolai tanár

Korózs Marietta - tudományos segédmunkatárs

EKF-TTK ÉLELMISZERKÉMIAI ÉS BIOKÉMIA TANSZÉK



Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés, célkitűzés	3
2.	Irodalmi áttekintés.....	4
2.1	Szénhidrátok és csoportosításuk	4
2.2	Prebiotikus hatással rendelkező szénhidrátok és probiotikumok	11
2.3	Enzimatisz folyamatok alkalmazási lehetőségei a glikozidos kötés hidrolízisére .	15
2.4	A humán szervezet lehetséges laktóz bontási zavarai	19
2.5	A laktóz átalakítás lehetséges kémiai és enzimatisz módszerei	20
2.6	A gliukóz enzimatisz átalakítása fruktózzá	21
2.7	Kromatográfia áttekintése és módszerei a szénhidrát analízisben.....	22
3.	Alkalmazott kísérleti módszerek és körülmények.....	24
3.1	Mikrobiológiai úton történő laktóz bontás	24
3.2	Enzimatisz laktóz hidrolízis	24
3.3	A gliukóz enzimatisz átalakítása fruktózzá, gliukóz izomeráz enzimmel.....	28
3.4	A fruktóz mikrobiális fermentációja	28
4.	Elért eredmények és értékelésük.....	30
4.1.	Mikrobiológiai úton történő laktóz bontás során elért eredmények	30
4.2.	Az enzimatisz laktóz hidrolízis vizsgálata során kapott eredmények	32
4.3.	A gliukóz átalakítás eredményei.....	41
4.4.	A fruktóz fermentáció eredményei	42
5.	Összegzés.....	47
6.	Irodalomjegyzék.....	49
7.	Köszönetnyilvánítás	56

1. Bevezetés, célkitűzés

A laktózingtolerancia és laktóz malabszorpció – vagyis a laktáz enzim csökkent aktivitása következtében kialakuló tartós laktóz felszívódási zavar - változó mértékben ugyan, de a világ felnőtt lakosságának több mint 75%-t érinti, ezzel a leggyakoribb enzimhiány okozta betegség az emberi szervezetben. A betegség manifesztálódása genetikailag determinált, előfordulása szoros korrelációt mutat az adott nép eredetével; Afrika, Ázsia és Dél-Amerika lakosságának döntő többsége szenved valamilyen laktóz felszívódási zavarban. A laktóz tolerancia főként azon etnikai csoportok esetén marad meg, ahol a tejfogyasztásnak több ezer éves hagyománya van. A laktóz felszívódási zavarok kialakulása a β -galaktozidáz enzim teljes hiányának, vagy csökkent aktivitásának köszönhető. Ugyanakkor, tanulmányok igazolták, hogy a csökkentett laktóz tartalmú (hidrolizált) tejtermékek a laktózingtoleráns emberek által is fogyaszthatók.

Célkitűzéseink ipari aspektusai közé tartozik, a laktóz fermentatív és enzimátikus átalakítására kidolgozott módszerek hatékonyságának növelése élelmiszeripari alkalmazhatóság szempontjából, melyek alkalmazása funkcionális, innovatív, az egészségre jótékony hatású, laktózmentes tejtermékek kifejlesztését teszi lehetővé, illetve lehetőséget teremt a meglévő termékpaletta színesítésére. Célunk továbbá, a tejiparban keletkező magas laktóz tartalmú melléktermékek feldolgozására megoldási lehetőségek teremtése, és új technológiák kifejlesztése élelmiszeripari célokra.

Célkitűzéseink tudományos aspektusa egy új, az irodalomban még nem közölt, háromlépéses, laktózból kiinduló folyamatsor protokolljának kifejlesztése, melynek során enzimátikus és fermentatív átalakításokat alkalmazunk. A folyamat első lépésében a laktóz glükózzá és galaktózzá történő konverziójának enzimátikus és fermentatív úton történő megvalósulásának hatékonyságát vetjük össze, ezáltal lehetőség nyílik a legmegfelelőbb hidrolitikus módszer, illetve körülmények kiválasztására ipari célokra. A tejcukor enzimátikus bontását a *Kluyveromyces lactis*-ből izolált β -galaktozidáz segítségével végezzük el, fermentatív úton pedig *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, és *Streptococcus thermophilus* probiotikus hatású mikroorganizmusokat alkalmazunk. Az enzimátikus bontás hatékonyságát több tényező - szubsztrát koncentráció, enzim koncentráció, pH-hatás, aktivátorok jelenléte, élelmiszer mátrix hatás- figyelembevételével optimalizáljuk. Második lépésben a hidrolizált laktózból származó glükóz izomerizációja

fruktózzá, glükóz izomeráz enzimmel történik. A folyamat utolsó lépésében, a szakirodalmi előzményekre is alapozva, mód nyílhat fruktózból kiinduló-cukoralkohol képződésére heterofermentatív baktériumok közreműködésével, így a konszekutív átalakítási folyamatsor végén prebiotikus hatású és diabetikus sajátságú reakcióelegyhez juthatunk. A módszer kidolgozása lehetővé teszi az emészthetetlen laktóz funkcionális diabetikus élelmiszer komponenssé –mannittá- való átalakítását.

A többlépcsős konverzió ily módon funkcionális élelmiszerek kifejlesztésére is alkalmazható lesz.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Szénhidrátok és csoportosításuk

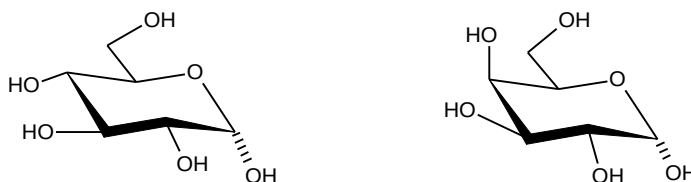
A kutatásaink során vizsgált tejcukor (laktóz) a szénhidrátok, hétköznapi nevükön cukrok csoportjába tartozik. A szénhidrátok a Földön legnagyobb mennyiségben előforduló szerves, az élő szervezetek számára nélkülözhetetlen természetes vegyületek, megtalálhatók közöttük a növény és rovarvilág váz anyagai (polimer cellulóz és kitin), sejtfal alkotó poliszacharidok és az élő szervezet számára fontos táplálék komponensek (pld. glükóz), melyek biokémiai oxidációja fedezi az élő szervezet számára fontos energiát. A biokémiai lebontás célja azonban nem csak az energiaigény fedezése, a képződő kismolekulás vegyületek (piroszőlősav, tejsav stb.) kiindulási anyagként szolgálnak az élő szervezet számára elengedhetetlenül fontos más vegyületcsoport biokémiai szintézise során (aminosavak, nukleinsav bázisok). A szénhidrátok szén és víz (hidrogén és oxigén) meghatározott arányú keverékének vegyületei (Olmsted és Williams 1997), innen ered elnevezésük. Elemi összetételük a $C_x(H_2O)_y$ általános összegképlettel adható meg, ahol 'x' és 'y' azonos vagy különböző egész számokat jelölnek (Robyt 1998).

A szénhidrátok felépítésükből fakadó sajátságaik alapján lehetnek egyszerű (monomer) és összetett (oligomer és polimer) szénhidrátok (Sanz és Martinez-Castro 2007). Az oligomer és polimer szénhidrátok savas hidrolízissel tovább bonthatók alacsonyabb

monomerszámú oligomer egységekre illetve monomer szénhidrátokra, azonban a monomerek további hidrolitikus bontása nem lehetséges.

2.1.1. Monoszacharidok

A monoszacharidok nem hidrolizálható α -hidroxi oxovegyületek, az oligoszacharidok és poliszacharidok építő kövei, amelyek az oxocsoportjuk láncon elfoglalt helye alapján további két alcsoportra oszthatók; aldózok, ha aldehidcsoportot tartalmaznak (lánc végi oxo csoport - pld. glükóz) és ketózok esetén az oxocsoport a lánc egyik szénatomján helyezkedik el (pld. fruktóz). Az oxocsoporttól legtávolabb eső kiralitáscentrum glicerinaldehidre vonatkoztatott konfigurációja határozza meg, hogy az adott származék D- illetve L-sorozatbeli monoszacharidok közé tartozik. A természetes cukrok D konfigurációval rendelkeznek, abszolút konfigurációjuk a D-glicerinaldehidből vezethető le. A szénatomszám alapján a monoszacharidokat tovább csoportosíthatjuk triózokra (3C), tetrózokra (4C), pentózokra (5C), hexózokra (6C), heptózokra (7C), októzokra (8C), nonózokra (9C) és dekózokra (10). A pentózok és a hexózok az élő szervezetekben leggyakrabban előforduló monoszacharidok. A monoszacharidok vízben jól oldódó, többnyire kristályos, általában édes ízű vegyületek (Mandl 2006). Tejben előforduló legfontosabb képviselői a glükóz és a galaktóz, melyek a laktózt felépítő monoszacharid-egységek (Stick és Williams 2009).



1. ábra: A glükóz és a galaktóz szerkezete

2.1.2. Diszacharidok

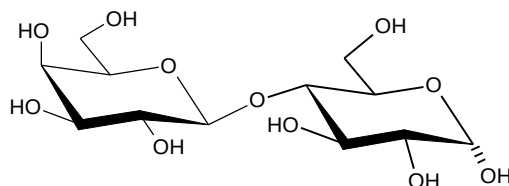
A diszacharidok két molekula monoszacharidból kondenzációval, egy molekula víz kilépésével levezethető vegyületek. A természetben előforduló leggyakoribb oligoszacharidok. A két monoszacharid között a kapcsolat kialakulhat a két glikozidos

hidroxilcsoport részvételével, vagy egyik monoszacharid glikozidos és a másik komponens valamely alkoholos hidroxilcsoportjának kondenzációjával. Előbbi esetben a diszacharidokban szabad glikozidos hidroxilcsoport nincs és ennek következtében nem rendelkeznek redukáló tulajdonságokkal, a Fehling-oldatot nem redukálják, ezért ezt a vegyület csoportot nemredukáló diszacharidoknak hívjuk. A szabad glikozidos hidroxilcsoporttal rendelkező származékok a Fehling-oldatot redukálják, ezért ezeket redukáló diszacharidoknak nevezzük (Csapó és Csapóné Kiss 2002).

A monomerek kapcsolódása során a glikozidos kötés létrehozása két módon lehetséges, az axiális térállású anomer hidroxil csoporttal létrejövő α -anomer kötést tartalmazó származék termodinamikai stabilitása alacsony, biokémiai bontása könnyen végbemegy, ezért az α -glikozidos kötést tartalmazó származékok táplálék komponensként szerepelnek az élő szervezet számára. Az ekvatoriális térállású glikozidos hidroxil csoport esetén létrejövő β -származékok termodinamikai stabilitása magasabb, a biokémiai hidrolitikus folyamatoknak jobban ellenáll ezért a β -glikozidos kötést tartalmazó származékok biológiai vázanyagok. Tejipari szempontból kiemelkedő jelentőségű szénhidrát a laktóz, hétköznapi nevén tejcukor, mely a természetben legnagyobb mennyiségben az emlősök tejében fordul elő. A laktóz (4-O- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz) D-galaktózból és D-glükózból felépülő diszacharid. Galaktóz és glükóz monomerjeit β (1-4) glikozidos kötés kapcsolja össze. A laktóz többféle fizikai szerkezetben előfordulhat; vizes oldatban a glükóz α és β anomer keverékeként van jelen, szilárd állapotában általában α változatában monohidrátként. Az α és β származékait aszerint különböztetjük meg, hogy α -D-glükóz, vagy β -D-glükóz kapcsolódik a β -D-galaktóz molekulához (McSweeney és Fox 2009). A laktóz a tej egyik legállandóbb és legfontosabb szénhidrát komponense, döntően ez járul hozzá a tej ozmózisnyomásának fenntartásához. Kevésbé édes, mint a szacharóz, fiatal korban az elsődleges szénhidrát- és energiaforrás. Vízben való oldhatósága a többi cukrokhoz viszonyítva alacsony (17,8 g/dl 25°C-on), az α és β módosulatok oldhatóságának különbségében több faktor is szerepet játszik, például a mutarotáció. A laktóz lúgokkal szemben nagyon érzékeny, már híg lúgos oldatban bomlik, savakkal szemben azonban nagyon ellenálló. Vizes oldatban melegítéskor 100°C alatt is reakcióba lép a fehérjékkel.

A laktóz az emberi szervezetben tej illetve tejtermékek fogyasztását követően a vékonybélben termelődő a laktáz enzim által alakul át. A gyógyszer- és tápszergyártás fontos alapanyaga, ipari célokra a tejipar melléktermékéből, a savóból nyerhető ki. A

három legfontosabb laktóz származék, amelyben $\beta(1\rightarrow4)$ kötés található, az izomerizációval képződő laktulóz, a redukcióval előállított laktitol, és az oxidációval képződött laktobionsav. A tejipari alkalmazásokat tekintve az enzimatis hidrolízisnek van a legfontosabb szerepe, ugyanis ez tette lehetővé a csökkentett laktóz-tartalmú tejtermékek kereskedelmi forgalmazását.



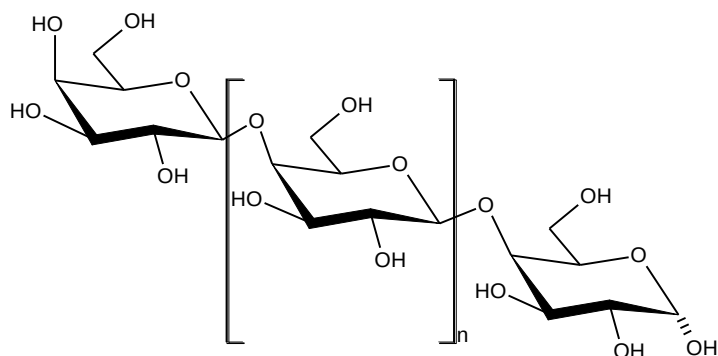
2. ábra: A laktóz szerkezete

2.1.3. Oligoszacharidok

Az oligoszacharidok néhány monoszacharidból felépülő, vízben oldódó összetett, glikozidos kötést tartalmazó vegyületek. Kondenzációs folyamat eredményeként jönnek létre; egy monoszacharid glikozidos hidroxilcsoportja ugyanolyan vagy más monoszacharid valamelyik hidroxil csoportjával vízkilépés mellett reagál. Az összekapcsolódó monoszacharid egységek száma alapján különböztetünk meg tri-, tetra-, penta-, és hexaszacharidokat. (Ha az összekapcsolt monomerek száma 7-10-nél nagyobb, már poliszacharidokról beszélünk.) Egy részük édes ízű, azonban az édes íz a monomer tagszám növekedésével csökken. Általában vízben oldhatók, a szacharózt kivéve redukáló cukrok (Setty és Veena 2002).

A tejben előforduló oligoszacharidokat két nagyobb csoportba sorolják; neutrális és savas oligoszacharidok (Gopal és Gill 2000). 150-200 különböző oligoszacharidot izoláltak különféle eredetű tejből, mint például a neutrális lacto-N-tetróz, α -3'-galaktozil-laktóz, illetve a savas NeuAc(α 2-6)laktóz és a NeuAc(α 2-3)laktóz (Mehra és Kelly 2006).

Az oligoszacharidok közül az érdeklődés középpontjába kerültek azon, két-tíz molekula glükózt és galaktózt tartalmazó szerkezetek, amelyeket galakto-oligoszacharidoknak nevezünk.

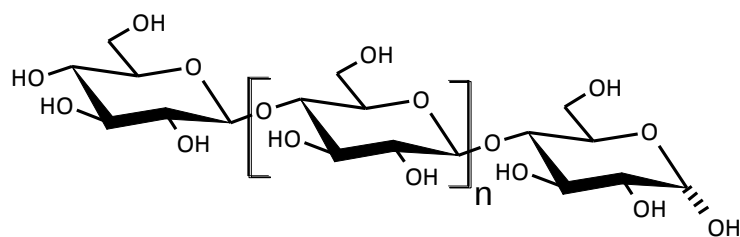


3. ábra: A galakto-oligoszacharid szerkezete
($n=3-7$)

2.1.4. Poliszacharidok

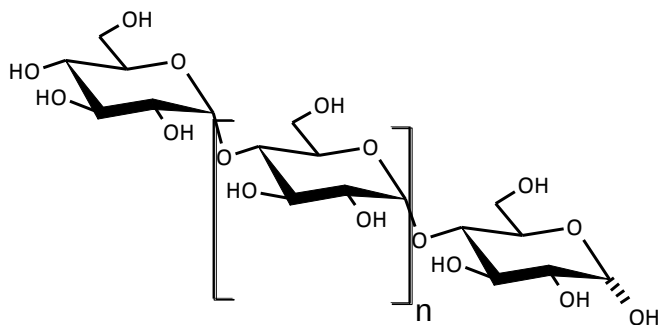
A poliszacharidok makromolekulájú szénhidrátok, melyek monoszacharidokból vagy azok származékaiból glikozid kötéssel való összekapcsolódás révén jönnek létre. Szerkezeti felépítésük az oligoszacharidokéval megegyező; a poliszacharidok is savas hidrolízisük során az őket felépítő monoszacharid egységekre bonthatók. Attól függően, hogy egyfajta monoszacharid, illetve kettő vagy többféle monoszacharid egység építi fel, beszélünk homopoliszacharidokról (keményítő, cellulóz, glikogén) és heteropoliszacharidokról (mukopoliszacharidok, hyaluronsav). Általában íztelen, vízben oldhatatlan, nagy molekulatömegű vegyületek (Csapó és Csapóné Kiss 2003). Legtöbbször tartaléktápanyagok vagy strukturális elemek.

Az élővilág legerjedtebb szénhidrát származéka a cellulóz is a poliszacharidok csoportjába tartozik. A cellulóz minden növényben megtalálható, mint a növényi sejtfal legfőbb strukturális komponense, és mint ilyen a Földön legnagyobb mennyiségben előforduló szerves vegyület. Egyenes láncú poliszacharid, a keményítőhöz és a glikogénhez hasonlóan kizárólag D-glükózegységekből felépülő biopolimer.



4. ábra: A cellulóz β -D-glükóz egységekből felépülő lineáris polimer szerkezete
($n=1.000-14.000$)

A keményítő növényi tartalék tápanyag, mely a fotoszintézis során keletkezett energia tárolására szolgál. Két poliszacharid, az amilóz (10-20%) és az amilopektin (80-90%) alkotja, mindkettőt több száz glükózegység építi fel. Megtalálható a növények gyökereiben, gumóiban, leveleiben illetve többek között a gabonafélékben is.



5. ábra: Keményítőlánc részlet: amilóz és amilopektin glükózpolicimerek keveréke
($n =$ glükóz monomerek száma, 100-10.000)

2.1.5. Cukoralkoholok

Cukoralkoholok olyan szénhidrát származékok, melyek az egyszerű cukrok redukciója során enyhén savanyú közegben képződnek. A cukoralkoholok édes ízű, színtelen, jól kristályosodó vegyületek. Redukáló csoportjuk hiányának következtében a Fehling-oldatot nem redukálják, és nem vesznek részt a Maillard-reakcióban sem. Élelmiszeripari szempontból kiemelt jelentőségű a xilit, a szorbit, a mannit és a dulcitol. Mivel nagyon lassan alakulnak át glükózzá az emberi szervezetben, kis mértékben emelik meg a vércukorszintet, így használatuk elsősorban a cukorbetegség számára készített élelmiszerekben terjedtek el.

A mannit

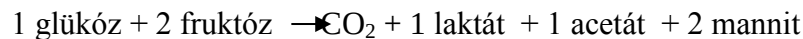
A mannit egy hat szénatomos cukoralkohol. A természetben egyik fő előfordulása a virágos kőris (*Fraxinus ornus*) kérge, amelynek édes nedvéből (manna) sikerült elsőként izolálni, ezért szokták mannakőrisnek is nevezni. Megtalálható még baktériumokban, élesztőgombákban, algákban, zúzmókban és néhány növényben (tök, zeller, hagymafélék, fagyöngy) (Helanto és mtsai. 2004). Az egészségre jótékony hatású tulajdonságokkal rendelkezik, alacsony kalória érték jellemzi; a száj mikroflórája számára emészthetetlen, emiatt nem idéz elő fogszuvasodást; nem okoz hiperglikémiát, emiatt cukorbeteg is fogyaszthatja. Feltételezhetően prebiotikus hatással rendelkezik (Hongo és mtsai. 2010), ezt igazolóan napjainkban is számos kutatás zajlik (Rodríguez és mtsai. 2012, Song és Vieille 2009). Egészségre való pozitív hatása következtében növeli az élelmiszerek tápértékét, édes, hűsítő íze van, és fele olyan édes, mint a szacharóz. Élelmiszeradalékként (E421) felhasználható, pld. cukormentes rágógumikban. Napi maximálisan fogyasztható mennyisége 20g, túlzott mértékű fogyasztása klinikai tünetekhez vezethet (Wisselink és mtsai. 2002). Ipari felhasználása széleskörű; gyógyszergyártás és az élelmiszeripar is nagy mennyiségben használja (Weymarn és mtsai. 2002). Különböző heterofermentatív tejsavbaktériumok - *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* fajok - képesek fruktózból mannit előállítására (Saha 2006).

Mannit-előállítás lehetőségei:

- Iparilag a glükóz-fruktóz (1:1) elegy katalitikus hidrogénezésével történik magas nyomáson és hőmérsékleten. Ebben a reakcióban a glükóz szorbitollá (75%), a fruktóz pedig mannittá (25%) alakul. A mannitot aztán kristályosítással választják el és tisztítják. Ezen folyamatok költségesek, így a mannit-előállításnak ez a módja relatíve drága.
- Enzimatisman mannit-előállítás fruktózból, mannit-dehidrogenázzal: a folyamat nem teljes átalakulást eredményez, továbbá a folyamat olyan drága kofaktorokat igényel, mint pld. a NAD(P)H.
- Fermentációs folyamatok során is előállítható mannit, mely a kémiai szintézissel szemben számos előnyös tulajdonsággal bír: teljes fruktóz-átalakítás mannittá, melléktermék (pld.szorbitol) képződés nélkül, a tejsavbaktériumok használata élelmiszeripari szempontból elfogadott, ezért közvetlenül adhatók az élelmiszerekhez, és a reakció lejtárszódása nem igényel drága katalizátort.

A tejsavbaktériumok segítségével történő mannit-képzésre két mód ismeretes, attól függően, hogy milyen hexóz-fermentációs utat használ a mikroorganizmus. A homofermentatív baktériumok, (pld. *Streptococcus mutans*) az Embden-Meyerhof-Parnas útvonalon, kis mennyiségű mannit-előállításra képesek. A heterofermentatív fajok közül nagy mennyiségű mannit-előállításra képes pld. a *Leuconostoc (pseudo)mesenteroides* vagy a *Lactobacillus* fajok, fruktóz vagy szacharóz jelenlétében. A hexóz fermentáció a 6-foszfoglükonát/foszfoketoláz útvonalon történik. Anaerob körülmények között, a glükóz tejsavvá, etanollá és szén-dioxiddá alakul. Aerob körülmények között az oxigén elektron-akceptorként szolgál. A mannit a fruktóz átalakítási folyamat végterméke. Optimális körülmények között teljes fruktóz redukció megy végbe (mannittá). Két különböző enzim játszik szerepet a mannit-termelésben, attól függően, hogy homo- vagy heterofermentatív mikroorganizmusokról beszélünk; mannit 1-foszfát dehidrogenáz homofermentatívak esetén, és mannit-dehidrogenáz heterofermentatívak esetén. Homofermentatív fajokban nem találtak mannit-dehidrogenáz aktivitást mostanáig (Wisselink és mtsai. 2002).

Mannit-termelés útvonala heterofermentatív tejsavbaktériumok által:



A reakció végbemeneteléhez, és maximális mannit termék képződéséhez 1:2 arányú glükóz:fruktóz elegy szükséges; a glükóz (1 mol) az ATP termeléshez nélkülözhetetlen, a fruktóz (2 mol) pedig mannit-képződéshez. Ezen optimális körülmények között a teljes fruktóz mannittá alakítható (Korakli és mtsai. 2000).

2.2 Prebiotikus hatással rendelkező szénhidrátok és probiotikumok

Definíció szerint prebiotikumoknak nevezzük az élelmiszerek azon nem emészthető összetevőit, amelyek változatlan formában jutnak el a vastagbélig és ott elősegítik, szelektíven stimulálják a hasznos, baktériumtörzsek elszaporodását, túlsúlyba kerülését (Wang 2009). (Megjegyzendő azonban, hogy ezen baktériumok (probiotikumok) prebiotikum hasznosítása törzs és szubsztrát függő (Pinheiro és mtsai 2010).)

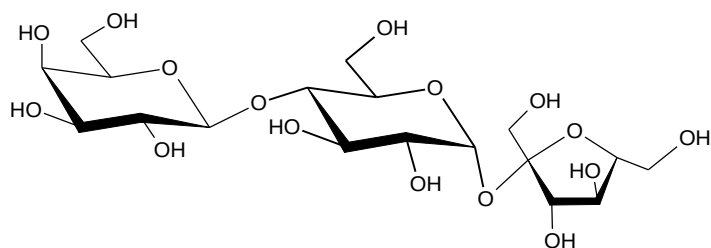
A humán szervezet számára nem emészthető oligoszacharid származékok prebiotikus hatással rendelkeznek, melyeket előnyös tulajdonságainak köszönhetően széles

körben alkalmaz az élelmiszeripar. A prebiotikus szénhidrátok élelmiszer minőségét javító hatását és az emberi egészség javulását számos pozitív fiziológiai hatásának köszönheti, mint például a vastagbél jótékony mikroorganizmusainak, bifidobaktériumainak és laktobacillusainak az anyagcseréjére és növekedésére való kedvező hatása, csecsemők esetén az immunrendszer születés utáni stimulációja, a plazma koleszterol és a vér glükóz-szintjének pozitív befolyásolása miatt (Petersen és mtsai. 2009, Tuohy és mtsai. 2005).

A prebiotikus szénhidrátok funkcionális élelmiszer adalékként is használhatók például a szacharóz helyettesítésére, amelyhez képest több előnyös tulajdonsággal rendelkezik; kevésbé édes, de számos, egészségre jótékony hatást is képesek kifejteni. Ezek közül az egyik legfontosabb az alacsony kalóriatartalom (a szacharóz vagy glükóz kiválthatósága oligoszacharidokkal, az élelmiszerek kalóriatartalmát mintegy 40%-al képes csökkenteni), továbbá megemlítendő a patogének, toxinok elszaporodásának megakadályozására való képességük, mivel kompetitív inhibitor szerepet töltenek be a bél epitheliális felületén lévő kötőhelyeken (Blaut 2002).

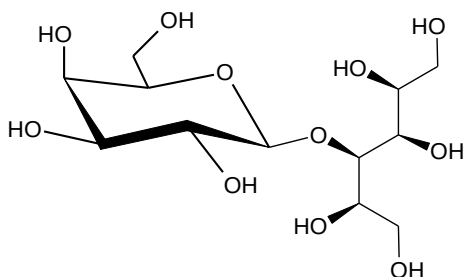
A galakto-oligoszacharid prebiotikumokat három-nyolc galaktóz egységből álló lineáris lánc alkotja, általában egy glükóz molekulával a lánc redukáló végén. A laktóz hidrolízis kinetikus intermediereként halmozódnak fel a transzglikozilációs reakciók során, a β -galaktozidáz transzgalaktozilációs aktivitása hatására (Gosling és mtsai 2010). A transzfer folyamat során egy vagy több D-galaktozil egység helyeződik át a laktóz D-galaktozil egységére (Martínez-Villaluenga és mtsai. 2008). A képződött galakto-oligoszacharid frakció mennyiségét és összetételét különböző faktorok befolyásolják, úgymint a kezdeti laktóz-koncentráció (Hsu 2007), az enzim-forrás, pH és a hőmérséklet. Glikozidázok és glikoziltranszferázok a két fő enzim típusok, amelyek katalizálják az oligoszacharidok szintetikus reakcióit (Srisimararat és Pongsawasdi 2008).

Laktózból enzimatis bontás során képződő galakto-oligoszacharid származékok a laktoszukróz, laktitol és a laktulóz, melyek emészthetetlenek prebiotikumok az emberi szervezet számára (Vera és mtsai. 2011). A laktoszukróz transzfruktozilációval képződik laktózból és szacharózból.



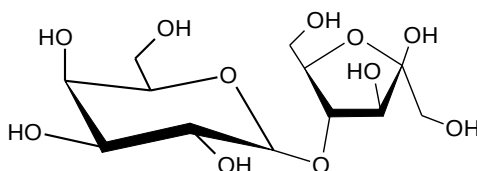
6. ábra: A laktoszukróz (laktozil-fruktozid) szerkezete

A laktitolt (nem redukáló diszacharid cukoralkohol származék, 4-O- β -D-galaktopiranozil-D-glucitol) a laktózban található D-glükóz egység kémiai redukciójával (hidrogénezésével) állítható elő, szerkezetében a galaktopiranozil gyűrűhöz egy glucitol egység kapcsolódik. Mesterséges édesítőként használják, a glikozidos kötés hasítása (galaktózzá és szorbitollá való hidrolízise) a vékonybél emésztőenzimjei által nem következik be.



7. ábra: A laktitol (4-O- α -D-galaktopiranozil-D-glucitol) szerkezete

A laktulóz (4-O-D-fruktofuranóz) a tejipari feldolgozás eredményeként képződik, és tejben valamint a savóban is jelen van. Tanulmányok igazolták, hogy a tej melegítése (110-150°C) során a laktóz izomerizáció útján alakulhat át laktulózzá, és részt vehet Maillard-reakcióban is (Fox 1997). A laktulóz a vékonybélben nem emésztődik, potenciális prebiotikus hatása van és nincs hatással a vér cukor- vagy inzulin szintjére, tehát cukorbeteg is fogyaszthatják (Wrolstad 2012).



8. ábra: A laktulóz (4-O- β -D-galaktopiranozil- β -D-fruktofuranóz) szerkezete

A galakto-oligoszacharid fogyasztásról kimutatták, hogy szignifikáns egészségügyi előnyökkel jár; ezen pozitív sajátságainak köszönhető a funkcionális élelmiszeriparban való elterjedése fermentált tejtermékekben, kenyerekben, édességekben és különféle italokban.

Probiotikumok

A WHO (World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet) meghatározása szerint a probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok, amelyek ha megfelelő mennyiségben vannak jelen a gazdaszervezetben, az egészségre jótékony hatással bírnak, ez magában foglalja a gasztrointesztinális fertőzések, gyulladásos bélbetegségek csökkentését, valamint az immunrendszer erősítését, továbbá gátat szabnak a patogén mikroorganizmusok elterjedésének (Parvez és mtsai. 2006).

Többféle faj és nemzetség tekinthető potenciális probiotikumnak, azonban a legfontosabb csoport, az általunk is használt tejsavbaktériumok (Rivera-Espinoza és Gallardo-Navarro 2010).

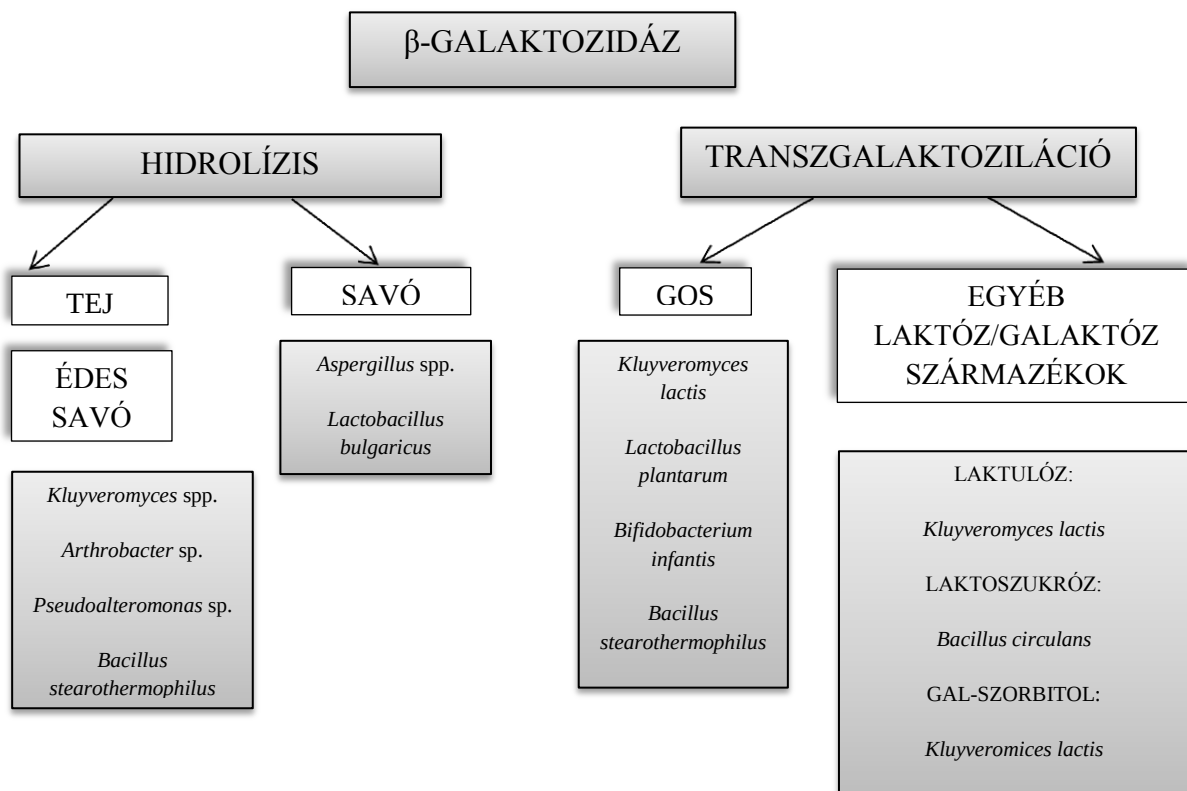
A probiotikumok WHO és a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, magyarul az Egyesült Nemzetek Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete) kritériumai alapján a legfontosabb tulajdonságok a gyomor- és epesav rezisztencia, a mukóza (nyálka) és epithel- (hám)sejtekhez való tapadás képessége, és a potenciális patogén baktériumok növekedésének gátlása. A manapság elérhető probiotikus élelmiszerek nagy része tejalapú (a joghurt és a joghurt- alapú termékek a probiotikus szervezetek a legnépszerűbb hordozó közegei (Dave és Shah 1997)), azonban voltak próbálkozások gabonafélék bevonására is (LeBlanc és Todorov 2011).

2.3 Enzimatisz folyamatok alkalmazási lehetőségei a glikozidos kötés hidrolízisére

Az enzimek (természetes polipeptidek) a szervezet biokatalizátorai, minden élő sejtben jelen vannak, és ott az anyagcsere-folyamatokban vesznek részt. Az enzimek szubsztát vagy reakció specifikus tulajdonságokkal rendelkező természetes katalizátorok, tehát csak adott vegyület, vegyületcsoport átalakulását vagy biokémiai reakció lejátszódását segítik.

Az enzimeket a Nemzetközi Biokémiai Unió Enzimológiai Albizottsága (EC) javaslata alapján a következő hat főcsoportba soroljuk: oxido-reduktázok (EC1), transzferázok (EC2), hidrolázok (EC3), liázok (EC4), izomerázok (EC5) és ligázok (EC6).

A kutatásaink során felhasznált β -galaktozidáz (EC 3.2.1.23) – triviális nevén laktáz - enzim a hidrolázok csoportjába tartozik (Boeris és mtsai. 2012). A hidrolázok lebontási (hidrolízis) folyamatokban vesznek részt és a szubsztát kovalens kötéseit víz részvételével reverzibilisen bontják. A hidrolázok csoportosítására a szubsztátokban hidrolizált kötés szerkezete alapján lehetséges; a glikozidázok a szénhidrát származékok O-glikozid, N-glikozid és S-glikozid kötéseit hidrolizálják. A β -galaktozidáz a glikozidázok csoportjába tartozó enzim, amely a galaktóznak azon származékait (laktóz) hidrolizálja, amelyekben a glikozidos kötés β -térállással rendelkezik. A laktóz hidrolízisén kívül, galakto-oligoszacharidokat is képes szintetizálni (Jochems és mtsai. 2011). A β -galaktozidázok a glikozil hidrolázok családjába tartoznak (GH1, GH2, GH35, GH42) (Gänzle 2012), biotechnológiai felhasználásuk (élelmiszeripar, tejipar) a tejben és édes-savóban kifejtett katalitikus laktóz bontáson (hidrolitikus) alapul. Hagyományos felhasználásuk mellett az utóbbi években került előtérbe transzgalaktozilációs aktivitásuk is, amely során funkcionális galaktozilált vegyületeket szintetizálnak (Oliveira és mtsai. 2011).



9. ábra: β -galaktozidázok biotechnológia alkalmazása: különböző mikrobiológiai forrásokból izolált enzimek felhasználásának lehetőségei (Oliveira és mtsai. 2011)

A galaktozidázok transzgalaktozilációs aktivitásuk következtében maximálisan képződő galakto-oligoszacharid mennyiséget különféle faktorok befolyásolják, úgymint a szintézishez használt enzim forrása (Cardelle-Cobas és mtsai. 2011), kezdeti laktóz koncentráció és a reakció körülményei. A legnagyobb mértékű galakto-oligoszacharid képződés 50-80%-os laktóz hidrolízis mellett valósul meg (Neri és mtsai. 2009).

A β -galaktozidáz számos élő szervezetben megtalálható; többek között mikroorganizmusokban, egyes gombákban, növényi és állati sejtekben (Vasiljevic és Jelen 2002). A tudományos vizsgálatok eredményei alapján egyre több mikroorganizmusról derül ki, hogy potenciális β -galaktozidáz források lehetnek. Ezekből persze csak néhány alkalmas élelmiszeripari felhasználásra.

A kereskedelmi forgalomban használt β -galaktozidáz enzimek különböző forrásokból származhatnak, de leggyakrabban gombákból, például *Aspergillus oryzae*, *A. niger* és élesztőgombákból, például *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* izolálnak (Xu és mtsai. 2012), mivel ezen fajok produktivitása elfogadható, az enzim relatíve könnyen kinyerhető, továbbá emberi fogyasztásra alkalmasnak és biztonságosnak elismertek

(GRAS státusz), ami az élelmiszeriparban egy elsődleges kritérium (Freitas és mtsai. 2011).

A *K. lactis*-ból kivont β -galaktozidáz (LAC4 gén kódolja) napjainkban nagy érdeklődés központjában áll a savó-újrahasznosítás körében. Közel neutrális pH optimuma van (6,0-7,0), ezért széles körű felhasználást biztosít; kiválóan alkalmas például a tejben lévő laktóz hidrolízisére is, már csak azért is, hiszen a tej K^+ -t és Mg^{2+} tartalommal is rendelkezik, amelyek az enzim aktivitását elősegítik. Előnye az *A. niger*-hez képest, hogy magasabb az enzimaktivitása, hátránya, hogy mivel intracelluláris közegben található, előállítása költsége magasabb. Az *Aspergillus* fajokból izolált enzim az extracelluláris közegben található, és savas tartományban van pH optimuma (2,5-5,4), ezért túlnyomó részt a sajtgyártás során melléktermékként képződött savó hasznosítására használják. Funkcionális élelmiszeripari felhasználásuk szempontjából megemlítendő a tejsavbaktériumok (beleértve laktokokkuszek, streptokokkuszek, laktobacillusok változatos csoportját) és a bifidobaktériumok is, amelyek ugyancsak biztonságos β -galaktozidáz forrásoknak tekinthetők.

Enzimforrás	Molekula tömeg (*10 ³ kDa)	pH optimum	Optimális hőmérséklet (°C)	Aktivátorok	Inhibitorok
<i>Kluyveromyces lactis</i>	228	6,5 – 7,3	35 – 37	K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+}	Ca^{2+} , Na^+

1. táblázat: A β -galaktozidáz enzim működésének optimális paraméterei
(Quinn és mtsai. 2001)

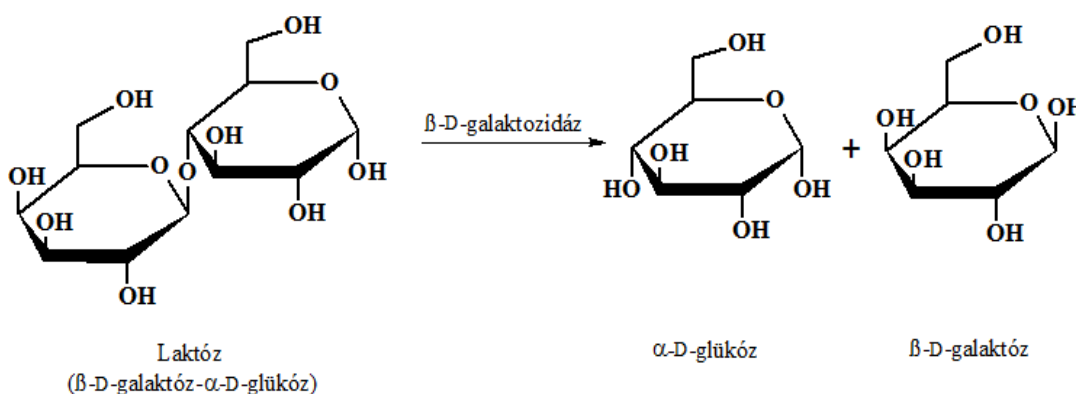
Az enzim működés szempontjából fontos tényező a pH tartomány megválasztása. Az enzimatis laktóz bontás során két monoszacharid képződik. Kontrollált körülmények (pH és hőmérséklet) között a pH változása nem jelentős, azonban mikrobiológiai bontás során a további bontási reakciók termékei (piroszölösavból esetlegesen képződő tejsav és a dekarboxilezési reakciók szénsavas terméke) a pH jelentős csökkenését eredményezi, ami

az enzimatis aktivitás csökkenésével jár. Ez magyarázza a mikrobiológiai bontás gyenge hatékonyságát (Tej és tejtermékek).

Az enzimek jelentős része híg sóoldatban hatékonyabban működik, mivel az enzim aktív konformációja stabilizálódik és ennek következtében a reakció sebesség is nő. Az oldott és disszociált sók kationjai vagy anionjai is gyakorolhatnak az enzimekre aktiváló hatást, a fémek beépülhetnek az enzimek molekulába, többek között a magnézium ionok esetén figyelhető meg ilyen jellegű aktiváló hatás.

A laktóz hidrolízise β -D-galaktozidázzal:

A laktóz bontás mechanizmusát először Wallenfel írta le, aki *E. coli*-ból izolált laktáz enzimet használt. A folyamat első lépése a laktóz glükózzá és galaktózzá történő hidrolízise.

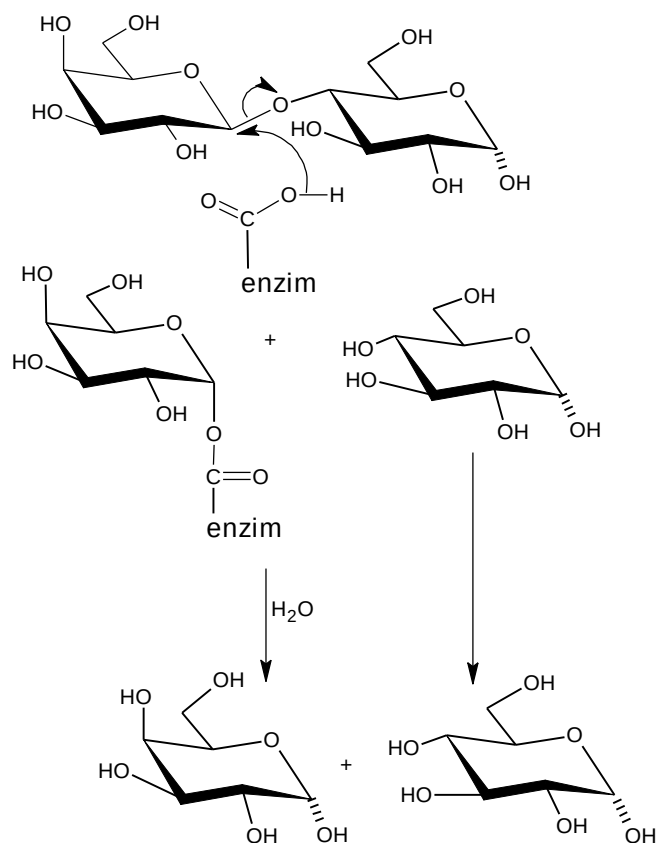


10. ábra: A laktóz hidrolízis folyamata

Ezt követően a glükóz glikolitikusan, a galaktóz pedig a Leloir-útvonalon (Sellick és mtsai. 2008) alakul tovább. β -D-galaktozidáz katalitikus része a glutaminsav, amely proton donorként és nukleofil/bázisként van jelen a reakcióban.

1. Első lépés az enzim-galaktozil komplex forma kialakulása, és ezzel egyidejű glükóz-felszabadulás.

2. Második lépésben egy hidroxil csoportot tartalmazó akceptor transzferálódik az enzim-galaktozil komplexre. Az akceptor (R-OH) pl. víz, hidrolízis során felszabadítja a galaktózt. Az akceptor másik cukor komponens is lehet, ebben az esetben di-, tri- vagy poliszacharid képződik (Quinn és mtsai 2001).



11. ábra: Az enzimatis laktóz hidrolízis folyamatábrája

2.4 A humán szervezet lehetséges laktóz bontási zavarai

A laktóztolerancia és laktóz malabszorpció a világ felnőtt lakosságának több mint 75%-át érintő jelenség; köszönhetően a β -galaktozidáz enzim teljes hiányának, vagy csökkent aktivitásának (Nichele és mtsai 2011). Megfelelő laktáz-aktivitással rendelkező egyéneknél a bevitt laktóz megemésztődik a vékonybélben. Laktáz-hiány betegségben szenvedő emberek esetében a laktáz aktivitása nem elegendő, hogy elhidrolizálja a teljes

bevitt a laktóz mennyiség 100% -át. Ilyenkor a reziduális laktóz eléri a vastagbelet, ahol bakteriális β -galaktozidázok által kettéhasítódik glükózzá és galaktózzá, majd a bél mikroorganizmusai fermentálják, mely folyamat klinikai tünetekhez vezet (Castro és mtsai. 2011). A bakteriális laktóz fermentáció köztes metabolitjai például a laktát, etanol és szukcinát, végtermékei pedig rövid szénláncú zsírsavak, különféle gázok, mint hidrogén, szén-dioxid, és metán (Venema 2011).

A laktóz felszívódási zavarokat a tünetek súlyosságától függően többféleképpen lehet definiálni, hiszen a zavarok nem feltétlenül, de okozhatnak kellemetlen gasztrointesztinális tüneteket (Brown-Esters és mtsai. 2012). Ennek alapján különböztethető meg a laktáz-deficit, a laktóz malabszorpció, vagy a laktóz intolerancia jelensége (Shaukat és mtsai 2010). A különböző tünetek súlyossága variábilis, az egyéni tolerancia kialakulásában - a laktáz aktivitáson kívül – egyéb faktorok is szerepet játszanak, úgy, mint a kor, a nem, az elfogyasztott laktóz mennyisége illetve különböző bélműködési rendellenességek. A betegség genetikailag determinált és gyakorisága korrelációt mutat az adott népesség eredetével (Szilagyi 2002).

A laktóz felszívódási zavarok az alacsony kalciumbevitel miatt rizikófaktorai lehetnek egyéb krónikus betegségek, például a hipertenzió kialakulásának, ezért táplálkozási szempontból fontos, hogy a laktóz-érzékeny egyének is jussanak kellő mennyiségű tejhez, illetve megváltoztassák étrendi szokásaikat. Lehetséges alternatívák például az étkezés közbeni tejfogyasztás, aktív kultúrákat tartalmazó joghurtok, sajtok, csökkentett laktóz-tartalmú tejtermékek fogyasztása, laktáz-kiegészítők bevétele laktóz tartalmú ételek fogyasztása előtt.

2.5 A laktóz átalakítás lehetséges kémiai és enzimatisz módszerei

A β -galaktozidázokat többféle módon fel lehet használni laktóz-hidrolízisre tejben illetve savóban. Az eljárás megválasztása függ a szubsztrát természetétől és az enzim tulajdonságaitól. A legegyszerűbb eljárás - amelyet a csökkentett laktóz-tartalmú tejeznél is alkalmaznak – az egyszer-használatos, oldott enzimek általi hidrolízis. A folyamat hátránya, hogy jelentős mennyiségű enzimet igényel, emiatt nem túl gazdaságos. Az enzimek immobilizált formában is reakcióba vihetők, amely folyamatban az enzim kémiaailag vagy fizikailag kötött egy szilárd (homogén) mátrixhoz, vagy membrán-alapú

rendszerhez. Ez az eljárás lehetővé teszi az enzimek ismételt felhasználását (Haider és Husain 2009).

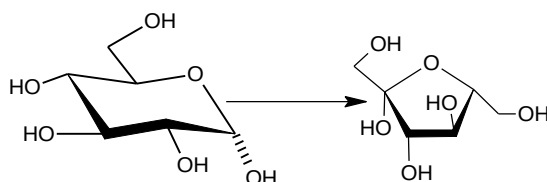
A laktózmentes, ultramagas hőmérsékleten kezelt tejek (LF-UHT) előállítása során, a hatékonyság növelésére különböző lehetőségek vannak, mint például az enzimátikus hidrolízist megelőző bizonyos mennyiségű laktóz-tartalom kivonása, vagy eltérő eredetű enzimek használata. Kutatásokban igazolták továbbá, hogy a hidrolízist megelőző melegítéssel a lizin – esszenciális aminosav – jelentős vesztesége kiküszöbölhető (Ruiz-Matute és mtsai 2012). A laktózmentes tejek nagymennyiségű redukáló monoszacharidot tartalmaznak, ami hajlamosabbá teszi őket a romlásra, mint a közönséges UHT tejet. Ennek oka, hogy a Maillard-reakció során a monoszacharidok reakcióképesebbek, mint a laktóz (Harju és mtsai. 2012).

A laktóz hidrolízise erős savak híg oldatával is lehetséges. A nem redukáló diszacharidokhoz képest, a laktóz relatíve ellenálló a savas hidrolízisnek. A reakció kezdeti termékei egyenlő arányban monoszacharid komponensek, glükóz és galaktóz. A hidrolízis mértéke az idő, a hőmérséklet és a koncentráció függvényében változik. A nem-enzimátikus laktóz-átalakítás egy másik lehetséges módja a Lobry-de-Bruyn-van-Alberda-van-Ekenstein izomerizáció, amely során a laktózból különböző savak és egyéb cukrok képződnek. Harmadik féle nem-enzimátikus laktóz-átalakítási folyamat a Maillard reakció, amely során a laktóz tej kazeinekkal reagál (Baptista és Carvalho 2004).

2.6 A glükóz enzimátikus átalakítása fruktózzá

A glükóz átalakítása fruktózzá enzimátikus úton, glükóz izomerázzal (EC 5.3.1.5) lehetséges. A reakció reverzibilis, a folyamat eredményeképp fruktóz képződik (Moreau és mtsai. 2000).

A glükóz izomeráz (vagy más néven xilóz-izomeráz, Borgi és mtsai. 2004) enzimet általában *Streptomyces* baktériumokból (pld. *Streptomyces murinus*-ból), illetve *Arthrobacter* fajokból izolálják (Lee és Hong 2000), de kinyerhetők *Flavobacterium* és *Bacillus* fajokból is (Tükel és Alagöz 2008). A glükóz izomeráz optimális hőmérsékleti tartománya 60-80°C, optimális pH tartománya 7,0-7,5, aktivátorai irodalmi adatok alapján a Mg^{2+} , Mn^{2+} és Co^{2+} (Gaily és mtsai. 2010).



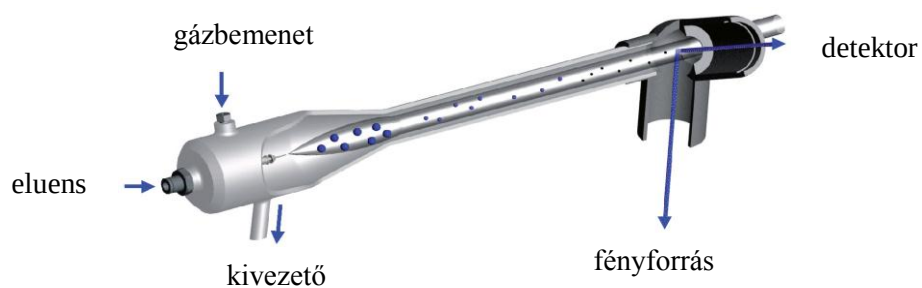
12. ábra: A glükóz izomerizációja fruktózzá

2.7 Kromatográfia áttekintése és módszerei a szénhidrát analízisben

A XX. század elejétől kezdve a kromatográfias és általában a különböző elválasztástechnikai módszerek jelentős fejlődésnek indultak. A hatvanas években a folyadékkromatográfia műszeres analitikai eszközeinek és az oszloptöltetek fejlesztésével kialakult a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), amely a kromatográfia módszereit és gyakorlatát teljesen új alapokra helyezte. A HPLC fejlődése, előrehaladása tette lehetővé az oligoszacharidok hatékony analitikai meghatározására alkalmas eljárások kidolgozását is. Szénhidrát analízisre, kimutatására a megbízhatósága, pontossága, elválasztó képessége és gyorsasága miatt a legalkalmasabb a HPLC eljárás (Ferreira és mtsai. 1998). A folyadékkromatográfias vizsgálatok céljaira számos detektálási módszer alakult ki, amelyek közül a leggyakrabban használatosak az ultraibolya-látható (UV-VIS) tartományban a fényelnyelésen alapuló detektorok, a fluoreszcencia mérésén alapuló (RF), a törésmutató (RI) változás mérésén alapuló, valamint az elektrokémiai (amperometriás) és vezetőképességi, vagy a fényszórás elvén működő (ELS) detektorok (Kremmer és Torkos 2010). A preparatív HPLC eljárás lehetővé teszi nagyobb mennyiségű szénhidrátok elválasztását és tisztítását. A fényszórás elvén működő ELS (Evaporation Light Scattering) detektor a vizsgált minta komponens fénytörési tulajdonságait használja fel a detektálási folyamatban és alkalmazása elsősorban az UV/VIS aktivitással nem rendelkező vegyületek meghatározására terjed (Ziad el Rassi 1995).

A vizsgálatok elvégzéséhez az ELS detektort alkalmaztuk. Az ELS detektorok a folyadékkromatográfias eljárással elválasztott komponenseket tartalmazó áramló fázist porlasztják, adott hullámhosszúságú fénnel való megvilágítása során a fényszóródás mértékét használják az analitikai paraméterek meghatározásához, azonban a módszer kevésbé érzékeny, mint az UV-VIS detektálás (Lucena és mtsai. 2007, Beilmann és mtsai. 2006). Szénhidrátok analízisére a folyadékkromatográfiában használatos törésmutató és

elektrokémiai detektoroknál az ELSD pontosabb, megbízhatóbb, gradiens elúció mellett történő detektálási lehetőséget biztosít (Corradini 2011).



13. ábra: Az ELSD detektor felépítése

3. Alkalmazott kísérleti módszerek és körülmények

3.1 Mikrobiológiai úton történő laktóz bontás

3.1.1. Baktérium kultúrák növekedésének optimalizálása

Mikrobiológiai kutatásaink során *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, és *Streptococcus thermophilus* probiotikus hatású tejsavbaktériumokat használtunk fel, melyek mindegyike elfogadott élelmiszeripari szempontokból is.

A három tejsavbaktérium izolátum laktóz bontó hatékonyságát vizsgáltuk, 1,0-3,0 g/100ml koncentrációjú pepton (a beoltott mintákhoz a baktérium jobb életműködését szolgálva adtunk pepton fehérjét) mellett. A mérést 24 órán keresztül végeztük, denzitás mérés 0-10. h között óránként, majd az utolsó órában (24.) történt. Az előzetes mikrobiológiai hatás szempontjából (magas denzitás, alacsony pH) a 2 és 3 g/100ml koncentrációjú pepton minták bizonyultak a leghatékonyabbnak (17. és 18. ábra), ezért ezen minták analitikai vizsgálatát végeztük el.

3.2 Enzimatis laktóz hidrolízis

Az enzimek működését több környezeti faktor (pH, hőmérséklet, reakció közeg) képes befolyásolni, emiatt szükséges az enzim működésének optimális körülményeit meghatározni.

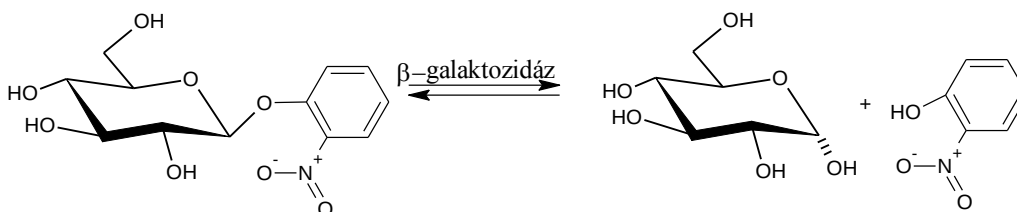
3.2.1. Enzimaktivitás és pH optimum meghatározása spektrofotometriás úton

Az enzimatis bontáshoz a *Kluyveromyces lactis* élesztő kultúrából izolált laktozim enzimet használtunk (2600 UN aktivitás, G3665-50ml, Sigma), melynek optimális hőmérséklet tartománya 35-37°C, az optimális pH tartomány pedig 6,5-7,3, irodalmi adatok alapján (2.4 fejezet, 2. számú táblázat).

Az enzim működését pH=4,5 – 7,3 között vizsgáltuk, a pH-tartomány megválasztása az enzim optimális pH tartományán belül történt, figyelembe véve, hogy a tejtermékek fermentációja során történő pH csökkenés (pH 6,8 – 4,5) hatással van az enzim működésére.

A β -galaktozidáz aktivitás meghatározása spektrofotometriás módszerek alkalmazásával történt, V-650 típusú spektrofotométerrel, 416 nm hullámhosszon.

Az enzim aktivitást a bontási reakciósebesség mérésével határoztuk meg, amely során *o*-nitrofenol- β -D-galaktozid glikozidos kötését hasítottuk az előre meghatározott kísérleti körülmények között. Az adott idő alatt termelődött *o*-nitrofenol fotometriásan meghatározott mennyiségéből a Michaelis-Menten illetve Lineweaver-Burk összefüggések alapján a $V_{\max}$ (maximális bontási sebesség) K_M és az enzim aktivitás értékei meghatározhatók. A kinetikai vizsgálatokat a 2-10 perc intervallumon belül, 37°C-on, Mg^{2+} , K^+ -aktivátorok jelenlétében 0,5-10 mM szubsztrát koncentráció sorral különböző pH értékeken mérve az enzim aktivitás és a főbb kinetikai paraméterek változását.



14. ábra: *o*-nitrofenol- β -D-galaktozid enzimatis hidrolízise

3.2.2. Szénhidrát analízis HPLC-ELSD-vel

A kísérletek során HPLC módszereket alkalmaztunk szénhidrátok kvalitatív és kvantitatív detektálására. A kromatográfiás méréseket Shimadzu LCMS-2010EV készülékkel és gázfázisú fényszóráson alapuló detektálás (Polymer Laboratories, PL-ELS-2100) mellett végeztük el Prevail (250x4,5, 5 μ m) oszlop felhasználásával, gradiens elúcióval, 0,8 ml/perc áramlási sebességgel. Az alkalmazott gradiens program a következő volt laktóz hidrolízis, és glükóz izomerizáció vizsgálata esetén: t(B%): 0(70)-15(62)-17(70)-21(70), illetve a mannit fermentatív képződésének nyomon követésekor: t(B%): 0(85)-20(50)-27(85)-35(85). A detektálási körülmények a következők voltak: párologtatási hőmérséklet 90°C, ködképzési hőmérséklet 50°C, 1,2 l/perc nitrogén áramlási sebesség mellett.

3.2.3. A β -galaktozidáz enzim koncentrációjának hatása a laktóz hidrolízis mértékére

A β -galaktozidáz enzimet különböző koncentrációkban; hígítatlanul, ötszörös, tízszeres, huszonötszörösére, ötvenszeresére, százszorosára hígítva vizsgáltuk, 2 μ l/ml mennyiségben adagoltuk a laktóz oldathoz (0,1 M KH_2PO_4 pufferben; pH=6,8). Az enzimatis bontást 37°C hőmérsékleten, az enzim optimális pH-ján (pH 6,8), 24 órán keresztül hajtottuk végre.

3.2.4. pH-érték-változás β -galaktozidáz enzimre gyakorolt hatása

Az enzim laktóz-bontási hatékonyságát 5,5-7,5 pH tartományban vizsgáltuk. A laktóz mintákhoz hígítás nélkül 2 μ l/ml koncentrációban adtuk az enzimet.

3.2.5. β -galaktozidáz enzimaktivitásának növelése enzim pH optimuma alatt (pH 5,5) magnézium-ion aktivátorral

A kísérleteink során magnézium sót (MgCl_2) használtunk 1-10 mM koncentrációban, kontrollként MgCl_2 nélkül készült enzim oldatot használtunk.

3.2.6. β -galaktozidáz enzim hatékonyságának növelése zselatin hozzáadásával

Az enzim működés hatékonyságának növelése céljából 1%-os zselatint adtunk a mintákhoz pH 6,8 (az enzim pH optimuma) és pH 5,5-ön. Az enzimet 2 μ l/ml koncentrációban, hígítatlanul és tízszeresére hígítva alkalmaztuk.

3.2.7. β -galaktozidáz enzimaktivitásának növelése $MgCl_2$ és zselatin kombinációja jelenlétében

$MgCl_2$ és zselatin kombinációjának az enzimműködésre gyakorolt vizsgálata során pH 5,5 és 6,8 pH tartományt vizsgáltuk. A laktóz mintákhoz két koncentrációban adtuk a β -galaktozidáz enzimet, hígítás nélkül és tízszeresére hígítva.

3.2.8. β -galaktozidáz működésének vizsgálata különböző élelmiszer mátrixban

A mátrix-hatás vizsgálatok során a laktóz enzimatis (β -galaktozidáz) hasítására kidolgozott kísérleti körülmények optimalizálását végeztük az élelmiszer mátrixhoz közeli modellek – fehérje, szénhidrát, növényi olaj közegek – alkalmazásával.

A vizsgálatok során 4,5 g/100ml koncentrációjú laktóz oldatot készítettünk 0,1 M KH_2PO_4 pufferben (pH=6,8). A tízszeresére hígított enzim oldat (216,6 UN) 20 μ l mennyiségét adagoltuk a laktóz tartalmú mintákhoz, amelyek egyenként 1% keményítőt, zselatint és növényi olajat (étkezési napraforgó olaj) tartalmaztak puffer oldatban. Az enzimatis bontást 37°C hőmérsékleten temperálva 24 órán keresztül hajtottuk végre.

3.2.9. Valós minta-tejcukor koncentrátum β -galaktozidázzal végzett enzimatis hidrolízise

Valós minta, Kuntejtől származó tejipari melléktermék- laktóz koncentrátum, enzimatis hidrolízisét vizsgáltuk, a β -galaktozidáz optimális működési körülményei között. A kiindulási pH 5,9, a kiindulási laktóz-koncentráció 16 g/100ml volt. A vizsgálatot pH beállítás mellett (pH 6,8) végeztük el, 2 μ l/ml hígítatlan enzim hozzáadásával.

3.3 A glükóz enzimatisz átalakítása fruktózzá, glükóz izomeráz enzimmel

A folyamat során *Streptomyces murinus*-ból izolált Sweetzyme enzimet (Sigma G4166-50G, 350 UN) használtunk immobilizált formában az elhidrolizált laktózból származó glükóz átalakítására. A glükóz izomerizációját pH 6,8-on, 37°C és 70°C-on, 10-50 mg/ml enzim koncentráció mellett vizsgáltuk. Az enzim hatékonyabb működésének érdekében magnéziumot (MgCl₂, 5mM koncentrációban), és 1% zselatint adagoltunk a mintákhoz. A reakció idő 24-48 óra volt. Az enzimaktivitás meghatározását különböző hőmérséklet, illetve változó enzim és magnézium koncentráció mellett vizsgáltuk.

3.4 A fruktóz mikrobiális fermentációja

A fruktóz mikrobiális fermentációja során *Leuconostoc* és *Lactobacillus* törzsek mannit- termelésének vizsgálatát végeztük fruktán szubsztráton.

Felhasznált baktériumok a *Leuconostoc citreum* (DSM 5577), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (DSM 20193) és *Lactobacillus brevis* (DSM 20556), az alábbiakban ismertetett tápoldatokban és táptalajokon lettek tenyésztve.

Az alkalmazott tápoldatok összetétele:

MRS (de Man, Rogosa and Sharpe Agar) tápoldat	
Tápoldathoz hozzáadott komponens	Koncentráció (g/l)
proteáz pepton	10
marhahús kivonat	10
élesztő kivonat	5
poliszorbát 80	1
ammonium-citrát	2
nátrium-acetát	5
MgSO ₄	0,1
MnSO ₄	0,05
K ₂ HPO ₄	2
fruktóz	40
glükóz	20

2. táblázat: MRS tápoldat összetétele (Otgonbayar és mtsai. 2011)

Simplified production (SP) medium	
Tápoldathoz hozzáadott komponens	Koncentráció (g/l)
tripton	10
élesztő kivonat	10
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄	0,2
MnSO ₄	0,01
fruktóz	100
glükóz	50

3. táblázat: Simplified production tápoldat összetétele (Weymarn és mtsai. 2002)

Simplified medium	
Tápoldathoz hozzáadott komponens	Koncentráció (g/l)
tripton	10
élesztő kivonat	5
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄	0,2
MnSO ₄	0,01
CaCl ₂	0,02
NaCl	0,02
fruktóz	30
glükóz	15

4. táblázat: Simplified tápoldat összetétele (Otgonbayar és mtsai. 2011)

Alkalmazott táptalajok:

1. tápoldat: MRS
2. tápoldat: Simplified production (SP) medium
3. tápoldat: Simplified medium

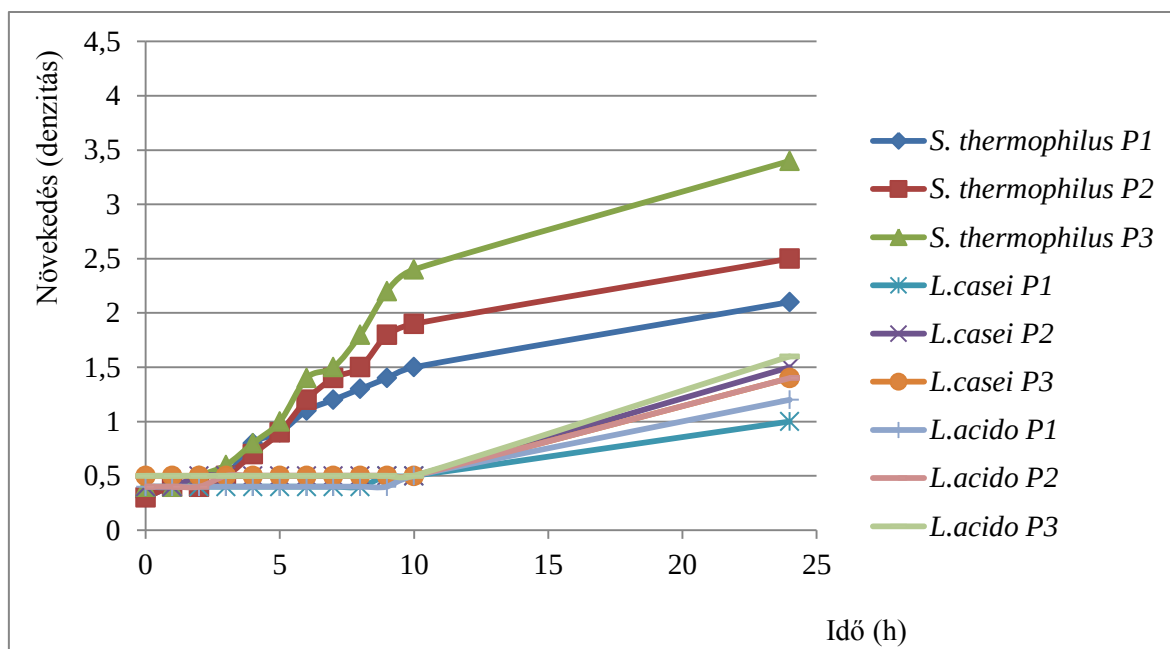
A fermentáció során alkalmazott hőmérséklet minden vizsgálatnál 30 C° volt. Denzitás mérés 0, 4, 8, 24 és 48 óra elteltével, csíraszám meghatározás 0, 8, 24 és 48 óra elteltével történt.

Elért eredmények és értékelésük

4.1. Mikrobiológiai úton történő laktóz bontás

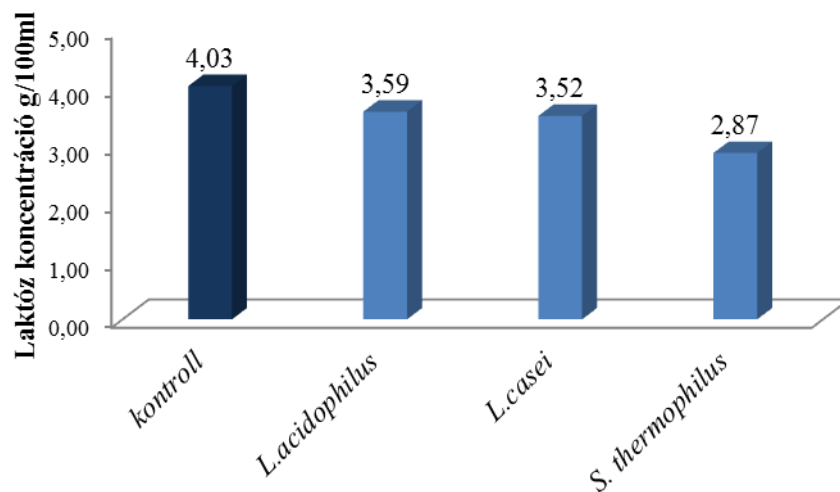
4.1.1. Baktérium kultúrák növekedésének optimalálása

A mikrobiológiai vizsgálatok során (pH, denzitás) a három tejsavbaktérium közül, mindhárom pepton koncentráció esetén, a *Streptococcus thermophilus* érte el a legnagyobb növekedést. A szaporodás mértéke a 2 és 3%-os pepton koncentráció esetén adódott a legnagyobb mértékűnek, emiatt csak ezek a minták kerültek analitikai vizsgálatra.

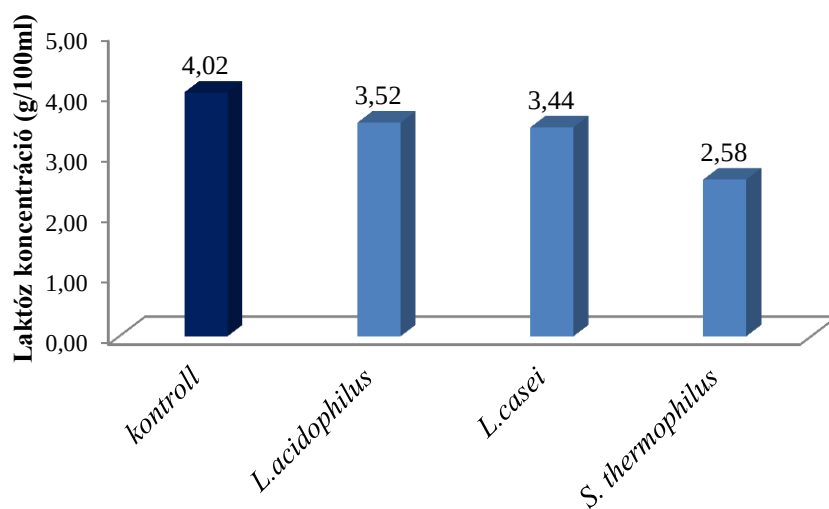


15. ábra: A baktériumok növekedési görbéje 1-2-3%-os pepton koncentráción

Az analitikai vizsgálatok során kapott 2 és 3 g/100 ml peptont tartalmazó minták eredményeit az alábbi ábrákon (17. és 18. ábra) találhatók. A leghatékonyabb laktóz bontó hatást a mikrobiológiai eredményekkel korrelálva, a *Streptococcus thermophilus* mutatta. A kezdeti 4 g/100ml laktóz koncentrációról 2,87 illetve 2,85 g/100ml értékre csökkent ezekben a mintákban, mely 28-35%-os laktóz hidrolízisnek felel meg.



16. ábra: 2 g/100 ml peptont tartalmazó minták eredményei

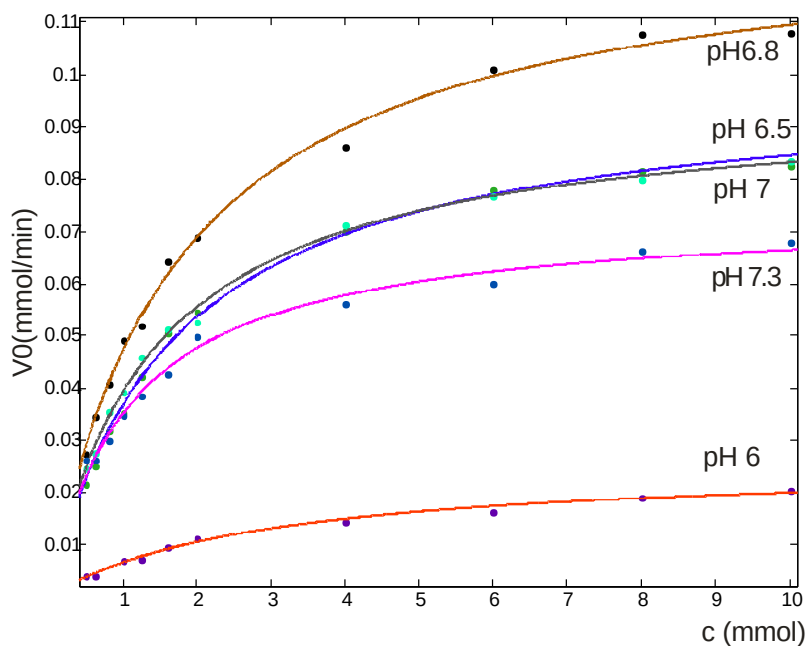


17. ábra: 3 g/100 ml peptont tartalmazó minták eredményei

4.2. Az enzimatis laktoz hidrolízis vizsgálata

4.2.1. Enzimaktivitás és pH optimum meghatározása spektrofotometriás úton

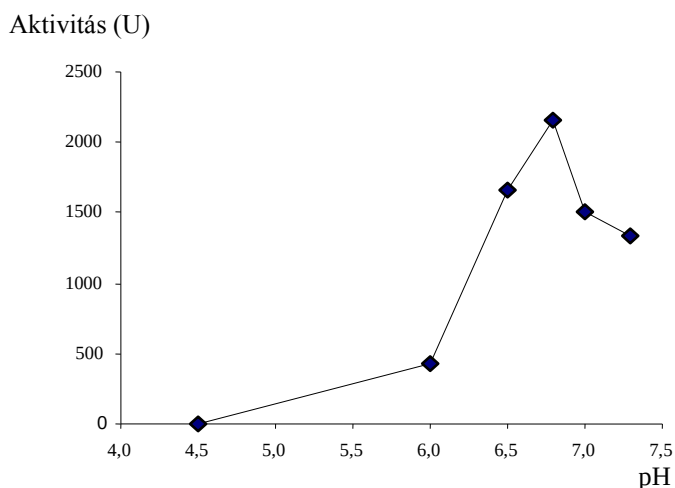
A vizsgálat során a laktozim enzim aktivitását különböző pH-értékeken (4,5-7,3) vizsgálva, 37°C-on és K^+ - és Mg^{2+} -aktivátorok jelenlétében pH 6,8 esetén kaptuk a legnagyobb aktivitás értéket (2166 U) amely az enzimre megadott irodalmi értékhez közelinek bizonyult (2600 U). Az aktivitás pH-függése fontos információt ad a tejtermékek fermentációja során történő pH-csökkenés hatására bekövetkező enzim aktivitás csökkenésére: a kiindulási tej pH-ja 6,8-6,9 értéktől csökken pH=4,5-5,0 tartományba, ami az enzim aktivitásának csökkenését eredményezi (pH=6 esetén 500 U aktivitás mérhető, pH=4,5 esetén nem mérhető az enzim aktivitása).



18. ábra: A reakciósebesség változása a szubsztrát koncentráció függvényében a 0-10 mmol koncentráció tartományban különböző pH viszonyok esetén.

pH	$V_{\max}$ (mM*min ⁻¹)	K_M -állandó (mM)	Enzim aktivitás (U)
4,5	-	-	-
6,0	0,026	2,9	433
6,5	0,1	1,908	1666
6,8	0,13	1,837	2166
7,0	0,09	1,46	1500
7,3	0,08	1,44	1333

5. táblázat: a 18. ábra görbéi segítségével számított kinetikai paraméterek változása a pH függvényében

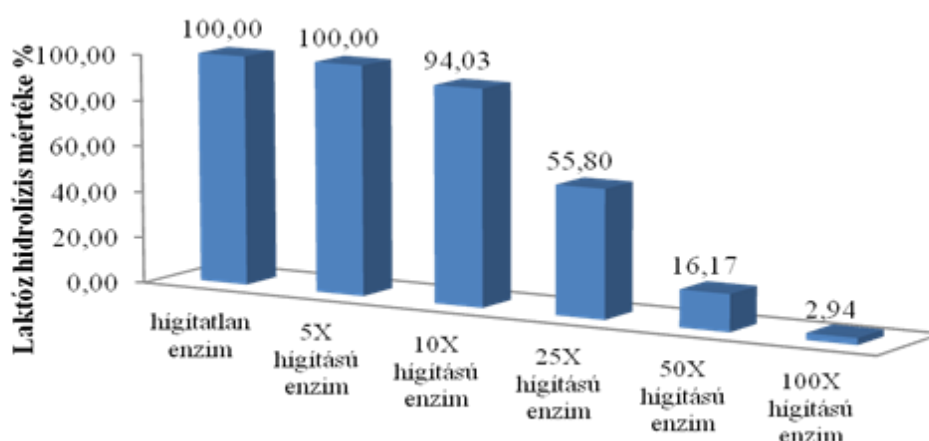


19. ábra: A β -galaktozidáz enzim aktivitásának változása a pH függvényében

4.2.3. A β -galaktozidáz enzim koncentrációjának a laktóz hidrolízis mértékére gyakorolt hatása

Ipari szempontból, az enzimek magas ára miatt, fontos meghatározni azt a minimális enzim koncentráció mennyiségét, amely mellett még hatékonyan játszódik le a kívánt reakció, esetünkben, a laktóz hidrolízis. Az alábbiakban különböző enzimkoncentrációkat vizsgáltunk az β -galaktozidáz optimális körülményein.

A hígítatlan és ötszörös hígítású enzim felhasználás esetén 100%-os hidrolízist értünk el; az ötszörös hígítás esetén közel 100%-os, míg nagyobb hígítások esetén a hidrolízis mértéke jelentősen elmaradtak a fent említett értékektől. A hígítatlan enzim esetén 100%-os hidrolízist értünk el; a tízszeresére hígított enzimmel végzett vizsgálat is közel hasonló eredményt hozott (99,25%). A száz- és ezerszeresére hígított enzimek jelentősen elmaradtak a fent említett értékektől.

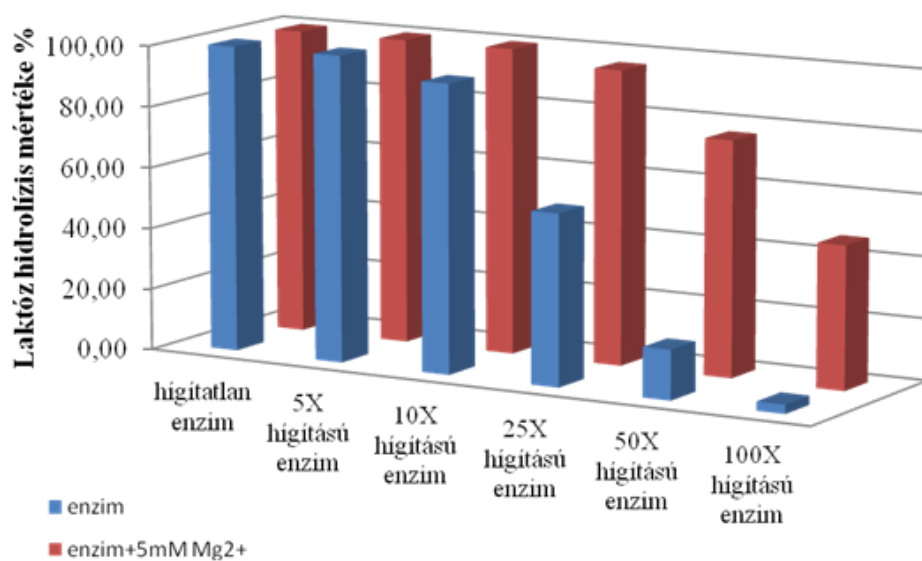


20. ábra: Az enzim koncentráció hatása a laktóz hidrolízisre

4.2.4. Magnézium és zselatin jelenlétének β -galaktozidáz enzimre gyakorolt hatása az enzim koncentrációra és pH-ra

A., Magnézium-ion hatás az enzim koncentrációra

A hígítatlan, ötszörös hígítású enzim felhasználás esetén 100%-os hidrolízist értünk el aktivátor alkalmazása nélkül is; míg a tízszeres hígítás esetén 94%, huszonötszörös hígítás esetén közel 55%-os konverziót. Ebből adódóan a tízszeres hígításnál csekélyebb enzimkoncentráció esetén feltétlenül szükséges Mg-sók alkalmazása teljes mértékű átalakítás kiváltásához, amit kísérletünk során igazoltunk. (21. ábra). 100-szoros enzimhígítás esetén a 2,9 %-os átalakítás hatékonyságát aktivátor alkalmazásával 47 %-ra tudtuk növelni.



21. ábra: A magnézium enzim aktivitására gyakorolt hatása

B., Enzimaktivitás növelése pH optimum alatt, magnéziumion aktivátorral

A pH optimum alatt a kontrollhoz képest minden MgCl_2 tartalmú minta esetén magasabb hidrolízis értéket értünk el. A leghatékonyabb bontási eredményeket 5 mM MgCl_2 koncentrációjú minták esetén tapasztaltunk. Az eredményeket az alábbi táblázat összegzi, ahol a táblázatban szereplő értékek az elhidrolizált laktóz mértékét adják meg százalékosan.

	Laktóz hidrolízis (%)					
pH	β -galaktozidáz enzim aktivitás	4,5 % laktóz kontrol	4,5 % laktóz, 1 mM MgCl ₂	4,5 % laktóz, 2 mM MgCl ₂	4,5 % laktóz, 5 mM MgCl₂	4,5 % laktóz, 10 mM MgCl ₂
pH 5,5	2166 UN enzim	3,42	32,20	47,31	87,16	61,41
	216,6 UN enzim	0,01	2,58	4,26	27,62	4,68
pH 6,8	2166 UN enzim	100	100	100	100	100
	216,6 UN enzim	94,92	100	100	100	98,83

6. táblázat: A Mg²⁺ aktivátor hatására történő bontási hatékonyság változás különböző enzim aktivitású oldatokban

C., A zselatin hatása a β -galaktozidáz enzim aktivitására

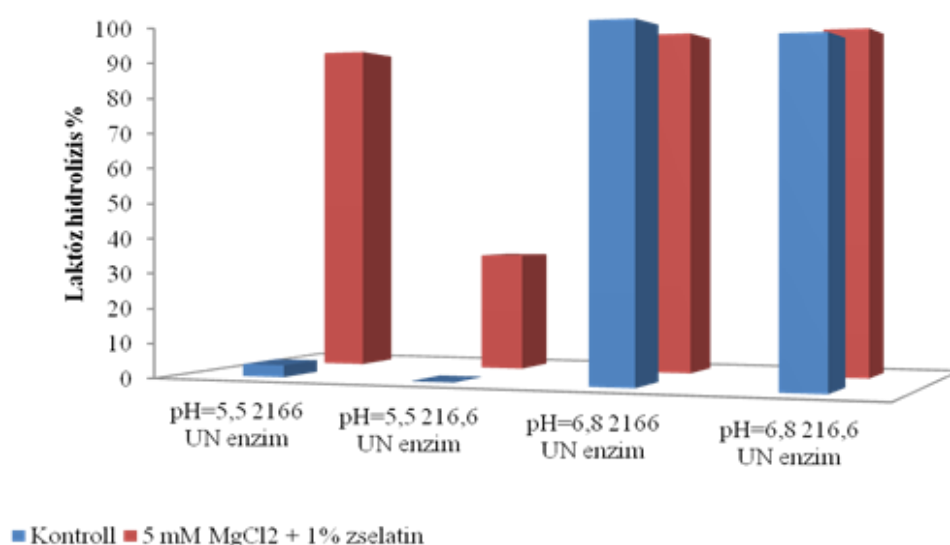
Az eredmények alapján (8. táblázat) a zselatin jelenléte az optimumnál alacsonyabb pH-n növelte az elhidrolizált laktóz mennyiségét, az optimális pH-n a fellépő 100 %-os konverzió következtében okafogyottá vált bármilyen aktivátor alkalmazása.

		Laktóz hidrolízis (%)	
pH	β-galaktozidáz enzim aktivitása	4,5 % laktóz kontrol	4,5 % laktóz +1% zselatin
pH 5,5	2166 UN enzim	3,42	17,03
	216,6 UN enzim	0,01	11,57
pH 6,8	2166 UN enzim	100	100
	216,6 UN enzim	94,92	99,94

7. táblázat: A bontási hatékonyság változása 1%-os zselatin jelenlétében, enzimkoncentráció függvényében

D., Enzimaktivitás növelése MgCl₂ és zselatin kombinációja jelenlétében

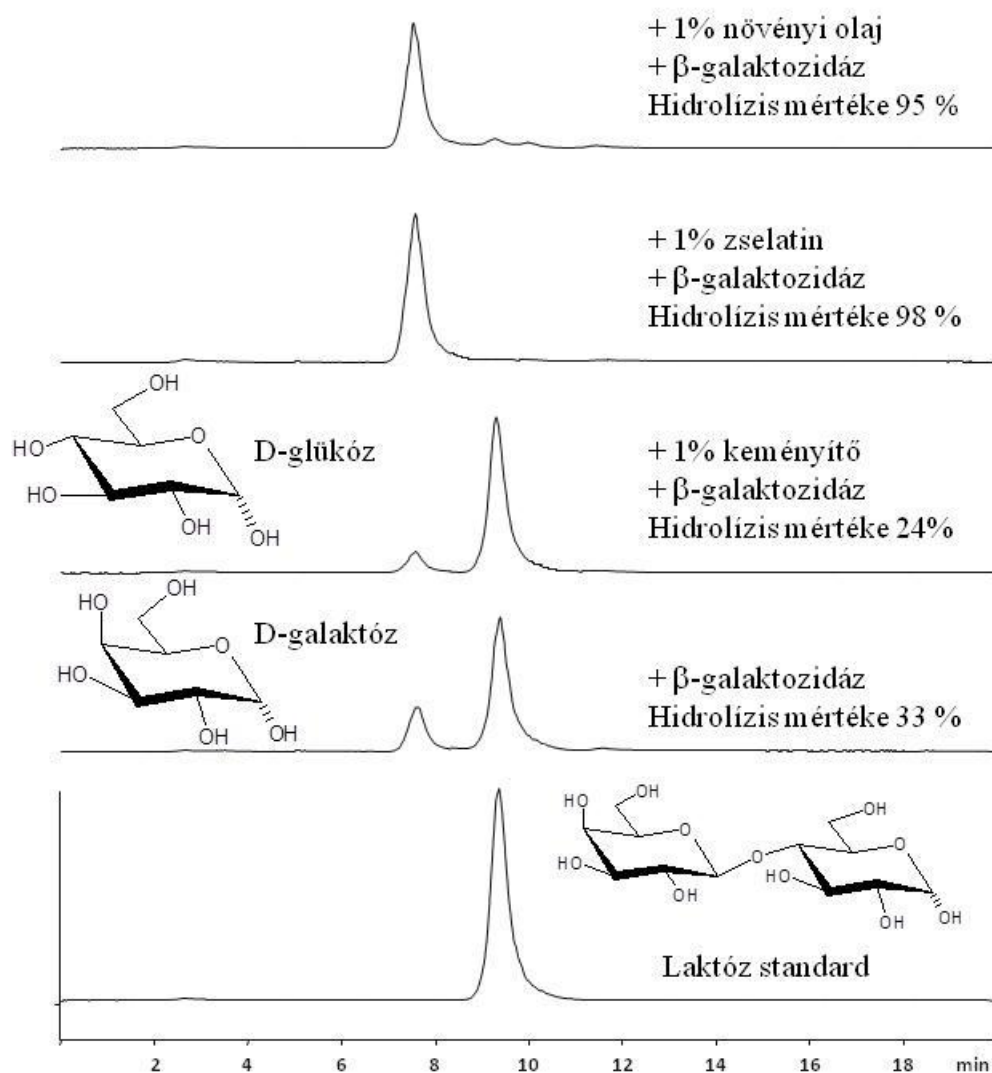
Zselatin és magnézium aktivátor kombinációjával pH optimum alatt, hígítatlan enzim hozzáadása mellett közel 100%-os hidrolízist értünk el.



22. ábra: Enzimaktivitás növelése MgCl₂ és zselatin jelenlétében

4.2.8. Mátrix-hatás vizsgálata a laktóz hidrolitikus átalakítása mértékére

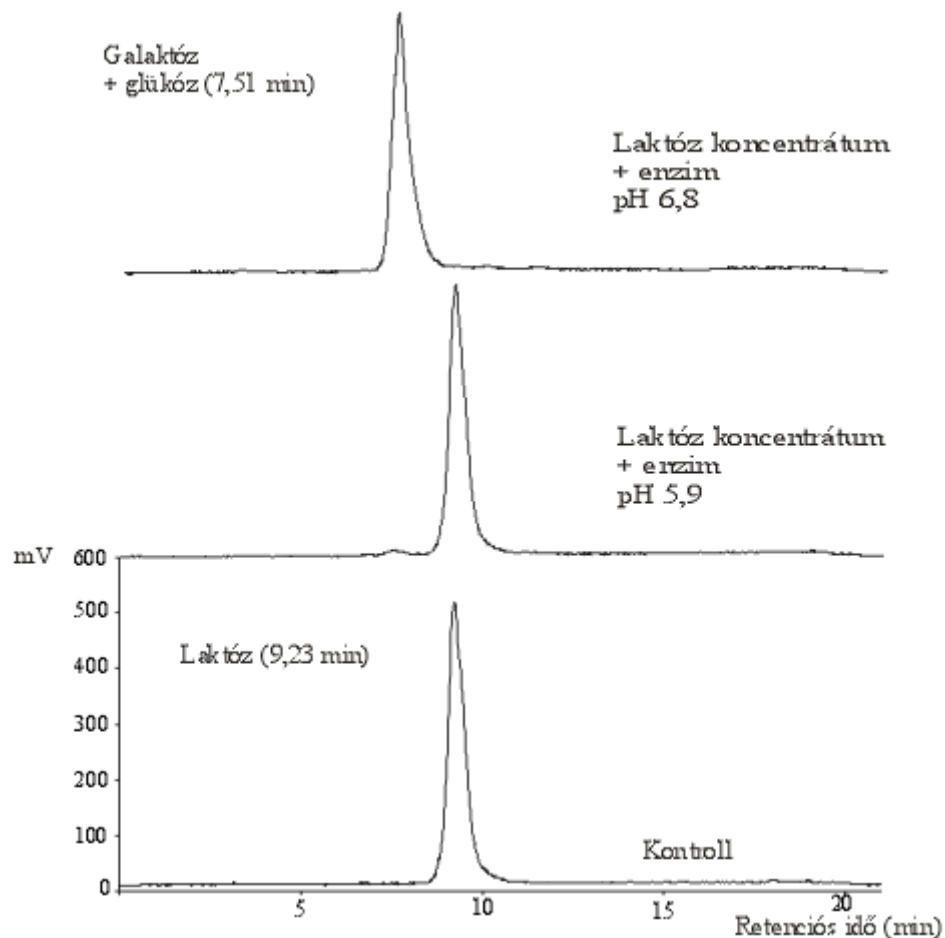
A bontás során a csak enzimet és a kezdeti 4,5% koncentrációjú laktóz oldatot tartalmazó mintában a reakció végére a laktóz koncentráció 3,0%-ra (33,3% átalakulás) csökkent, ami alacsony átalakulás. Az 1 g/100ml keményítőt tartalmazó minta esetén, a kísérlet végén mért laktóz koncentráció 3,4%-nak adódott (24,4% bontás), ami arra utal, hogy a keményítőnek inhibíciós hatása lehet a β -galaktozidázra. Az 1 g/100ml zselatin koncentrációjú minta esetén a laktóz maradék mennyisége 0,1% volt, ami az eddig meghatározott leghatékonyabb átalakulásra utal. Hasonlóan fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy az 1% növényi olajt tartalmazó minta esetén a bontás után a maradék laktóz koncentrációja 0,2% értékűnek adódott. A vizsgálatok során kapott kromatográfiás (HPLC-ELSD) eredményeket a következő ábra foglalja össze:



23. ábra: Mátrix-hatás vizsgálat során kapott kromatográfiás eredmények

4.2.9. Valós minta –tejcukor koncentrátum enzimatiszus hidrolízise

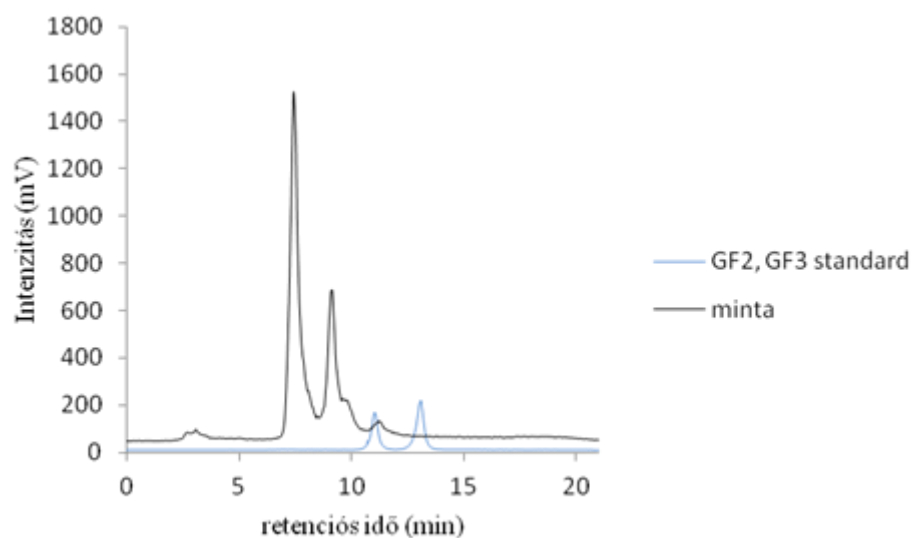
Élelmiszer mátrixban –tejipari melléktermék, tejcukor koncentrátum- kontrollált pH mellett végrehajtott laktóz hidrolízis a hígított enzim koncentráció esetén is 100%-nak adódott, szemben a minta kiindulási pH-ján kapott eredménnyel.



24. ábra: A laktóz koncentrátum enzimátikus hidrolízise

4.2.10. Galakto-oligoszacharidok jelenlétének kimutatása

A laktóz hidrolízise során galakto-oligoszacharidok jelenlétét mutattuk ki kevesebb, mint 1%-os koncentrációban, amit korábban is megfigyeltek (Neri és mtsai. 2009). A vizsgált minták közül példaként a pH 6,8, 25-szörös hígítású enzimet tartalmazó mintát hozzuk, amit az alábbi kromatogramon kesztóz (GF2), nisztóz (GF3) standardok segítségével szemléltetünk. A mintában hármas tagszámú galakto-oligoszacharid jelenlétét tudtuk kimutatni 0,11 g/100ml koncentrációban. Vizsgálataink elsősorban a laktóz bontására irányultak, az irodalomban közöltekkel megegyező mennyiségű galakto-oligoszacharidok képződéséhez az általunk használt paraméterektől eltérő körülmények, pld. pH, szubsztrát-koncentráció, hőmérséklet szükségesek. (A legnagyobb mértékű galakto-oligoszacharid képződés 50-80%-os laktóz hidrolízis mellett valósul meg.)



25. ábra: A galakto-oligoszacharid képződést szemléltető kromatogram

4.3. A glükóz átalakítás eredményei

A hidrolizált laktózból származó glükózt, izomeráz enzim felhasználásával fruktózzá alakítottuk különböző reakció közegekben. Magnézium és zselatin hozzáadásával nőtt az izomerizáció hatékonysága. Megközelítőleg 27%-os növekedést eredményezett 24 óra alatt, és 36%-ot a 48 órás mérés esetén.

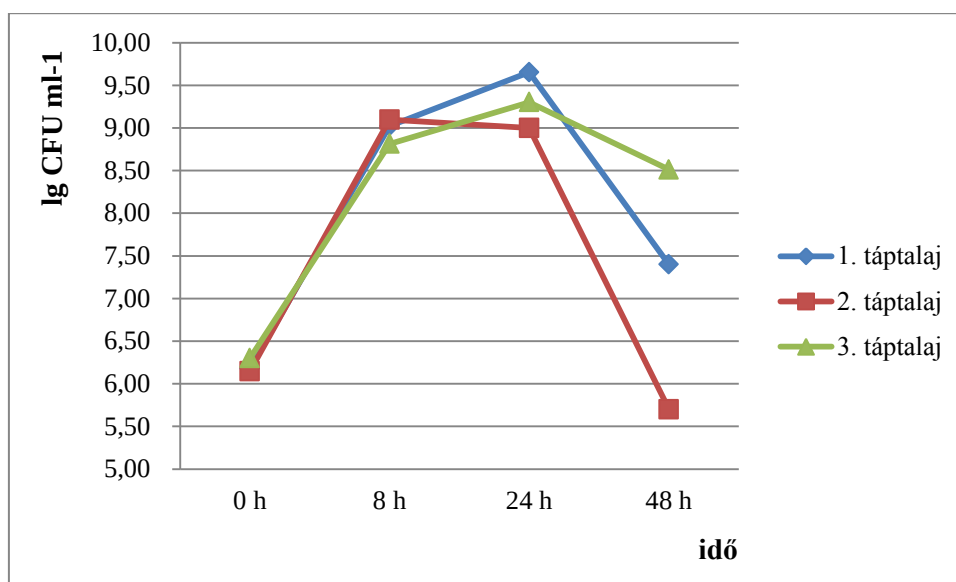
5 % hidrolizált laktóz + 3 mg/ml GI 70 °C pH 6,8	Fruktóz átalakulás %	
	24 h	48 h
1mg/ml glükóz izomeráz enzim	6,3	26,9
1mg/ml glükóz izomeráz enzim + 5mM MgCl ₂	9,5	32,3
3mg/ml glükóz izomeráz enzim	10,0	27,9
3mg/ml glükóz izomeráz enzim + 5mM MgCl ₂	16,2	36,5

8. táblázat: A fruktóz átalakulás százalékos eredményei

4.4. Mannit képzés fruktózból fermentációs úton

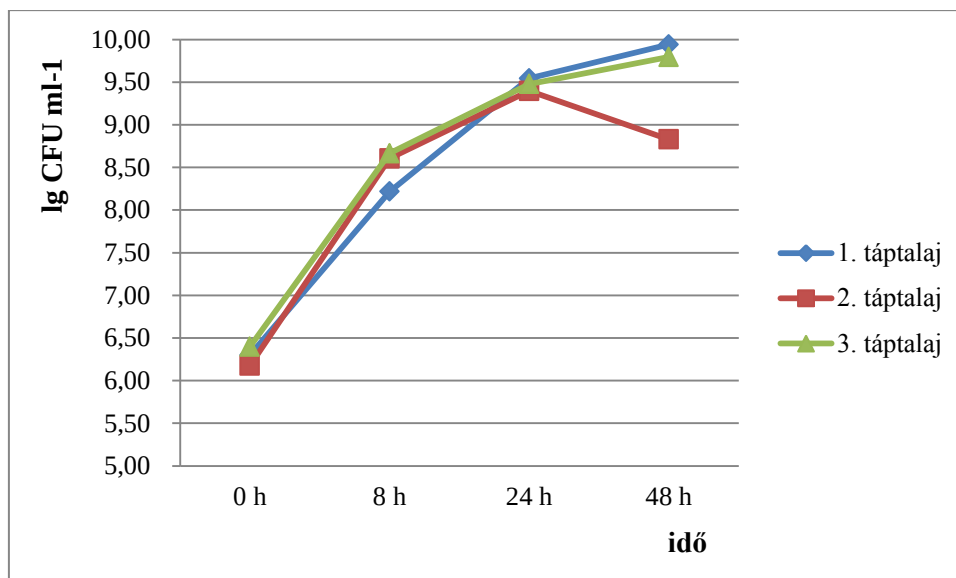
4.4.1. Leuconostoc törzsek mannit-termelés vizsgálata

A mérés célja az volt, hogy a vizsgált három heterofermentatív tejsavbaktériumok növekedését azonos körülmények között (táptalajok) összehasonlítsuk. A fermentáció anaerob körülmények között zajlott. Kontrollként a táptalajok összetevői közül kihagytuk a fruktózt és helyette szénhidrátforrásként glükózt alkalmaztunk. Az eredményeket az alábbi ábrákon (25.- 26.- 27.- 28. ábra) szemléltetjük.

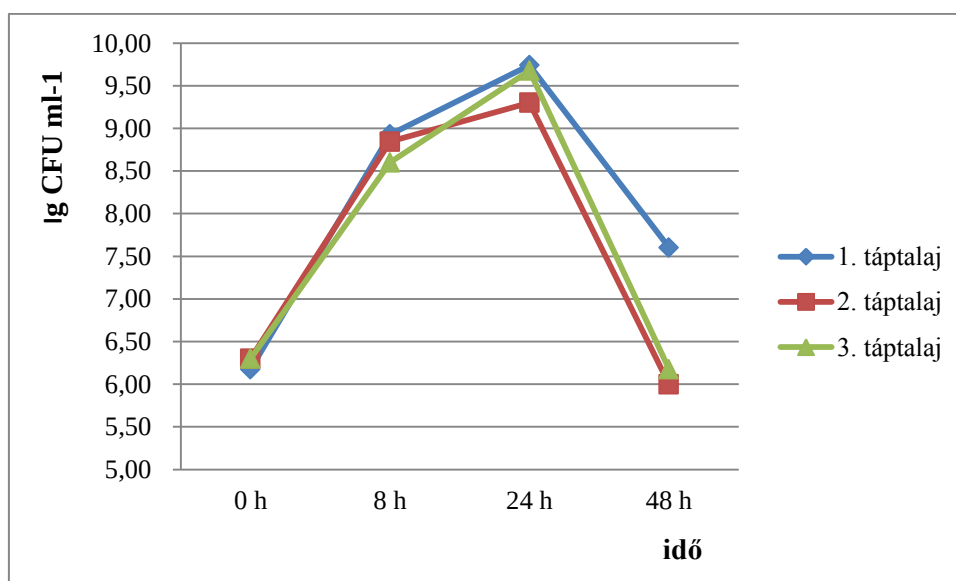


26. ábra: *Leuconostoc citreum* log 10 csíraszám értékei 48 órás fermentáció során a fruktózt és glükózt is tartalmazó tápoldatokból

A fruktózt és glükózt is tartalmazó tápoldatból származó *L. citreum* és *L. pseudomesenteroides* baktériumok a 3. illetve a 1.-es táptalajon mutatták a legnagyobb növekedést. (Simplified medium illetve MRS táptalajok használata mellett.)

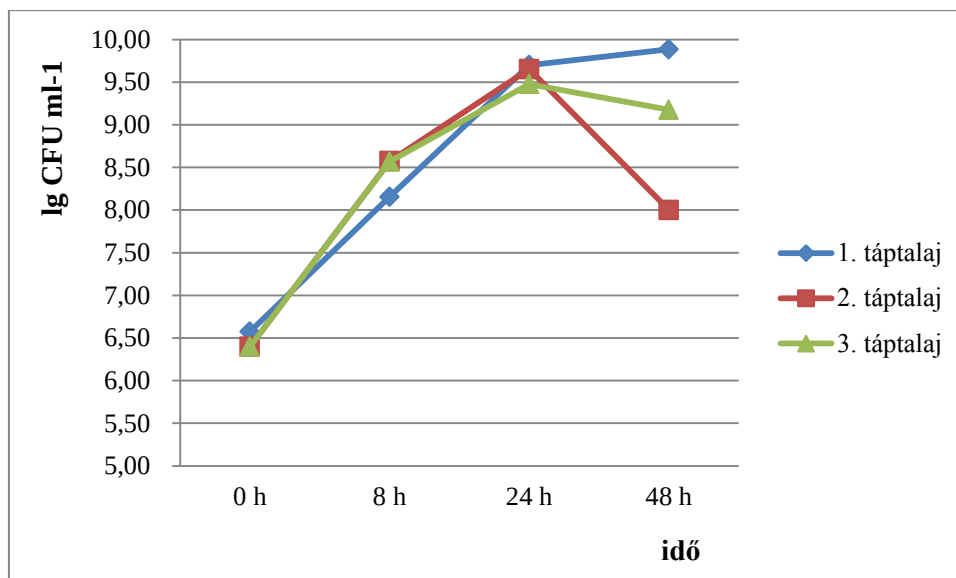


27. ábra: *Leuconostoc pseudomesenteroides* log 10 csíraszám értékei 48 órás fermentáció során a fruktózt és glükózt is tartalmazó tápoldatokból



28. ábra: *Leuconostoc citreum* log 10 csíraszám értékei 48 órás fermentáció során a csak glükózt tartalmazó tápoldatokból

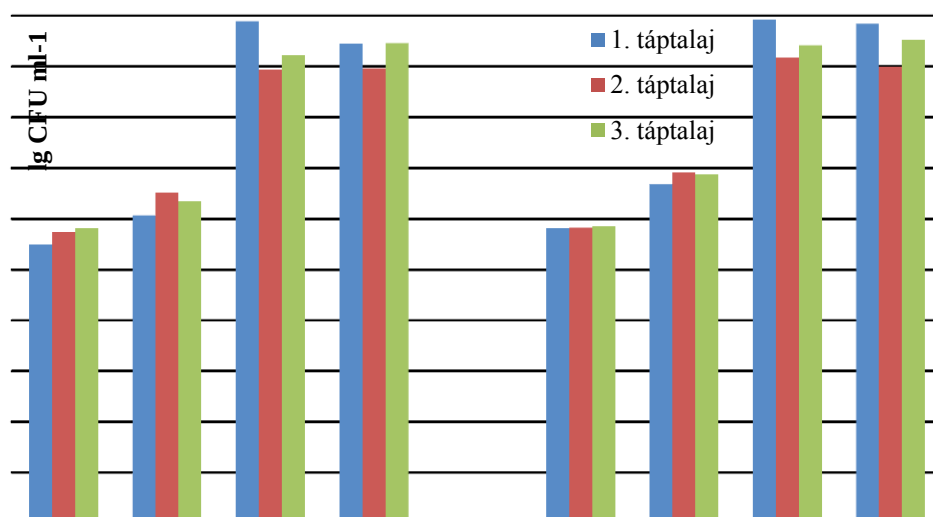
A csak glükózt tartalmazó tápoldatból származó *L. citreum* és *L. pseudomesenteroides* baktériumok az 1.-es táptalajon mutatták a legnagyobb növekedést (MRS), azonban ehhez megközelítő eredményeket hozott Simplified medium táptalajok (3. táptalaj) használata is.



29. ábra: *Leuconostoc pseudomesenteroides* log 10 csíraszám értékei 48 órás fermentáció során a csak glükózt tartalmazó tápoldatokból

4.4.2. *Lactobacillus brevis* törzsek mannit-termelés vizsgálatának eredményei

A vizsgálatot aerob és mikroaerofil körülmények között is elvégeztük. Az eredményeket az alábbi ábra szemléltetik.



30. ábra: *Lactobacillus brevis* log 10 csíraszám értékei 48 órás aerob és mikroaerofil fermentáció során

A *L. brevis* mikroaerofil körülmények között, a 1-es táptalajon (MRS táptalaj) mutatta a legnagyobb növekedést, míg aerob körülmények között az 1-es és 3-as táptalajokon való baktérium-tenyésztés egyforma eredményeket hozott.

4.4.3. A fruktóz fermentáció kromatográfiás nyomonkövetésével kapott eredményei

A különböző heterofermentatív baktériumok eltérő eredményeket hoztak a különféle táptalajokon. *Leucontostoc pseudomesenteroides* esetén csekély fruktóz redukció történt, a legjobb eredményt az 1. táptalaj kaptuk (6.9%). A *Leucontostoc citreum* és *Lactobacillus brevis* baktériumok alkalmazásával azonban 100%-os mannit-képzést sikerült kimutatnunk, a legjobb közegnek az 1. táptalaj bizonyult. Az analitikai mérések eredményei a mikrobiológiai eredményekkel korrelációban vannak.

	Mannit átalakulás %		
	8h	24 h	48 h
1. táptalaj	0	2,35	6,90
2. Táptalaj	0	1,45	3,86
3. Táptalaj	0	1,11	3,94

9. táblázat: *Leuconostoc pseudomesenteroides* mannit-képzése

	Mannit átalakulás %		
	8 h	24 h	48 h
1. Táptalaj	0,58	95,42	100
2. Táptalaj	0,99	22,15	22,28
3. Táptalaj	0,82	71,34	90,17

10. táblázat: *Leuconostoc citreum* mannit-képzése

		Mannit átalakulás %		
		8 h	24 h	48 h
1. Táptalaj	aerob	0	44	100
	mikroaerofil	0	61	100
2. Táptalaj	aerob	0	12,85	23,67
	mikroaerofil	0	14,41	23,29
3. Táptalaj	aerob	0	31,32	89,75
	mikroaerofil	0	41,11	92,55

11. táblázat: *Lactobacillus brevis* hatására végbemneő mannit képzés

5. Összegzés

Kidolgoztunk egy háromlépéses laktóz átalakítási módszert, mely lehetőséget teremt, innovatív megközelítéssel, korábban nem leírt kísérleti metodika alkalmazásával laktózmentes, illetőleg egészségvédő hatású tejtermékek előállítására, kedvező élettani hatású cukoralkohol keletkezésére alapozva. Ehhez hasonló diabetikus, illetve prebiotikus élelmiszert a tejipari szegmensben nem fejlesztettek ki, így az általunk kidolgozott sokrétű protokoll új termékek megjelenéséhez is vezethet a szükséges própagyártások, illetve tesztüzemi kísérletek végrehajtását követően.

Több módszerrel vizsgáltuk a laktóz hidrolízisének lehetséges és leghatékonyabb eljárásait. Mikrobiológiailag kezelt minták esetén a leghatékonyabb laktóz bontó hatást 28-35%-os laktóz bontási hatékonysággal a *Streptococcus thermophilus* mutatta, a többi izolátum, laktóz hidrolízis mértéke 20% alatt maradt. A kapott értékek az irodalmi 30-40%-os fermentatív laktóz hidrolízissel összhangban vannak.

Enzimatis laktóz bontás vizsgálatokat végeztünk a *Kluyveromyces lactis*-ből izolált β -D-galaktozidázal. A vizsgálatok során, spektrofotometriás úton meghatároztuk az enzim aktivitását (2166 U), pH optimumát (pH 6,8).

A magnézium-ion , illetve zselatin β -galaktozidáz enzimre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A magnézium ion aktiváló hatása az irodalomból ismert, a zselatin enzim hatékonyságot növelő tulajdonsága nem ismert, bár enzim immobilizációs vizsgálatok során alkalmazott anyag. A magnézium ion jelenléte pozitívan befolyásolta az enzim felhasználás mennyiségét, és pH optimum alatt még alacsonyabb pH körülmények között (pH 5,5) is közel 90%-os laktóz hidrolízist értünk el.

Mátrix hatás vizsgálat során keményítő, zselatin, olaj hozzáadása mellett vizsgáltuk az enzim működését. Olaj és zselatin hatására nőtt a laktóz hidrolízis mértéke, keményítő hozzáadásával csökkent, a keményítő enzim aktivitás csökkentő hatását spektrofotometriás úton is igazoltuk. Zselatin jelenléte növelte az enzim hatékonyságot, tized annyi enzim szükséges a közel száz százalékos hidrolízis eléréséhez az 1 g/100ml koncentrációjú zselatin hozzáadásával. A laktóz hidrolízise során galakto-oligoszacharidok jelenlétét mutattuk ki.

A glükóz enzimatis átalakítása során 36%-os fruktóz átalakulást értünk el. A glükóz izomeráz enzim hatékonyságát jelentősen tudtuk növelni magnézium-ion és zselatin

hozzáadásával. A kapott értékek összhangban vannak, az irodalomban közölt 40%-os fruktóz átalakulással.

A fruktóz fermentatív átalakítása során, a *Leuconostoc citreum* és *Lactobacillus bervis* 100%-os hatékonyságú heterofermentatív tejsavbaktériumok általi mannit-képzést értünk el optimális 1:2 glükóz:fuktóz arányú táptalaj közegben. Az Intézetben jelenleg is folynak kutatások az általunk enzimatis úton kezelt laktózmintákból, laktóz-koncentrátumból nyert fruktóz fermentatív mannit termelésének optimalizálására.

6. Irodalomjegyzék

Folyóiratok:

1. M. Carina Audisio, Horacio R. Terzolo, María C. Apella. 2005. Bacteriocin from Honeybee Beebread *Enterococcus avium*, Active against *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 6 (2005) 3373-3375.
2. Jose A. B. Baptista, Rita C. B. Carvalho. 2004. Indirect determination of Amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein deterioration. Food Research International 37 (2004) 739-747.
3. Begona de Ancos, M. Pilar Cano, Rosario Gómez. 2000. Characteristics of stirred low-fat yoghurt as affected by high pressure. International Dairy Journal 10 (2000) 105-111.
4. Bianca Beilmann, Peter Langguth, Heribert Hausler, Peter Grass. 2006. High-performance liquid chromatography of lactose with evaporative light scattering detection, apply to determine fine particle dose of carrier in dry powder inhalation products. Journal of Chromatography A, 1107 (2006) 204-207.
5. G. A. Birollo, J. A. Reinheimer, C. G. Vinderola. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. Food Research International 33 (2000) 799-805.
6. Michael Blaut 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. European Journal of Nutrition, Vol. 41, Supplement 1 (2002) 11-16.
7. Valeria Boeris, Izabella Balce, Rami Reddy Vennapusa, Miguel Arévalo Rodríguez, Guillermo Picó, Marcelo Fernández Lahore. 2012. Production, recovery and purification of a recombinant β -galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption. Journal of Chromatography (2012).
8. Mohamed Ali Borgi, Karima Srih-Belguith, Mamdouh Ben Ali, Monia Mezghani, Samuel Tranier, Richard Haser, Samir Bejar. 2004. Glucose isomerase of the *Streptomyces* sp. SK strain: purification, sequence analysis and implication of alanine 103 residue in the enzyme thermostability and acidotolerance. Biochimie 86 (2004) 561-568.
9. O. Brown-Esters, P. Mc. Namara, D. Savaiano. 2012. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. International Dairy Journal 22 (2012) 98-103.

10. Alejandra Cardelle-Cobas, Nieves Corzo, Agustin Olano, Carmen Peláez, Teresa Requena, Marta Ávila. 2011. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *International Journal of Food Microbiology* 149 (2011) 81–87.
11. Ines Castro, Carla Oliveira, Lucília Domingues, José A. Teixeira, António A. Vicente. 2011. The Effect of the Electric Field on Lag Phase, β -Galactosidase Production and Plasmid Stability of a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain Growing on Lactose. *Food Bioprocess Technol* DOI 10.1007/s11947-011-0609-4.
12. Chockchaisawasdee S., Athanasopoulos V. I., Niranjan K., Rastall R. A. 2005. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (4) 434–443.
13. Rajiv I. Dave, Nagendra P. Shah. 1997. Effect of Cysteine on the Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made with Commercial Starter Cultures. *International Dairy Journal* 7 (1997) 537-545.
14. I.M.P.L.V.O. Ferreira, A.M.P. Gomes, M.A.Ferreira. 1998. Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydrate Polimers* 37 (1998) 225-229.
15. Fernanda F. Freitas, Líbia D.S. Marquez, Gustavo P. Ribeiro, Gabriela C. Brandão, Vicelma L. Cardoso, Eloízio J. Ribeiro. 2011. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biochemical Engineering Journal* 58-59 (2011) 33-38.
16. Mohamed H. Gaily, Basheir Mohamed Elhassan, Ahmed E. Abasaeed, Mohammad Al-Shrhan. 2010. Isomerization and Kinetics of Glucose into Fructose. *International Journal of Engineering and Technology IJET-IJENS* Vol: 10 No: 03.
17. Gänzle M. G. 2012. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal* 22 (2012) 116-122.
18. Gopal P. K., Gill H. S. 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition* 84, S69-S74.

19. Aaron Gosling, Geoff W. Stevens, Andrew R. Barber, Sandra E. Kentish, Sally L. Gras. 2010. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry* 121 (2010) 307-318.
20. Toshiba Haider, Quayyum Husain. 2009. Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chemical Engineering and Processing* 48 (2009) 576-580.
21. Han Seung Lee, Juan Hong. 2000. Kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase: anomeric reactivity of D-glucose in kinetic model. *Journal of Biotechnology* 84 (2000) 145–153.
22. M. Harju, H. Kallioinen, O. Tossavainen. 2012. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal* 22 (2012) 104-109.
23. Miia Helanto, Johannes Aarnikunnas, Niklas von Weymarn, Ulla Airaksinen, Airi Palva, Matti Leisola. 2004. Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Journal of Biotechnology* 116 (2005) 283–294.
24. Ryoko Hongo, Sadako Nakamura, Tsuneyuki Oku. 2010. Utilization of Orally Administered D-(^{14}C) Mannitol Via Fermentation by Intestinal Microbes in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 56 (2010) 387-395.
25. Hsu, C.A., Lee, S.L., Chou, C.C. 2007. Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 2225–2230.
26. Peter Jochems, Yamini Satyawali, Sandra Van Roy, Wim Doyen, Ludo Diels, Winnie Dejonghe. 2011. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. *Enzyme and Microbial Technology* 49 (2011) 580-588.
27. LeBlanc J. G., Todorov S. D. 2011. Bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from Boza, a traditional fermented beverage from Balkan Peninsula – from isolation to application. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 1311-1320.
28. Korakli M., Schwarz E., Wolf G., Hammes W.P. 2000. Production of mannitol by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Adv. Food Sci.* 22 (2000) 1–4.
29. R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcárcel. 2007. Evaporative light scattering detection: trends in its analytical uses. *Anal Bioanal Chem* 388 (2007) 1663-1672.

30. Pamela Manzi, Laura Pizzoferrato. 2011. HPLC Determination of Lactulose in Heat Treated Milk. *Food Bioprocess Technol.* 10 (2011)
31. Cristina Martínez-Villaluenga, Alejandra Cardelle-Cobas, Nieves Corzo, Agustín Olano. 2008. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (2008) 540-544.
32. R. Mehra, P. Kelly. 2006. Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. *International Dairy Journal* 16 (2006) 1334-1340.
33. Claude Moreau, Robert Durand, Alain Roux, Didier Tichit. 2000. Isomerization of glucose into fructose in the presence of cation-exchanged zeolites and hydrotalcites. *Applied Catalysis A: General* 193 (2000) 257–264.
34. Neri D. F. M., Balcao V. M., Costa R. S., Rocha I. C. A. P., Ferreira E. M. F. C., Torres D. P. M. 2009. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry* 115 (2009) 92-99.
35. Valentina Nichele, Michela Signoretto, Elena Ghedini. 2011. β -galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 71 (2011) 10-15.
36. Oliveira C., Guimarães P. M. R., Domingues L. 2011. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 29 (2011) 600–609.
37. Otgonbayar, Gan-Erdene, Hyun-Ju Eom, Beom Soo Kim, Jae-Hyung Ko, Nam Soo Han. 2011. Mannitol Production by *Leuconostoc citreum* KACC 91348P Isolated from *Kimchi*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(9) (2011) 968–971.
38. Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S.A., Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100 (2006) 171–185.
39. Anne Petersen, Peter M. H. Heegaard, Anna L. Pedersen, Jens B. Andersen, Rikke B. Sørensen, Hanne Frøkiær, Sampo J. Lahtinen, Arthur C. Ouwehand, Morten Poulsen, Tine R. Licht. 2009. Some putative prebiotics increase the severity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice.
40. Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira, Ana Carolina Rodrigues Florence, Patrizia Perego, Marice Nogueira De Oliveira, Attilio Converti. 2010. Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of

- different probiotics in fermented skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 145 (2011) 22-27.
41. Quinn Z.K. Zhou, Xiao Dong Chen 2001. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal* 9 (2001) 33-40.
 42. Yadira Rivera-Espinoza, Yoja Gallardo-Navarro. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27 (2010) 1-11.
 43. Cecilia Rodríguez, Tom Rimaux, María José Fornaguera, Gino Vrancken, Graciela Font de Valdez, Luc De Vuyst, Fernanda Mozzi. 2012. Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* (2012) 93:2519–2527.
 44. Ruiz-Matute A. I., Corzo-Martinez M., Montilla A., Olano A., Copovi P., Corzo N. 2012. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*.
 45. Badal C. Saha. 2006. Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 991–995.
 46. M.L. Sanz, I. Martinez-Castro. 2007. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1153 (2007) 74-89.
 47. U. Schillinger. 1999. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 47 (1999) 79-87.
 48. Christopher A. Sellick, Robert N. Campbell, Richard J. Reece. 2008. Galactose Metabolism in Yeast—Structure and Regulation of the Leloir Pathway Enzymes and the Genes Encoding Them. *International Review of Cell and Molecular Biology* 269 (2008) 111–150.
 49. Aasma Shaukat, MD, MPH; Michael D. Levitt, MD; Brent C. Taylor, PhD, MPH; Roderick MacDonald, MS; Tatyana A. Shamliyan, MD; Robert L. Kane, MD; and Timothy J. Wilt, MD, MPH. 2010. Systematic Review: Effective Management Strategies for Lactose Intolerance. *Annals of Internal Medicine* 2010 (152) 797-803.

50. S. Seyhan Tükel, Dilek Alagöz. 2008. Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose. *Food Chemistry* 111 (2008) 658–662.
51. Seung Hoon Song, Claire Vieille. 2009. Recent advances in the biological production of mannitol. *Appl Microbiol Biotechnol* (2009) 84:55–62.
52. Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M., Gibson, G. R. 2005. Modulation of the human gut flora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design* 11 (2005) 75–90.
53. T. Vasiljevic, P. Jelen. 2002. Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β -galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3 (2002) 175-184.
54. Venema K. 2011. Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. *International Dairy Journal* 22 (2012) 123-140.
55. Carlos Vera, Cecilia Guerrero, Andrés Illanes. 2011. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research* 346 (2011) 745-752.
56. Bennie C. Viljoen, Analie Lourens-Hattingh, Bridget Ikalafeng, Gabor Peter. 2003. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. *Food Research International* 36 (2003) 193-197.
57. Yanbo Wang. 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International* 42 (2009) 8-12.
58. Niklas von Weymarn, Mervi Hujanen, Matti Leisola. 2002. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry* 37 (2002) 1207–1213.
59. Wiraya Srisimararat, Piamsook Pongsawasdi. 2008. Enhancement of the oligosaccharide synthetic activity of β -galactosidase in organic solvents by cyclodextrin. *Enzyme and Microbial Technology* 43 (2008) 436-441.
60. H.W. Wisselink, R.A. Weusthuis, G. Eggink, J. Hugenholtz, G.J. Grobбен. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal* 12 (2002) 151–161.

61. Jin-Li Xu, Jun Zhao, Ling-Fei Wang, Huai-Yong Sun, Chun-Li Song, Zhen-Ming Chi. 2011. Enhanced β -Galactosidase Production from Whey Powder by a Mutant of the Psychrotolerant Yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 for Hydrolysis of Lactose. *Appl Biochem Biotechnol* 166 (2012) 599–611.

Könyvek:

1. Danilo Corradini. 2011. Handbook of HPLC. Pp. 567-570.
2. Csapó J., Csapóné Kiss Zs. 2003. Élelmiszer-kémia. Pp. 55, 68-69, 75-84, 303, 311, 335-340.
3. Csapó J., Csapóné Kiss Zs. 2002. Tej és tejtermékek a táplálkozásban. Pp. 49-50, 296-312.
4. P. F. Fox 1997. Advanced Dairy Chemistry Volume 3. Lactose, Water, Salts and Vitamins. Second Edition. Pp. 1-17, 39, 40, 77-79, 91-93, 95, 155-157.
5. Gergely P., Erdődi F., Vereb Gy. 2005. Általános és bioszervetlen kémia. Pp. 181-182.
6. Kremmer T., Torkos K. 2010. Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata Pp. 17-117, 181-229.
7. Dr. Mandl J. 2006. Biokémia. Aminosavak, peptidek, szénhidrátok, lipidek, nukleotidok, nukleinsavak, vitaminok és koenzimek. Pp. 39-42, 59-69.
8. P. L. H. McSweeney and P. F. Fox 2009. Advanced Dairy Chemistry Volume 3. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. Third edition Pp. 6-13.
9. John Olmsted and Williams C. Brown. 1997. Chemistry The Molecular Science. Second edition. Pp. 440, 558.
10. Ziad el Rassi. 1995. Carbohydrate analysis High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. Pp. 361, 515.
11. John F. Robyt 1998. Essentials of Carbohydrate Chemistry. Pp. 1, 3, 5, 404.
12. Rajeshwari S. Setty and G.R.Veena. 2002. Biotechnology 1. Pp.12-20.
13. Robert V. Stick and Spencer J. Williams. 2009. Carbohydrates The Essential Molecules of Life. Second edition Pp. 1, 7, 21, 332.
14. Ronald E. Wrolstad. 2012. Food Carbohydrate Chemistry. Pp. 2-9, 4-46, 100-102, 108, 137, 155-160.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Kiss Attila Főigazgató, Intézet- és Tanszékvezető főiskolai tanárnak, hogy lehetőséget biztosított a kutatásban való részvételre. Továbbá hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Forgó Péter főiskolai tanárnak és Korózs Marietta tudományos segédmunkatársnak a kutatásokban nyújtott támogatásukért és tanácsaikért, mellyel segítették dolgozatom elkészítését.

Továbbá köszönettel tartozom Hilyákné Kadlott Máriának és Kalóczkai Katának a mikrobiológia laboratóriumban nyújtott segítségéért és tanácsaiért.