



Élelmiszertudományi Kar
SÖR- ÉS SZESZIPARI TANSZÉK

α -GALAKTOZIDÁZ ENZIM TERMELÉS FOKOZÁSA GALAKTOMANNÁN SZUBSZTRÁTUMON

TDK Dolgozat

GYÖRKI DARINKA

Élelmiszermérnök BSc. IV. évfolyam

Témavezető: Rezessyné Dr. Szabó Judit
egyetemi docens



TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

**Budapest
2012**

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS.....	1
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1	Az α -galaktozidáz enzim jellemzése.....	3
2.1.1	Előfordulás	3
2.1.2	Az α -galaktozidáz által katalizált reakció.....	4
2.1.3	Szubsztrátumok.....	4
2.1.4	Az α -galaktozidáz enzim előállítási lehetőségei.....	6
2.1.5	Optimális működési feltételek	6
2.1.6	Az α -galaktozidáz enzim szerkezete	7
2.1.7	Az α -galaktozidáz enzimalkalmazási lehetőségei	8
2.2	<i>Thermomyces lanuginosus</i> termofil fonalas gomba jellemzése	11
3	KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉS.....	13
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	14
4.1	A felhasznált mikroorganizmus.....	14
4.2	Alkalmazott tápközegek	15
4.3	Tenyésztési módszerek.....	16
4.3.1	Törzsfenntartás	16
4.3.2	Inokulum tenyészet készítése	16
4.3.3	Enzimtermelés rázatott lombikos tenyészettel	16
4.3.4	Enzimtermelés laboratóriumi fermentorban	17
4.4	Alkalmazott analitikai módszerek	18
4.4.1	A felhasznált reagensek és oldatok	18
4.4.2	Az enzimaktivitás meghatározás.....	18
4.4.3	pH mérés	19
4.5	Kísérlettervezés	20
5	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	21
5.1	Fermentációs idő minimalizálása	21
5.2	<i>T. lanuginosus</i> CBS 395.62/b törzs α -galaktozidáz termelésének léptéknövelése	23
5.3	A különböző felületaktív anyagok hatása az extracelluláris enzimaktivitásra.....	25
5.4	Tápközeg összetétel optimálása	26
6	KÖVETKEZTETÉS.....	32
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
8	FELHASZNÁLT IRODALOM.....	36

1 BEVEZETÉS

A fonalas gombák családjába tartozó *Thermomyces lanuginosus* termofil gomba egy kiváló tulajdonságokkal rendelkező és az élővilágban széles körben előforduló mikroorganizmus. Talajban, rothadó növényi részekben, leveleken és nedves szénában fellelhető egyaránt.

Biotechnológiai szempontból számos felhasználási lehetőséget rejt magában, mivel könnyen szaporítható, nem patogén és nem termel toxinokat. Magas hőmérséklet optimummal rendelkező extracelluláris enzimeket termel, mely lényegesen megkönnyíti a fermentléből való kinyerését/tisztítását. Számos forrása több fajta extracelluláris enzimnek, mint például a hemicellulázoknak, az amilolitikus, a pektolitikus, a lipáz, a fitáz és a galaktozidáz enzimeknek is.

Az α -galaktozidáz enzimek hasznosíthatók a cukoriparban, az élelmiszer-feldolgozásban, takarmánygyártásban, a papíriparban, valamint az orvostudományban. Az α -galaktozidáz egy hidrolitikus enzim, mely konformáció megtartó tulajdonságú és megfelelő körülmények között transzglükozidáz aktivitással is rendelkezik. Ez azt jelenti, hogy bizonyos enzimek az oligo- és poliszacharidok hidrolízése mellett a galakto-oligoszacharidok felépítését is katalizálhatják. Ez a két folyamat nagyon sok esetben párhuzamosan megy végbe.

Az ipari enzimek felhasználási területeinek további bővülését szolgálhatja a hatékony technológiai eljárások kidolgozása. A mai modern enzimgyártási technológiák mikroorganizmusokat alkalmaznak erre a célra. Az egyre növekvő igény az ipari enzimekre nézve megköveteli az enzimgyártási technológiák fejlesztését, beleértve a rekombináns DNS technológiával nemesített ipari törzsek alkalmazását is. Az enzimes technológiák fejlesztésénél kiemelt szempont az új tulajdonságokkal rendelkező enzimek felkutatása.

A *T. lanuginosus* valódi termofil fonalasgomba az alkalmazott növekedési szubsztrátumtól függően, legalább két különböző extracelluláris α -galaktozidáz enzimet szintetizál.

Kísérleteimhez a *T. lanuginosus* CBS 395.626/b gombatörzset választottam, mivel erről a törzsről már leírták, hogy α -galaktozidáz termelő. Bizonyítást nyert, hogy szacharózon, illetve galaktomannánon szintetizált extracelluláris enzimeik eltérő tulajdonságúak. Ez megnyilvánul molekulatömegükben és szubsztrátum specifikitásukban is. Eddigi vizsgálatok szerint az

α -galaktozidáz enzim lényegesen magasabb aktivitást mutatott szacharóz tartalmú tápközegen, mint galaktomannán növekedési szubsztrátumokon.

A fentiek alapján kutatásom céljául a galaktomannán szubsztrátumon történő α -galaktozidáz enzim előállításának fokozását választottam. Terveim között szerepelt az enzim előállításhoz szükséges fermentációs idő minimalizálása, valamint a tápközeg összetétel optimalizálása a maximális enzimaktivitás elérése érdekében.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az α -galaktozidáz enzim jellemzése

Az α -galaktozidáz enzim (EC 3.2.1.22) egy olyan glikozidhidroláz enzim, amely megfelelő körülmények között az α -galaktozidos kötések hidrolízisét és képződését katalizálja. Szisztematikus neve: α -D-galaktozid-galaktohidroláz. Triviális neve a melibiáz, melyet egyik természetes szubsztrátumáról, a melibióz diszacharidról kapott.

2.1.1 Előfordulás

Az α -galaktozidáz enzim a természetben igen széles körben előfordul. Megtalálható növényi és állati szövetekben, emberi szervezetben, valamint számos mikroorganizmus is szintetizálja. A raffinóz-család oligoszacharidjait (raffinóz, sztachióz, verbaszkóz) tartalmazó növényekben fordul elő jelentősebb mennyiségben. Ilyen növények például a pillangósok (a lucerna -*Medicago sativa*), hüvelyesek (lencse - *Lens culinaris*, lóbab - *Vicia faba*), kabakosok (tök - *Cucurbita pepo*, dinnye - *Citrullus battich*) (Dey & Pridham, 1972). A hüvelyesek endospermiumában tartalék tápanyagként nagy mennyiségben fordulnak elő a galaktomannánok. Emellett szacharózt, raffinózt, sztachiózt és nagyobb polimerizációs fokú galakto-oligoszacharidokat is raktároznak a magvak. Csírázás során aktiválódik az α -galaktozidáz enzim, amely a magvakban található α -galaktozidos kötést tartalmazó oligo- és poliszacharidokat hidrolizálja, így tápanyagot és energiát szolgáltat a csíranövény számára. A bélmikrobiota egyes fajtái szintén rendelkeznek α -galaktozidáz enzimmel, ezáltal és saját élettévékenységük révén metabolizálják az emberi emésztés során nem hasznosuló galakto-oligoszacharidokat. Az emlősök szerveiből is eredménnyel izolálták az enzimet, mint például a lépből, a májból, méhlepényből. Sikeresen vonták ki az α -galaktozidázt rovarokból, mint például a májusi cserebogárból (*Melolontha melolontha*) is (Dey & Pridham, 1972). A mikroorganizmusok extracelluláris (*Aspergillus niger*, *Bacteroides ovatus*) és intracelluláris (*Mortierella vinacea*) α -galaktozidáz enzimekkel is rendelkezhetnek (Adya & Elbein, 1977., Annunziato et al., 1986., Gherardini et al., 1985., Kaneko et al., 1990., Shibuya et al., 1999.).

2.1.2 Az α -galaktozidáz által katalizált reakció

Hidrolízis során az α -galaktozidáz enzim az O-glikozidos kötéseket hidrolizálja. Az enzim a szubsztrátum nem redukáló láncvégi galaktóz molekuláját hasítja le. Az α -galaktozidáz enzimek eltérő szubsztrátum specificitással rendelkezhetnek. Szubsztrátumaik lehetnek galakto-oligoszacharidok, galaktomannánok és galakto-lipidek is (Schomburg & Salzmann, 1990).

Hidrolizáló tulajdonságán kívül számos karbohidroláz enzimről bebizonyították, hogy transzglykoziláló tulajdonsággal is rendelkezik (Scigelova *et al.*, 1999). Hasonlóan az α -galaktozidáz enzimek egyes reszintézis folyamatokat is képesek katalizálni.

Puchart és Biely (2005) a termotoleráns *Aspergillus fumigatus* IMI 385708-as törzséből izolált α -galaktozidáz enzimről megállapították, hogy hatékonyan katalizálja a transzfer reakciókat, ahol glikozil donorként 4-nitro-fenil- α -D-galakto-piranozidot használtak. Kísérleteik során kimutatható volt, hogy a fenti vegyület a reakció körülményei között akceptorként is szolgált, mivel a reakció elegyben detektálható mennyiségben volt jelen 4-nitro-fenil- α -D-galaktobióz.

Kimutatták, hogy a monoszacharidok gyenge, míg a diszacharidok és a hosszabb szénláncú oligoszacharidok pl. az α -1,4-glüko-maltooligoszacharidok, a β -1,4-glüko-cello-oligoszacharidok és a β -1,4-mano-oligoszacharidok hatékony akceptornak bizonyultak.

2.1.3 Szubsztrátumok

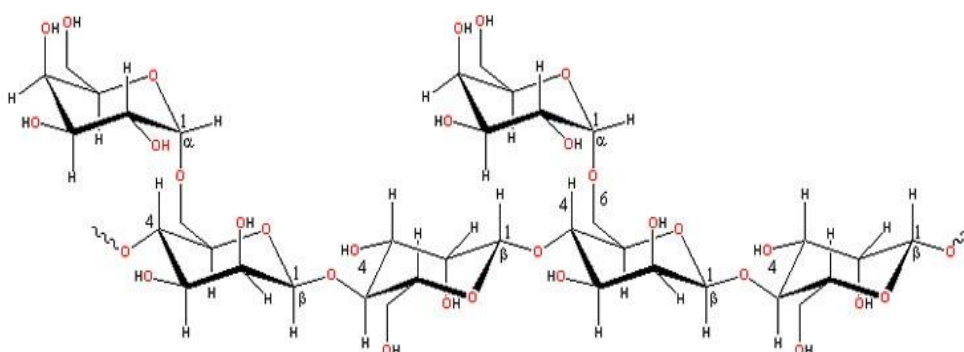
Az enzim szubsztrát specifikussága különböző lehet attól függően, hogy honnan izolálták. Döntő többségük α -1,6-os kötést tartalmazó galakto-oligoszacharidokon aktív, amelyről galaktóz egységeket hasítanak. Ezeknek a természetben előforduló képviselői:

- Melibióz: α -D-galaktózból és α -D-glükózból álló redukáló diszacharid
- Raffinóz: cukorrépában található nem redukáló triszacharid
- Sztachióz: nem redukáló tetraszacharid
- Verbaszkóz: nem redukáló pentaszacharid

A mannán típusú poliszacharidok, mint a mannánok, galaktomannánok, stb. nagyon fontos alkotóelemei magasabb rendű növényi sejteknek. Az α -galaktozidáz enzim különböző növényekből izolálható. A szentjánoskenyér-liszt (Locust Bean Gum) és a guar gumi (Guar Gum) is

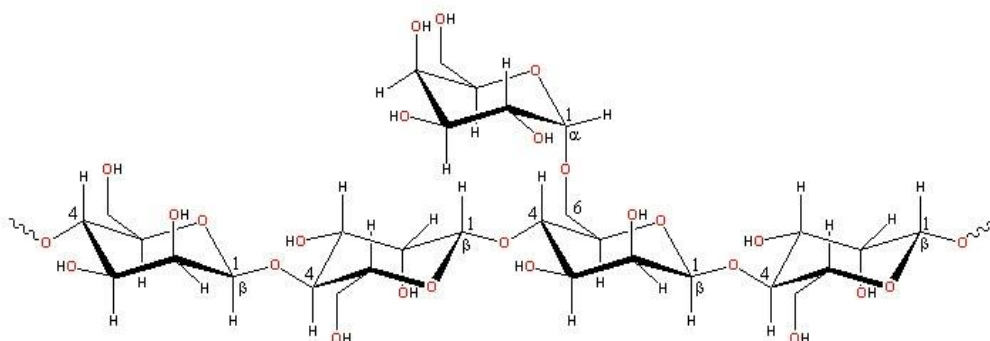
galaktomannán, így ezek induktorként szolgálhatnak a mannanázok és az α -galaktozidáz előállításához.

Az intakt galaktomannánon is aktív enzimet a *Cyamopsis tetragonobola* (guar) magjából, az endospermium őrlésével majd ezt követő részleges hidrolízisével nyerik (Bulpin *et al.*, 1990). A guar gumi egy galaktomannán, mely D-mannóz és D-galaktóz monomerekből felépülő poliszacharid. A molekulák lineáris főláncát egymáshoz β -1,4 glikozidos kötéssel kapcsolódó mannopiranozok alkotják, melyekhez α -1,6-os glikozidos kötéssel egy-egy galaktopiranoz kapcsolódik (1. ábra).



1. ábra A guar gumi kémiai szerkezete
(<http://www.lsbu.ac.uk/water/hygua.html>)

A szentjánoskenyér-liszt egy élelmiszeripari adalékanyag, melyet a mediterrán térségben élő *Ceratonia siliqua* (szentjánoskenyérfa) magjából nyernek ki. Kémiai szempontból a guar guminak több galaktóz elágazása van, mint a szentjánoskenyér guminak (2. ábra).



2. ábra A szentjánoskenyér gumi kémiai szerkezete
(<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyloc.html>)

Eddigi kutatások szerint a *Thermomyces lanuginosus* α -galaktozidáz enzimjei különböző szubsztrátum specifitással rendelkezhetnek. A szacharózon előállított α -galaktozidáz enzim nem

aktív galaktomannánokon – növényi szentjánoskenyér és guar gumi. Rezessy-Szabó (2003) kísérletében feleslegben alkalmazott enzimeket a reakció megvalósulásának érdekében, tehát 1 g szubsztrátumhoz 16 μ g enzim preparátumot adott. A hidrolízis során nem szabadult fel galaktóz így arra lehetett következtetni, hogy a galaktomannánok nem szubsztrátumai ennek az enzimnek.

2.1.4 Az α -galaktozidáz enzim előállítási lehetőségei

A növényi eredetű α -galaktozidázok mellett a fonalas gomba eredetű enzimek között is találhatóak olyan enzimek, amelyek galaktomannánokból galaktózt tesznek szabaddá. Ilyen enzimek szintézisére az alábbi fajok alkalmazhatóak: *Aspergillus tamarai* (Civas *et al.*, 1984), *Aspergillus niger* (Adya & Elbein, 1977; Kaneko *et al.*, 1991), *Trichoderma reesei* (Zeilinger *et al.*, 1993), *Penicillium ochrochloron* (Dey *et al.*, 1993). A *Thermomyces lanuginosus* gomba α -galaktozidáz enzim termelésével átfogóan foglalkozott Rezessy-Szabó és kutatócsoportja (2007). Eredményeik rávilágítanak arra, hogy a gomba a környezeti körülményeknek megfelelően két eltérő tulajdonságú α -galaktozidáz enzimet szintetizál. Szacharóz alapú tápközegen a gombatörzs jelentős α -galaktozidáz aktivitást mutat. Az előállított enzim molekulatömege 94 kDa-nak adódott és nem volt aktív galaktomannán szubsztrátumon. Az α -galaktozid kötéseket tartalmazó polimerek (pl. a guar gumi, vagy a szentjánoskenyér gumi) szénforrásként való alkalmazása a tápközegben egy kisebb molekulatömegű (53-54 kDa) enzimet eredményezett. Ez a felfedezés irányította a figyelmet a galaktomannán tartalmú tápközegek alkalmazására az α -galaktozidáz termeléshez. Svastits-Dücső és munkatársai (2009) e területen elért eredményekről számolnak be. A 6 napos fermentációk során kapott aktivitásértékek nem érték el az 5 NE/ml titert.

2.1.5 Optimális működési feltételek

Különböző forrásokból izolált enzimek esetén az optimális működési paraméterek igen széles határok között mozognak (Schomburg & Salzmann, 1990).

A hőmérséklet emelésével az enzim reakciók sebessége növelhető, másrészt mivel az enzim fehérjetermészetű, magas hőmérsékleteken hődenaturáció is bekövetkezik. Az optimális hőmérsékleten vagy hőmérsékleti tartományon belül az enzim maximális sebességgel katalizálja az adott reakciót. Fontos az enzimek stabilitásának vizsgálata is, mivel néhány esetben az enzimfehérje már denaturációt szenvedhet az aktivitásra vonatkozó optimális hőmérsékleten is. A pH, az ionerősség, a redoxpotenciál, a szubsztrátumok kémiai szerkezete és az egyéb fehérjék jelenléte

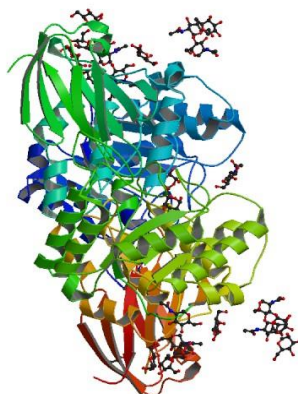
nagyban befolyásolhatja az enzimek aktív konformációját és ezáltal működésüket. Az **1. táblázat**ban néhány fonalas gomba optimális pH és hőmérséklet adatait hasonlítottam össze.

1. táblázat Fonalas gomba eredetű α -galaktozidáz enzim enzimaktivitásának optimális paraméterei

Eredet	α -Galaktozidáz	pH	Optimális Hőmérséklet	Hivatkozás
<i>Aspergillus ficuum</i> NRRL 3135	extracelluláris	6,0	60°C	Zapater <i>et al.</i> (1990)
<i>Aspergillus terreus</i>		4,0	65°C	Falkoski <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus species</i>		6,5	30°C	Waghmare <i>et al.</i> (2007)
<i>Monascus pilosus</i>	intracelluláris	4,5-5,0	55°C	Wong <i>et al.</i> (1986)
<i>Penicillium canescens</i>	extracelluláris	4,0-5,0	55°C	Sinitsyna <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium griseoroseum</i>		5,0	45°C	Falkoski <i>et al.</i> (2006)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> IMI 158749	extracelluláris	4.5-5,0	65-70°C	Puchart <i>et al.</i> (2000)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 395.62/b	extracelluláris	5,0-5,5	65°C	Rezessy-Szabo <i>et al.</i> (2007)

2.1.6 Az α -galaktozidáz enzim szerkezete

Számos enzim szekvenciája és 3D-s szerkezete megtalálható a fehérje adatbankban (www.rcsb.org/pdb). Az α -galaktozidáz térszerkezete és kristályosodási körülményeinek feltárása gyógyászati szempontból is fontos. A Fábry-kórban szenvedő betegek szervezetéből hiányzik az α -galaktozidáz enzim. E nélkül az enzim nélkül bizonyos anyagok (elsősorban a globotriaoszil ceramid vagy GL-3) lebontása nem történik meg, így az a sejtekben marad. Az anyag felhalmozódik az érfalakban és a szövetekben, mely szív, vese és az agy szabályos működését akadályozza. A humán eredetű 398 aminosavból álló α -galaktozidáz enzim kristályszerkezete a **3. ábrán** látható.



3. ábra: Humán eredetű α -galaktozidáz enzim kristályszerkezete
(www.rcsb.org/pdb)

2.1.7 Az α -galaktozidáz enzimalkalmazási lehetőségei

Enzimeket széles körben állítanak elő ipari fermentációval. A biotechnológiákban elsősorban extracelluláris enzimek termelését részesítik előnyben, amikor a termék a fermentáléba választódik ki.

Az α -galaktozidáz enzim szubsztrát specifikussága igen széles tartományban mozog, valamint hidrolitikus aktivitása mellett transzgalaktozilálási képességgel is rendelkezik, melyet oligoszacharid szintézisek során lehet kiaknázni.

2.1.7.1 Élelmiszeripar

Az α -galaktozidáz enzimnek fontos szerepe van a répacukorgyártásban. Mivel a raffinóz gátolja a szacharóz kikristályosodását, ezért Linden (1982) a *Mortierella vinacea* pelletben található enzimmel hidrolizálta a cukorszirupban lévő raffinózt, így növelve annak cukorhozamát.

Jó kolloid tulajdonságainak és az emberi szervezetre gyakorolt pozitív hatásának köszönhetően, a galaktomannánokat (szentjánoskenyér gumi és guar gumi) élelmiszeradalékként széles körben alkalmazzák az élelmiszeriparban, hogy javítsák a termékek állagát és érzékszervi tulajdonságait. A szentjánoskenyér gumi kedvező gélesedési tulajdonsággal rendelkezik, de alkalmazása drágább, mint a rosszabb gélesedési tulajdonsággal rendelkező guar gumié. Amint az 1. és 2. ábra összehasonlításából is kiderül, a guar gumi több α -galaktozidos kötéssel kapcsolódó galaktózt tartalmaz, mint a szentjánoskenyér gumi, így a guar gumi részleges hidrolízisével javítható gélesedési tulajdonsága.

2.1.7.2 Növényi eredetű galakto-oligoszacharok hidrolízise

A hüvelyesek jelentős mennyiségben tartalmaznak α -galakto-oligoszacharidokat. Ezen élelmiszerösszetevők antinutritív tulajdonságúak, mivel gátolják az emésztésben fontos tripszin enzim működését. Továbbá, mivel az emberi emésztőrendszerből hiányzik az α -galaktozidáz enzim, így az α -galakto-oligoszacharidok nem bomlanak le és nem szívódnak fel a vékonybélben, azaz kémiaiilag változatlan formában jutnak el a vastagbélbe. Itt a bélbaktériumok növekedési szubsztrátumként hasznosítják gázképződés mellett, flatulenciát okozva ezáltal. A hüvelyesek e tulajdonsága korlátozza széleskörű felhasználásukat a táplálkozásban (Castillo *et al.*, 1990). A hüvelyes alapú ételek előkészítésénél, a bennük lévő α -galaktozidáz enzim működéséhez kedvező körülmények teremthetők áztatással, de alternatívaként szolgálhat ezen nyersanyagok enzimes

kezelése is, mely csökkentheti a gyomorbántalmakat, továbbá előnyösen hat a bennük lévő tápanyagok hasznosulására is. A szója egy hüvelyes növény mely olcsó és jó minőségű fehérjével rendelkezik, ezáltal egyre kedveltebb kiegészítőként használják az élelmiszerekben és a takarmányokban. A szójatej alkalmazható a tehéntej, illetve az anyatej kiváltására olyan felnőtteknél vagy csecsemőknél, akik allergiások a tejfehérjére és/vagy laktáz hiányban szenvednek.

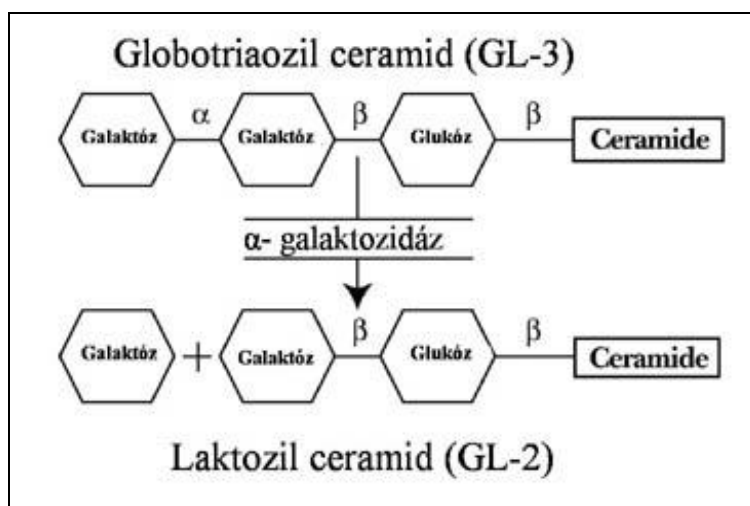
2.1.7.3 Orvostudomány

Az α -galaktozidáz enzim segítségével a B csoportú vér 0-vá alakítható, mégpedig úgy, hogy a B csoportú vér sejtjeinek felszínén lévő glikoproteinekről az α -galaktozidos kötésekkel kapcsolódó galaktóz molekulákat lehasítja. Ez azért jelentős, mert az univerzálisan hasznosítható 0-s vércsoport hiányát pótolhatjuk a B-s vércsoport átkonvertálásával. Ez a művelet biztonságosan alkalmazható a transzfúziós gyakorlatban (Lenny *et al.*, 1994).

Fábrý kór egy olyan öröklődő betegség, amelyet egy hibás gén okoz. Az örökítőanyag felépítésének hibája miatt az α -galaktozidáz enzim hiányzik, vagy csak elégtelen mennyiségben van jelen a szervezetben. E nélkül az enzim nélkül bizonyos anyagok (elsősorban a globotriaoszil ceramid vagy GL-3) lebontása a szervezetben nem történik meg, így az a sejtekben marad. Következésképpen az anyag felhalmozódik. Ez a folyamatos felhalmozódás okozza a Fabry-kórral kapcsolatos legtöbb problémát. Az α -galaktozidáz enzim szerepe, hogy bizonyos anyagokat lebontson, amelyeket aztán a sejt újrahasznosít, vagy kiürülnek a szervezetből (**4. ábra**). A feladat elvégzéséhez elégséges mennyiségű α -galaktozidáz enzim nélkül ezek az anyagok (elsősorban a GL-3) felhalmozódnak a lizoszómában, különösen az érfal sejtjeiben. Ezért a Fabry-kórt lizoszómális tárolási betegségnek is nevezik a lizoszómában felhalmozódó GL-3 miatt. (<http://fabry.mnsza.hu/>).

A Fábrý-kór kezelésére kidolgoztak egy enzimterápiás módszert, amelyet a szakirodalomban „Enzyme Replacement Therapy” (ERT) néven hivatkoznak. Az enzimterápiás módszerek segítségével a plazma GL-3 szintjét, valamint a vese, szív és bőr lipidlerakódásának mértékét csökkentik. Az enzimhiány kezelésére mind α -galaktozidáz [agalzidáz-alfa (0,2 mg/kg)], mind β -galaktozidáz [agalzidáz-béta (0,2 mg/kg, vagy 1,0 mg/kg)] terápiát egyaránt alkalmaznak. Mindkét kezelés három hónapon belül jelentős GL-3 csökkenést eredményezett a Fábrý- kórban szenvedő férfiak esetében, amely szint a későbbiekben is stabil maradt. Számos férfi betegnél megfigyeltek az α -galaktozidáz enzim elleni antitestek termelését. Elsődlegesen az ilyen betegeknek alkalmazták az agalzidáz-béta-val történő kezelést. Az antitesteket termelő betegek esetében kisebb

mértékű plazma GL-3 korrekciót tapasztaltak, míg nagy dózisu agalzidáz-béta kezelés hasonlóan eredményesnek bizonyult, mint az antitesteket nem termelő betegeknél. A Fábry-kórban szenvedő nőknél a plazma GL-3 koncentráció relatív kevesebb volt a kezelés megkezdése előtt. Mind agalzidáz-alfa és agalzidáz-béta kezelés során a nőknél jelentős globotriaoszil ceramid csökkenés volt tapasztalható az enzimterápiás kezelése során (Breemen *et al.*, 2011).



4. ábra Fábry-kórnál a GL-3 nem bontódik le GL-2-vé az enzim hiány miatt

2.1.7.4 Papíripar

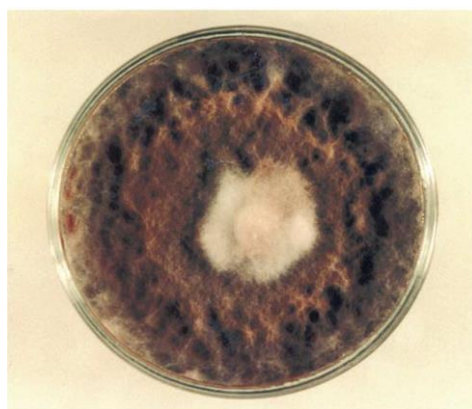
Az elmúlt évtizedekben a biotechnológia, azon belül is a fonalasgombák, baktériumok és extracelluláris enzimek alkalmazása egyre szélesebb körű felhasználási lehetőséget nyújtott a cellulóz- és papíriparnak. A fafeldolgozás során hidrolizáló enzimkomplexek segítségével bontják a hemicellulózokat. A fák növényi sejtfalát poliszacharidok alkotják, melyek β -1-4 kötésű glükomannánokat és α -1-6 kötésű galaktopiranozil egységeket tartalmaznak, cellulóz beékelődésével. Az α -1-6-os kötés hasítására α -galaktozidáz enzimet használnak. Enzimes előfehérítés, a papíripari szennyvíz tisztítása, illetve vegyszerek és üzemanyagok előállítása fából származó lignocellulózokból ma már használt, de folyamatos fejlesztésre szoruló iparág (Mansfield & Esteghlalian, 2003).

2.2 *Thermomyces lanuginosus* termofil fonalas gomba jellemzése

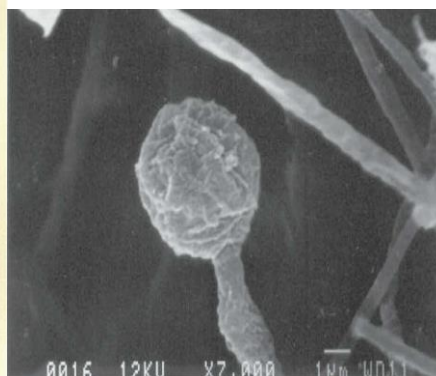
Rendszertani besorolása:

Birodalom: *Eucaryota*
Ország: *Fungi*
Tagozat: *Eumycota*
Altagozat: *Deuteromycota*
Osztály: *Hyphomycetes*
Nemzetiség: *Thermomyces*
Faj: *Thermomyces lanuginosus*

A *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*) széles körben elterjedt termofil gomba, mely általában önmelegedő szerves törmelékből (komposzt) izolálható. 1899-ben először Tsiklinskaya izolálta burgonyából, melyet kerti talajjal oltott be, majd 52-53°C-on inkubálta fehér kenyéren (Cooney & Emerson, 1964). A *Thermomyces lanuginosus* egy melegkedvelő gomba mely általában maximum 60°C és minimum 30°C között szaporodik, az optimális szaporodási hőmérséklete 50°C körül mozog, az optimális pH értéke pedig 6,5. A *Thermomyces lanuginosus* fonalas gombánál már a harmadik napnál észrevehető a telepnövekedés. A 60-80 mm átmérőjű telepek 45-50°C-os inkubálás mellett érhetőek el Potato-Dextrose-Agar (PDA) agaron. A kezdetben fehér, piszkosfehér telepek később zöldesszürkék majd lilásbarna színűek lesznek (5. ábra).



5. ábra A *Thermomyces lanuginosus* SSBP telepmorfológiája PDA agaron 7 napig tartó inkubálást követően (Singh *et al.*, 2003)



6. ábra *Thermomyces lanuginosus* mikroszkópikus képe (Singh *et al.*, 2003)

A **6. ábrán** az 1,5-4,0 μm átmérővel rendelkező hifák jól láthatóak mikroszkópikus felvételeken. Ezek a hifák a táptalaj felszínéről nem hatolnak be a táptalajba. Megfigyelhetők konídiumtartók is melyek a léghifák derékszögű elágazásain fejlődnek. A gömb alakú, ivartalan egysejtes konídiumok akár 6-8 μm átmérőjűek is lehetnek. A gombának számos törzse alkalmas extracelluláris enzimek előállítására, beleértve a xilanázt (Singh *et al.*, 2003), az α -amilázt (Nguyen *et al.*, 2002), a glükóamilázt (Li *et al.*, 1998), a lipázt (Berg *et al.*, 1998) és az α -galaktozidázt (Rezessy-Szabo *et al.*, 2007).

Svastits-Dücső és munkatársai (2009) a *Thermomyces lanuginosus* CBS 365.62/b jelzésű törzs fermentációja során kimutatták, hogy eltérő kémiai szerkezetű növekedési szubsztrátum esetében két különböző tulajdonságú α -galaktozidáz enzimet szintetizál. Ezek az enzimek molekulatömegükben és szubsztrátum specifitásban eltérnek egymástól. Megállapításuk szerint a galaktomannán szubsztrátumon szintetizált α -galaktozidáz enzim stabilitása jobb volt, mint a szacharóz tápközegen előállított enzimé.

3 KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉS

Kísérleti munkám során célul tűztem ki a *Thermomyces lanuginosus* fonalas gomba α -galaktozidáz enzim előállítási technológia produktivitásának növelését galaktomannán szubsztrátumon. Kísérleti munkám során a *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzset és galaktomannánként szentjánoskenyér gumit (Locust bean gum – LBG) használtam. Svastits- Dücső és munkatársai (2009) által közölt eredmények alapján terveim között szerepelt a fermentációs idő minimalizálása és technológiai módosítással olyan enzimfermentáció alapjainak lefektetése, amely biztonságosan nagyobb, mint 5 NE/ml aktivitást biztosít.

E cél elérése érdekében a következő feladatok megvalósítását terveztem:

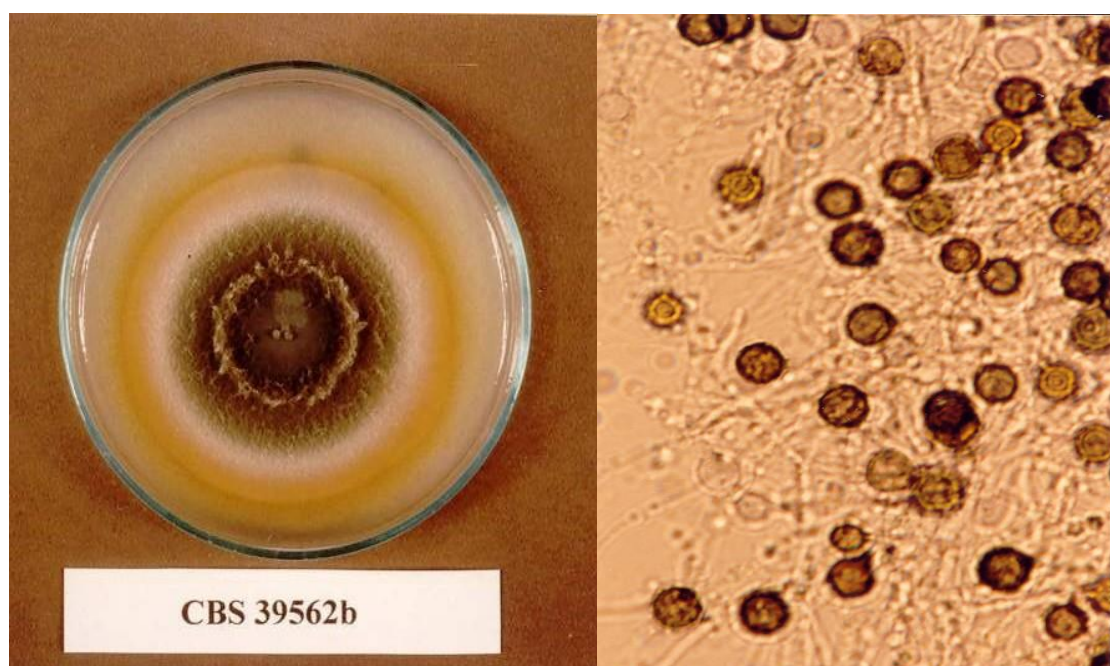
- az enzim termelés profiljának meghatározása az idő függvényében;
- különböző fermentációs technikák összehasonlító elemzése;
- különböző felületaktív anyagok hatásának vizsgálata az extracelluláris enzim kiválasztására;
- valamint a tápközeg összetétel módosításának hatásait is fel kívántam tárni.

Kísérleteimet a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékének Fermentációs Laboratóriumában végeztem.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A felhasznált mikroorganizmus

Az α -galaktozidáz enzim előállítására a fermentációk során enzimforrásként a *Thermomyces lanuginosus* CBS 385.62/b jelzésű törzset alkalmaztam. A gomba számos extracelluláris hidrolizáló enzimet termel, köztük α -galaktozidáz enzimet is. Növekedési tulajdonságaira jellemző, hogy két nap után 45°C-on termosztálva 50 mm-es fehér, puha filcszerű lapos telepek jelennek meg PDA agaron. A harmadik negyedik napra a telepek elkezdenek szürkülni, majd a konídiumok képződése miatt sötétbarna, fekete árnyalatúvá válnak (7. ábra).



7. ábra *Thermomyces lanuginosus* telepmorfológiája és mikroszkópikus képe (Dobolyi, 1997)

4.2 Alkalmazott tápközegek

A fenntartáshoz szükséges tápközeg

Burgonya-glükóz-agar (PDA, Potato Dextrose Agar)

Burgonya	500 g
Glükóz	20 g
Agar-agar	15 g
Desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve
pH	6,6

Inokulum tápközeg

Glükóz-aszparagin tápleves (Haasum et al., 1991)

Glükóz	20 g
L-aszparagin	4 g
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
Vogel- féle nyomelem oldat	1 ml
Desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve

Vogel-féle nyomelem oldat (Vogel, 1964):

Citromsav x H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6H ₂ O	1 g
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃ (anhidrid)	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	0,05 g
Desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve.

Alkalmazott fermentációs tápközeg

LBG 1% tápközeg:

Galaktomannán (Locust bean gum)	10 g
Élesztő	4 g
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
Vogel-féle nyomelem oldat	1 ml
Desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve.

4.3 Tenyésztési módszerek

4.3.1 Törzsfenntartás

A törzsfenntartáshoz burgonya-glükóz-agart (PDA) alkalmaztam. Ferde agaros kémcsőtenyészetből 0,25 cm² agar darabot szikével kivágtam, majd egy Petri csésze steril tápagar felületére helyeztem lamináris fülke alatt. Ezt követően 50°C-on 10 napig inkubáltam. A konídiumos tenyészetet 4°C-on hűtőszekrényben tároltam felhasználásig.

4.3.2 Inokulum tenyészet készítése

A Petri csészében PDA agaron kinőtt tenyészetből steril szikével kivágtam egy 0,5*0,5 cm² nagyságú agar darabot és 10 ml 0,01 %-os Triton-X oldatot tartalmazó kémcsőbe tettem. A konídiumokat intenzív rázással, Vortex segítségével mostam le az agarról.

Autoklávban 121°C-on 20 percig sterilizett 150 ml inokulum tápközeget tartalmazó 500 ml-es Erlenmeyer lombikba, 7 ml konídium szuszpenziót oltottam be. A tenyésztést Gallenkamp rázógépen 47°C-on és 220 rpm fordulaton 2 napig végeztem.

4.3.3 Enzimtermelés rázatott lombikos tenyészettel

Az extracelluláris enzimet rázatott lombikos fermentációval állítottam elő. 500 ml-es Erlenmeyer lombikokba 150 ml tápközeget tettem, melyet lamináris fülke alatt oltottam be 5-5 ml-nyi inokulum tenyészettel. A fermentációt a kísérleti tervtől függően 47°C-on, 220 rpm fordulatu ráztatás mellett 4-12 napig végeztem. A fermentáció lefolyásának értékelésére naponta mintákat vettem. A micélium eltávolítására és a sejtmentes tenyészlé előállításához szűrést és centrifugálást

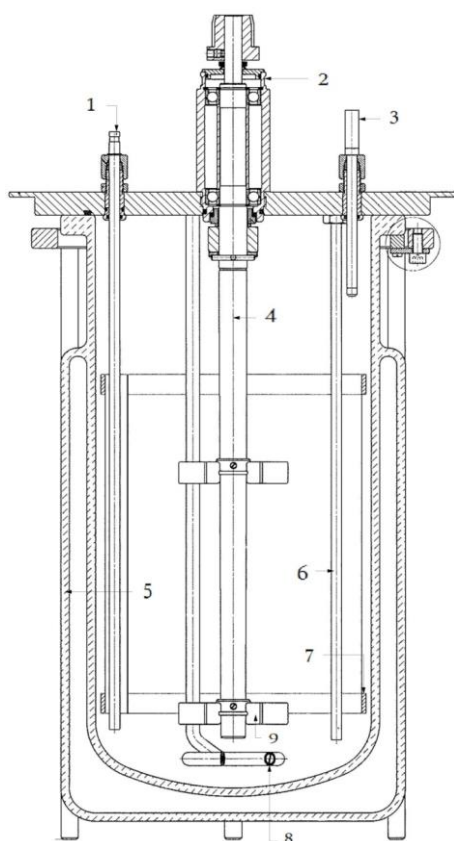
alkalmaztam, melyet 10 percig 12000 rpm fordulatszámon valósítottam meg. Ezt követően meghatároztam az enzimaktivitást és ellenőriztem a pH-t.

4.3.4 Enzimtermelés laboratóriumi fermentorban

A fermentoros tenyésztésekhez 2 liter hasznos térfogatú Biostat® B fermentort (B. Braun Biotech International) (8. ábra) alkalmaztam. A fermentort összeszerelése és a pH szenzor kalibrálása után a tápoldattal együtt autoklávoztam, majd biológiailag steril fülke alatt oltottam be az 10 tf %-nyi 2 napos inokulum tenyészettel. A fermentációt befolyásoló legfőbb paraméterek: a tápoldat minősége, a hőmérséklet, a pH, a keverés jellemzői és a levegőztetés vagy az anaerob környezet biztosítása. A fermentor duplikátorozott, azaz kettős üvegfallal van ellátva; ebben a köpenytérben lehet áramoltatni a hűtő/fűtő vizet a szükséges 47°C-os hőmérséklet biztosításához.

Az aerob fonalas gombák fermentálása során fontos az oldott oxigénnel való ellátás, amelyet levegőztetéssel valósítottam meg. A fermentlé homogenitásának biztosítására keverést alkalmaztam. A kísérlet 4 napig 150 rpm fordulatu keverés mellett zajlott.

A fermentációt naponkénti steril mintavételezéssel követtem és mértem az enzimaktivitást, valamint ellenőriztem a tenyészet pH-ját.



1. mintavevő
2. keverő csapágy
3. hab szonda
4. tengely
5. duplikált falú köpeny (víz)
6. hőmérő elektród
7. hullámtörő
8. levegőztető
9. keverőlapát

8. ábra Biostat® B fermentor műszaki rajza

4.4 Alkalmazott analitikai módszerek

4.4.1 A felhasznált reagensek és oldatok

Szubsztrátum oldat készítése az enzimaktivitás méréshez:

Az enzimaktivitás meghatározásához 15 mM-os para-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid oldatot használtam szubsztrátumként. Ehhez 0,0225 g para-nitrofenil- α -D-galaktopiranozidot mértem ki főzőpohárba analitikai mérlegen majd egy kevés desztillált vízben feloldottam és végül egy 50 ml-es mérőlombikban jelre töltöttem. A szubsztrátum oldatot felhasználásig hűtőszekrényben, 4°C-on tároltam.

Az enzimreakció leállításához szükséges sóoldat elkészítése:

Az enzimreakció leállításához 0,1 N Na_2CO_3 oldatot használtam, mely elkészítéséhez 2,65 g Na_2CO_3 -ot mágnes keverőn oldottam fel 500 ml desztillált vízben.

A pufferoláshoz szükséges McIlvaine puffer (pH=4,2) elkészítése:

A puffer elkészítéséhez szükség van egy **A** és egy **B** oldatra.

A: 0,1 M citromsav törzsoldat

(21,008 g citromsav + 1000 ml desztillált víz)

B: 0,2 M Na_2HPO_4 törzsoldat

(71,66 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 1000 ml desztillált víz)

A puffer oldat pH=4,2-re való beállításához 61,5 cm³ citromsav és 38,5 cm³ Na_2HPO_4 oldatra volt szükség. A 38,5 cm³ 0,2 M Na_2HPO_4 törzsoldatot kimértem főzőpohárba, majd folyamatos kevertetés mellett adagoltam hozzá a citromsav oldatot. Eközben elektromos pH-mérőn figyeltem a pH változást és szükség esetén pH korrekciót végeztem.

4.4.2 Az enzimaktivitás meghatározás

Az enzimaktivitás mérését a minták különböző hígításai mellett végeztem. A méréshez készítettem műszervakot, szubsztrátvakot és minden mintát tartalmazó reakcióelegyhez külön enzimvakot is. A reakcióelegyek térfogata minden esetben 1 ml volt, amelynek arányait a **2. táblázatban** mutatom be:

2. táblázat Reakció elegyek összetételei az enzimaktivitás méréshez

	Desztillált víz (ml)	McIlvaine puffer (ml)	Szubsztrát (ml)	Minta (ml)
Műszervak	0,7	0,3	0	0
Szubsztrátvak	0,2	0,3	0,5	0
Enzimvak	0,5	0,3	0	0,2
Reakció elegy	0	0,3	0,5	0,2

A 0,3 ml McIlvaine pufferből (pH=4,2) és 0,5 ml 15 mM-os para-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid szubsztrátból álló elegyet 5 percig 58°C-on előinkubáltam majd a reakció elindításához 0,2 ml mintát adtam hozzá. Az enzimreakciót 5 perc elteltével állítottam le, 5 ml 0,1 M-os nátrium-karbonát oldat hozzáadagolásával. A reakcióelegyek abszorbanciáját spektrofotométeren 405 nm-en mértem.

Az α -galaktozidáz enzim aktivitásának számítása:

Egy egységnyi α -galaktozidáz (E) az az enzimmennyiség, mely 1 μ mol para-nitrofenolt szabadít fel percenként az enzimreakció körülményei (pH=4,2 és T=58°C) között.

Az enzimaktivitást a következő képlettel határoztam meg:

$$\text{Aktivitás (NE/ml)} = (A_{\text{minta}} - A_{\text{EV}} - A_{\text{SV}}) \cdot H \cdot V_{\text{RE}} / 2,9237 \cdot t_{\text{RE}} \cdot V_{\text{bemérés}}$$

ahol, A_{minta} minta abszorbanciája,
 A_{EV} enzimvak abszorbanciája,
 A_{SV} szubsztrátvak abszorbanciája,
 H hígítás,
 V_{RE} reakció térfogat (1 ml),
 t_{RE} reakció idő (5 perc),
 $V_{\text{bemérés}}$ bemérési térfogat (0,2 ml),
2,9237 a para-nitro-fenollal készített kalibrációs egyenes meredeksége.

4.4.3 pH mérés

Az enzimtermelés és a szaporodás szempontjából, a mikroorganizmusok fermentációjakor fontos szerepet játszik a pH.

A pH értékek meghatározásához SevenMultiTM pH mérő berendezést alkalmaztam. A méréseket megelőzően minden nap kalibrálást végeztem 4-es és 9-es pH értékű pufferoldatok segítségével. A pH mérést sejtmentes fermentlevekben valósítottam meg.

4.5 Kísérlettervezés

Kísérleteim során a *Thermomyces lanuginosus* fonalas gomba, CBS 395.62/b törzs, α -galaktozidáz enzim termelésének optimalizálásához egy központi elrendezésű kísérlettervezési módszert alkalmaztam.

A tápközeg összetétel meghatározásnál a kísérleti körülményeket (a kísérleti tervet) egy 2^p típusú teljes faktoriális kísérlettervezési módszer alkalmazásával állítottam be, ahol „p” (faktorszintek) a vizsgálatba bevont optimalizáló paramétereket, faktorok számát jelenti. A faktorszintek pontos beállítási bizonytalansága elhanyagolható azon intervallum szélességéhez képest, amelyben az értékeket változtatjuk. A faktorok mennyiségi és minőségi is lehetnek, melyek két szinten vizsgálunk.

A z_j a j-edik faktort jelöli ahol a vizsgálati szintek $z_j^{\min}$ és $z_j^{\max}$. Ekkor az adott paraméter alap szintje (z_j^0) és variációs intervalluma (Δz_j) a következők szerint definiálható:

$$z_j^0 = \frac{z_j^{\max} + z_j^{\min}}{2}, \Delta z_j = \frac{z_j^{\max} - z_j^{\min}}{2}.$$

A z_j^0 ($j=1, \dots, p$) értékekkel jellemzett pontot a terv centrumának nevezzük.

A faktorokat a számítások egyszerűsítése és ortogonális kísérleti terv előállítása céljából a következőképpen célszerű transzformálni:

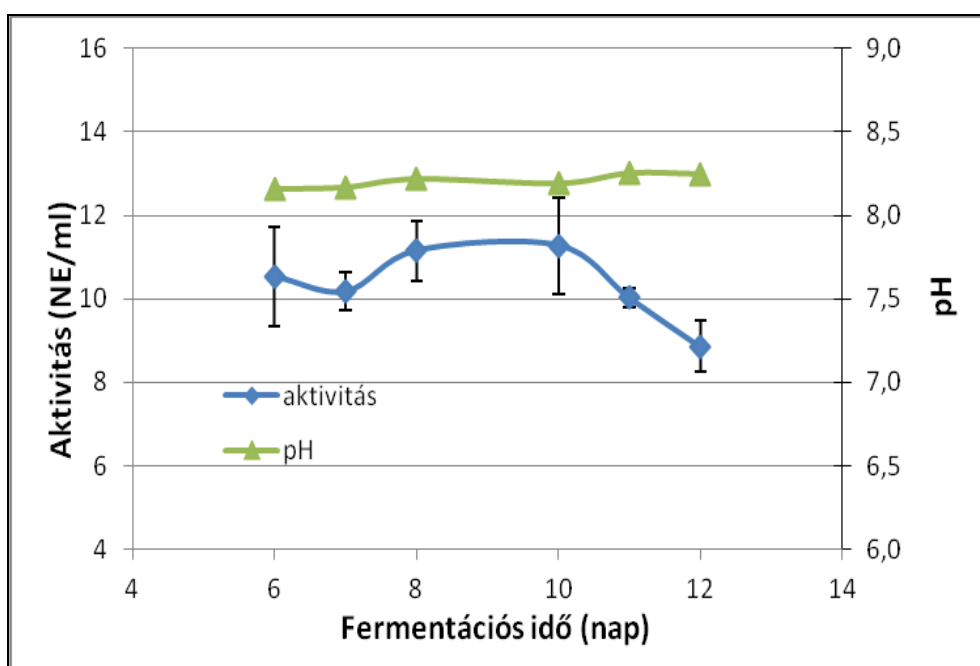
$$x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j} \quad (\text{Kemény \& Deák, 2002}).$$

5 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 Fermentációs idő minimalizálása

A fermentációs folyamatok megvalósításánál a gazdaságosság kiemelt szempont. Tekintettel arra, hogy e technológiák jelentős energia befektetést igényelnek, ezért kísérleteimben a fermentációs idő minimalizálására törekedtem.

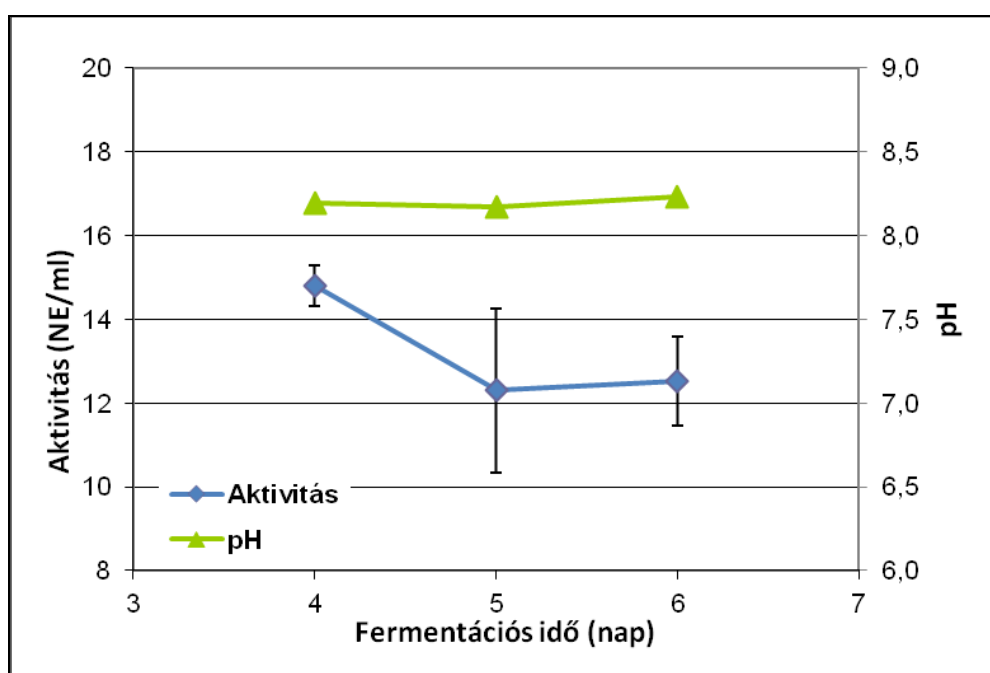
Kísérleteimben LBG 1 %-os tápközeget alkalmaztam és három párhuzamos fermentációt végeztem. Irodalmi adatokra (Svastics-Dücső *et al.*, 2009) támaszkodva az első vizsgálataimhoz 12 napos fermentációt terveztem és valósítottam meg és az α -galaktozidáz aktivitás alakulását a 6. naptól kezdve követtem. Az eredményeimet a **9. ábrán** szemléltetem.



9. ábra *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs α -galaktozidáz aktivitásának és pH értékeinek profilja 1%-os LBG tápközegen

A vizsgált időszakban a pH értékek a lúgos tartományban vannak és 8,15-8,25 értéktartományban változnak. Jól látható, hogy a CBS 395.62/b jelzésű törzs enzimtermelése 8-10 napig nő majd, a 12.

nap után hanyatló fázisba kerül a fermentáció. Meg kell jegyezni, hogy a 6. napon és a 10. napon mért eredmények között szignifikáns különbséget nem tapasztaltam. Ez felveti azt a kérdést, hogy az enzimaktivitás maximuma már a fermentáció korábbi időszakában elérhető-e. Ezért újabb kísérlet sorozatot terveztem, amelyben az enzimaktivitások alakulását a 4. és a 6. nap közötti időszakban vizsgáltam. Az eredmények megbízhatóságának biztosítása céljából ebben az esetben is három párhuzamos tenyésztést végeztem. Eredményeim értékeléséhez a mérési adatok átlagát használtam és a szórásokat is feltüntettem.



10. ábra *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs α -galaktozidáz aktivitásának és pH értékeinek profilja 1%-os LBG tápközegen

Követve a fermentációs idő és az enzimaktivitás kapcsolatát, a **10. ábrán** jól látható, hogy az α -galaktozidáz enzim aktivitása már a 4. napon meghaladta a 14 NE/ml értéket, majd lecsökkent és állandósult. Ebben a vizsgálatban kapott eredmények összhangban vannak az előző kísérlet eredményeivel. A 6. napon kapott eredmények összehasonlításával megállapítottam, hogy az első kísérletben kapott eredmények alapján az enzimaktivitások értékei 9,33 és 11,73 NE/ml tartományban prognosztizálhatók, míg a második kísérletben ez az értéktartomány 11,47-13,57 NE/ml-nek adódott. A fenti eredmények biológiai rendszerek esetében megfelelő reprodukálhatóságnak értékelhető. Tekintettel arra, hogy ebben az esetben sem sikerült az enzim aktivitás maximális értékét biztosító fermentációs időt rögzítenem, a további kísérleteimet a

fermentáció első napjától követtem a fermentáció a negyedik napjáig. Az eddigi eredményeim arra engedtek következtetni, hogy elegendő a négy napos fermentáció az α -galaktozidáz enzim maximális aktivitásának eléréséhez.

5.2 *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs α -galaktozidáz termelésének léptéknövelése

A 150 ml-es hasznos térfogatban megvalósított rázatott lombikos α -galaktozidáz enzim fermentáció léptéknöveléséhez laboratóriumi fermentorban történő tenyésztést valósítottam meg. A fermentoros kísérlethez 2 liter hasznos térfogatú Biostat® B fermentort (B. Braun Biotech International) alkalmaztam. A beoltást követően a fermentorból biológiailag steril fülke alatt 150 ml-t lefejtettem 500 ml-es steril Erlenmeyer lombikba, és 300 ml-t 1000 ml-es steril Erlenmeyer lombikba is. Ezeket a tenyésztéseket neveztem fermentoros kontrollnak. Párhuzamosan azonos körülmények között rázatott lombikos vizsgálatokat is végeztem. Mindegyik fermentáció megvalósítása 47°C-os hőmérsékleten történt. A vizsgálatok elsődlegesen levegőztetésben lévő különbségek feltárására szolgált. A fermentorban 1 vvm levegőztetést és 150 rpm kevertetést használtam. A rázatott lombikos kontroll kísérleteknél a levegőztetést egységesen 220 rpm rázatással biztosítottam.

E tenyésztések a különböző technológiák összehasonlítására szolgáltak. Kísérleti eredményeim összegzését a **3. táblázatban** adom közre.

3. táblázat *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs α -galaktozidáz termelésének léptéknövelése

Ferm. idő (nap)	Aktivitás (NE/ml)				
	Ráztatott lombik		Fermentoros kontroll		Biostat® B Fermentor
	150 ml	300 ml	150 ml	300 ml	1500 ml
1	2,29	0,44	1,75	0,79	0,04
2	9,18	5,97	2,89	2,91	2,14
3	9,97	5,75	7,58	5,77	4,30
4	16,85	8,54	6,63	7,40	1,71

A **3. táblázatban** szereplő értékek rávilágítanak arra, hogy a levegőztetésnek kiemelt jelentősége van a fonalas gombák tenyésztésénél és enzim termelésénél. Gyakorlatból ismert tény, hogy úgy a szuboptimális, mint a túlvegőztetés is produktivitás csökkenéshez vezethet. A legjobb enzimaktivitást a 150 ml-ben megvalósított rázatott lombikos tenyésztés során értem el, amely 16,85 NE/ml értéknek adódott. A nagyobb térfogatban megvalósított fermentációknál már az oldott oxigén koncentráció jelentős mértékben csökkenhetett, mivel itt az előbbi értéknek, mint egy felét (8,54 NE/ml) mértem. A fermentorban történő enzim fermentációnál a maximális enzimaktivitást már a 3. napon detektáltam, amely számértékileg 4,3 NE/ml volt. Ennek a gyenge eredménynek magyarázataként szolgálhat, hogy fermentorban nem volt egyenletes sem a micélium tömeg eloszlása, sem a levegőztetés mértéke. Erőteljes falnövekedés volt megfigyelhető és nagyobb micéliumtömeg képződött, mint a rázott lombikos tenyészeteknél. A gombafonalak jelentősen benőtték a levegőztető nyílásokat is. Ennek következtében a micélium tömeg oxigénnel való ellátása nem volt egyenletes és a micélium magban található fonalak pusztulásnak indultak és nem vettek részt az enzimtermelésben.

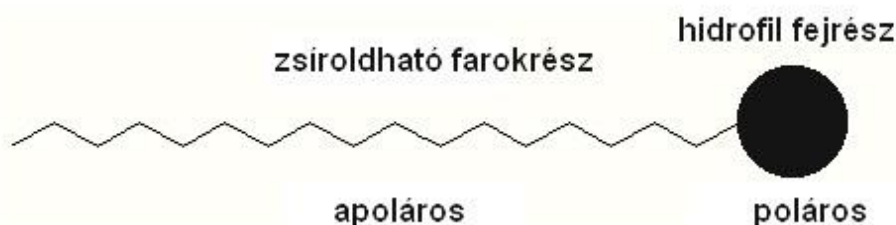
4. táblázat *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs α -galaktozidáz fermentációja során mért pH értékek
léptéknövelési kísérlet sorozatban

Ferm. idő (nap)	pH				
	Ráztatott lombik		Fermentoros kontroll		Biostat® B Fermentor
	150 ml	300 ml	150 ml	300 ml	1500 ml
1	7,90	7,70	7,64	7,51	7,34
2	8,13	7,72	7,81	7,33	7,61
3	8,15	7,59	7,72	7,27	7,63
4	8,32	7,53	7,88	7,62	7,70

A különböző térfogatarányok esetében a pH lefutása is eltérő volt (**4. táblázat**). A kiindulási pH közel azonos volt minden mintánál, azaz 7,34 és 7,9 között változott. A fermentációs idő előrehaladtával a különböző fermentációs rendszerekben mért értékek elmaradtak az enzimtermelés szempontjából kívánatos 8-as pH értéktől, kivéve a 150 ml-es tápközegben megvalósított rázatott lombikos tenyésztést, ahol az enzimtermelés maximális volt.

5.3 A különböző felületaktív anyagok hatása az extracelluláris enzimaktivitásra

A felületaktív anyagok molekulájukban egy hosszú, vízben rosszul oldódó szénhidrogén láncsal és egy vízben jól oldódó funkciós csoporttal rendelkeznek (**11. ábra**). A határfelületeken feldúsulva csökkentik a felületi feszültséget. Az élővilágban, mint a sejtmembrán alkotórészeiként jelentős szerephez juthatnak a membránok permeabilitási tulajdonságainak alakításában. Munkám során fontosnak tartottam a különböző szerkezetű felületaktív anyagok hatékonyságának vizsgálatát az enzim kiválasztásra vonatkozóan.



11. ábra Felületaktív anyagok elvi felépítése

(<http://www.vilaglex.hu/Lexikon/Html/Felulakt.htm>)

Kísérletemben különböző felületaktív anyagokkal kiegészített tápközegekben vizsgáltam az enzimaktivitás változását naponkénti mintavételezéssel. A felületaktív anyagokat 0,1 %-os mennyiségben alkalmaztam.

A kísérleteimben alkalmazott különböző Tween készítmények poliszorbát származékok, amelyek a zsírsav oldalláncok minőségében illetve, mennyiségében különböznek. Olyan amfoter tulajdonságú felületaktív anyagok, melyek savakban és lúgokban egyaránt oldódnak, savban kationaktív és lúgban anionaktív tulajdonságúak.

A Triton X-100 készítmény biotechnológiai alkalmazása szintén ismert, amely kémiai szerkezetének tekintetében egy polietilénlikol származék.

A kísérleti eredményeimet a felületaktív anyagot nem tartalmazó fermentációknál elért eredmények százalékában adom meg (**5. táblázat**).

5. táblázat *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs relatív α -galaktozidáz aktivitásának alakulása felületaktív anyagok hatására

Ferm. idő (nap)	Relatív α -galaktozidáz aktivitások (%)							Kontroll
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 65	Tween 80	Tween 85	Triton X-100	
1	86	116	115	107	114	121	29	100
2	120	118	103	113	121	92	44	100
3	118	132	136	136	106	106	48	100
4	104	110	120	131	114	108	61	100

Az 5. táblázat adataiból kiolvasható, hogy a Triton X-100, ami kémiai szerkezetét tekintve egy polietilénglikol származék, az enzim kiválasztás mechanizmusára negatív hatást gyakorol, mivel a kontroll fermentációhoz viszonyítva csupán 50 %-os aktivitást mutatott. A Tween készítmények jelenléte szinte minden vizsgálatnál jobb eredményeket adott, mint a kontroll fermentáció adatai. Szignifikáns különbségnek a 120 % feletti értéket fogadtam el. Így a legígéretesebb eredményt a Tween 65 készítmény adta, ahol mintegy 30-35%-os aktivitás növekedést kaptam. Továbbá megfigyeltem azt is, hogy a felületaktív anyagok jelenléte nem befolyásolta számottevően a fermentációk pH profilját.

5.4 Tápközeg összetétel optimalálása

A környezeti feltételek nagymértékben meghatározzák a fermentáció kimenetelét. Ezek közül is a legjelentősebb szerepe a tápközeg összetételnek van. A tápközeg összetétel optimalálásához egy ortogonális elrendezésű, kétszintű három faktoros kísérleti tervet hoztam létre és valósítottam meg, melyben mennyiségi és minőségi faktorok is szerepeltek. Mennyiségi faktorként a glükóz és a szentjánoskenyér gumi koncentrációk hatásait vizsgáltam, míg minőségi faktorként a Tween 65 és Tween 80 alkalmazásának hatását kívántam felderíteni.

Ebben a kísérletsorozatban arra is választ kerestem, hogy vajon a tápközeg glükózzal történő kiegészítése milyen hatást gyakorol az enzimtermelésre.

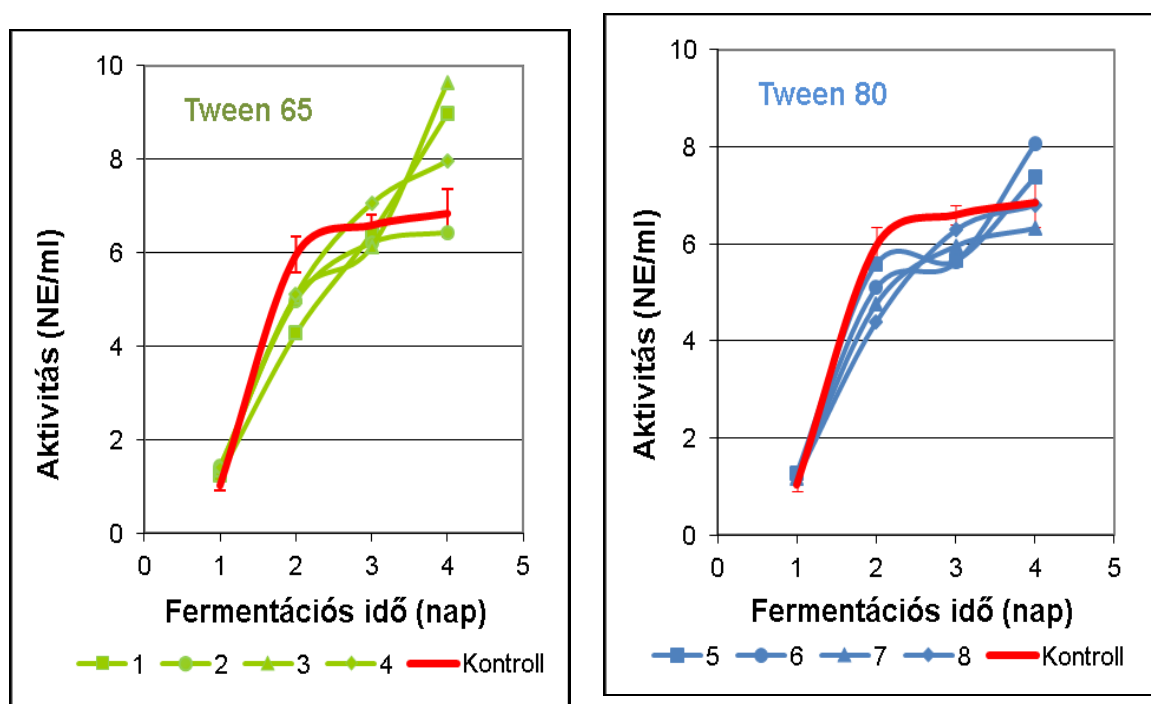
Az eredmények összehasonlíthatóságának érdekében három párhuzamos vizsgálattal kontroll fermentációkat végeztem. A kétszintű három faktoros kísérleti tervben a mennyiségi faktorok közül a glükóz esetében alapszintnek 0,3 (m/v) %-ot tekintettem és léptéknek 0,1 (m/v) %-ot választottam. Szentjánoskenyér gumi (LBG) esetében alapszintnek az eddigiekben alkalmazott 1 (m/v) % szolgált és léptékül 0,2 (m/v) %-ot választottam.

A transzformált faktorokat tartalmazó kísérleti terv felállítását a **6. táblázatban** mutatom be.

6. táblázat A kísérleti terv felállítása

Kísérlet	Tween 65		Kísérlet	Tween 80	
	Glükóz	LBG		Glükóz	LBG
1	-1	-1	5	-1	-1
2	-1	+1	6	-1	+1
3	+1	-1	7	+1	-1
4	+1	+1	8	+1	+1

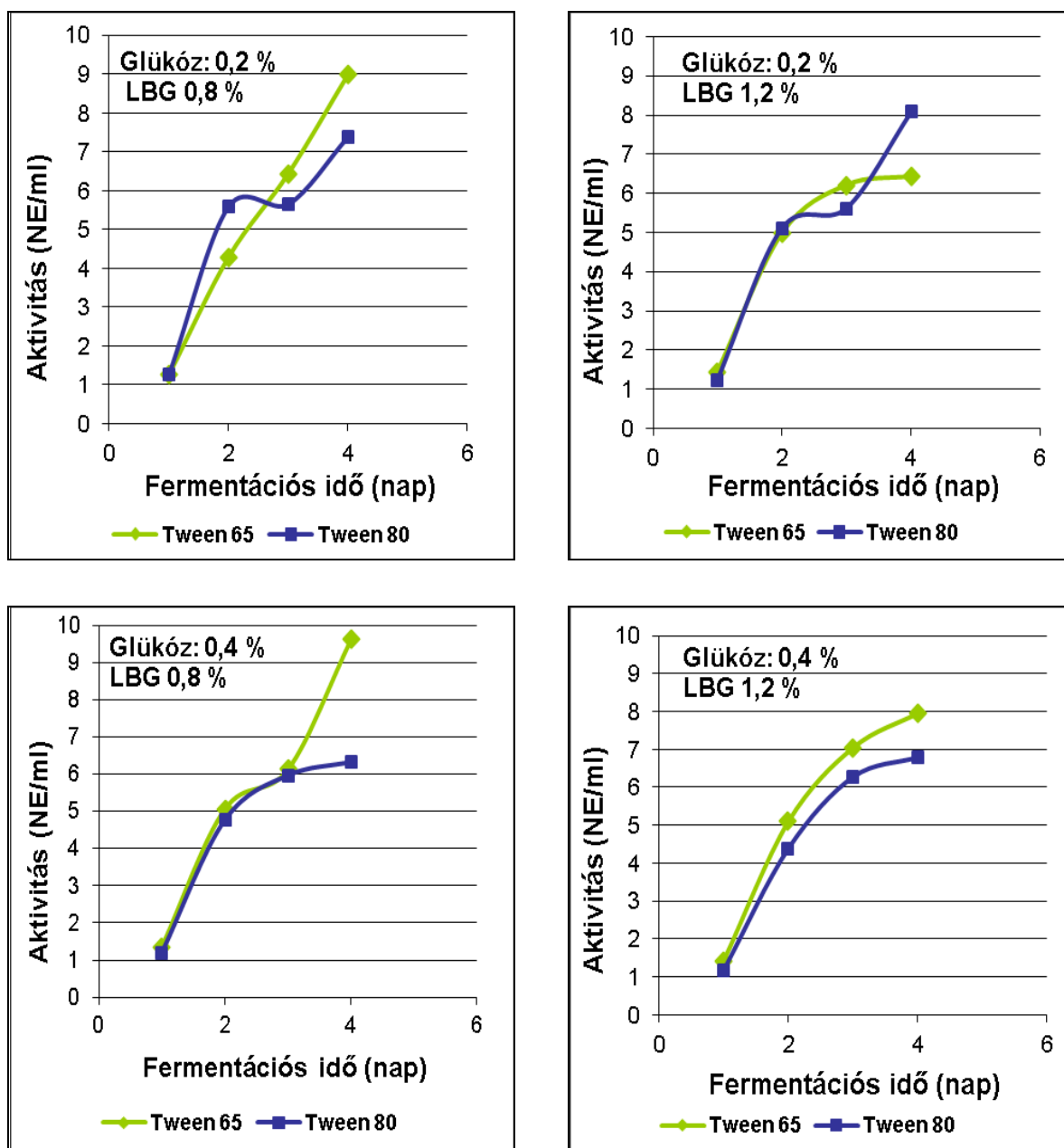
A **12. ábrán** a kísérleti terv megvalósításával kapott eredményeket az idő függvényében ábrázoltam.



12. ábra Az α -galaktozidáz enzimaktivitások alakulása az idő függvényében
különböző tápközeg összetételek mellett

A 12. ábrán szereplő két grafikon adatainak összevetéséből megállapítható, hogy sikerült az előző kísérletek eredményeit megerősíteni. A Tween 65 felületaktív anyag valóban pozitív hatással van az α -galaktozidáz enzim kiválasztására, mivel három kísérleti beállításnál is szignifikánsan meghaladta az aktivitás érték a kontroll vizsgálatok eredményeit.

A Tween 65 felületaktív anyag jelenlétében általában nagyobb aktivitások érhetők el azonos összetételű tápközegeken, kivételként szolgál a 0,2 (m/v) % glükóz és 1,2 (m/v) % LBG koncentrációjú tápközegek (13. ábra).



13. ábra A Tween 65 és Tween 80 hatása a különböző összetételű tápközegekben

A kétszintű háromfaktoros kísérletek értékelését a 4. napon kapott aktivitások alapján végeztem el. A 7. táblázatban adom közre a kísérleti beállításokat a 4. napon mért aktivitás értékekkel.

7. táblázat Kísérleti beállítások a természetes faktorok és az értékelésben használt aktivitások feltüntetésével

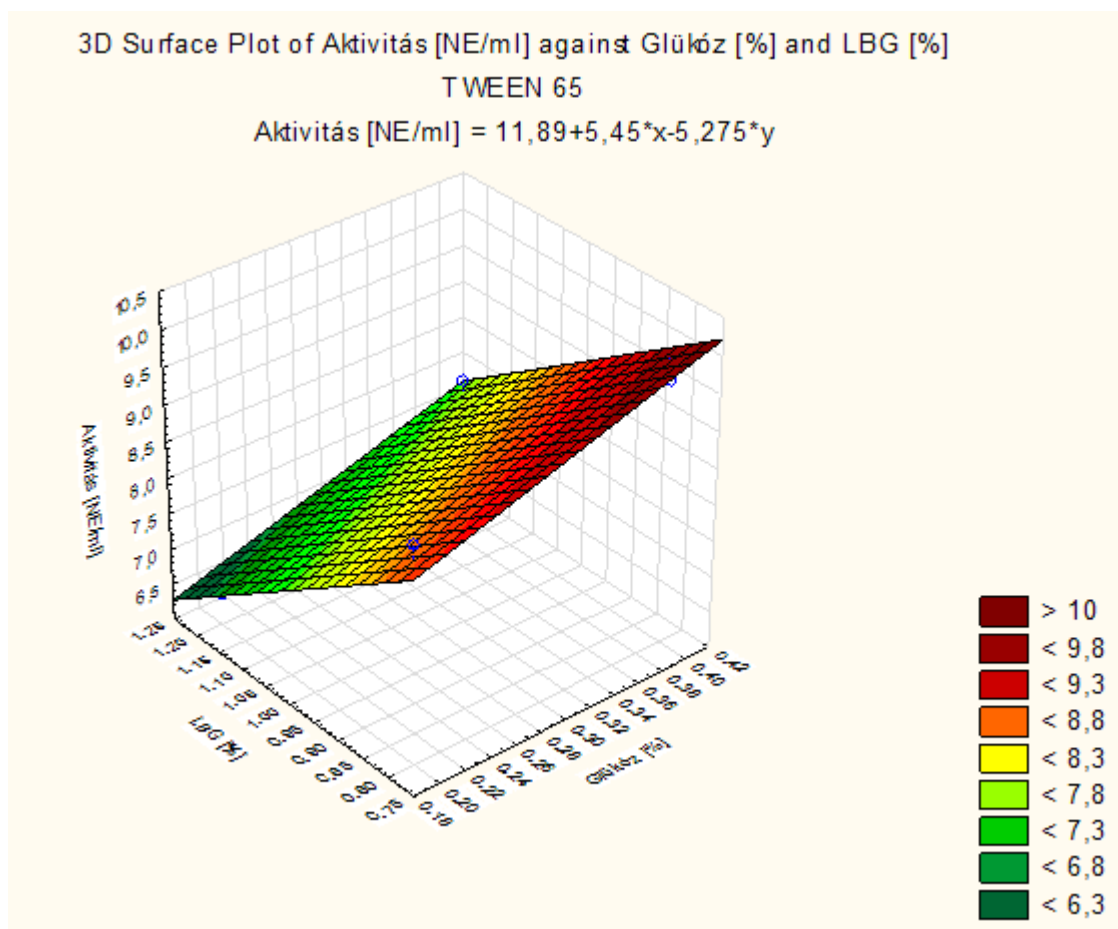
Kísérlet	Mennyiségi faktorok		Minőségi faktor	Aktivitás (z) (NE/ml)
	Koncentrációk [(m/v) %]			
	Glükóz (x)	LBG (y)	Tween	
1	0,2	0,8	65	8,98
2	0,2	1,2	65	6,43
3	0,4	0,8	65	9,63
4	0,4	1,2	65	7,96
5	0,2	0,8	80	7,38
6	0,2	1,2	80	8,08
7	0,4	0,8	80	6,32
8	0,4	1,2	80	6,80

A kísérleti tervet blokkokra bontva értékeltem. Az értékelésnél lineáris regressziót alkalmazva elsőfokú egyenletet illesztettem az adatokra. Külön értékeltem a Tween 65 és a Tween 80 felületaktív anyagokat tartalmazó tápközegeken elért eredményeket.

A kiértékeléshez a **STATISTICA 10** szoftver csomagot alkalmaztam. Az egyes felületaktív anyagok alkalmazása eltérő eredményeket prognosztizál. A Tween 65 alkalmazásával kapott függvény:

$$\alpha\text{-galaktozidáz aktivitás [NE/ml]}=11,89+5,45x-5,275y$$

azt jelzi, hogy a glükóz koncentráció növelése, illetve a LBG koncentráció csökkentése az enzimaktivitás növekedését eredményezheti. Az eredményeimet határfelület módszer alkalmazásával a 14. ábrán mutatom be.

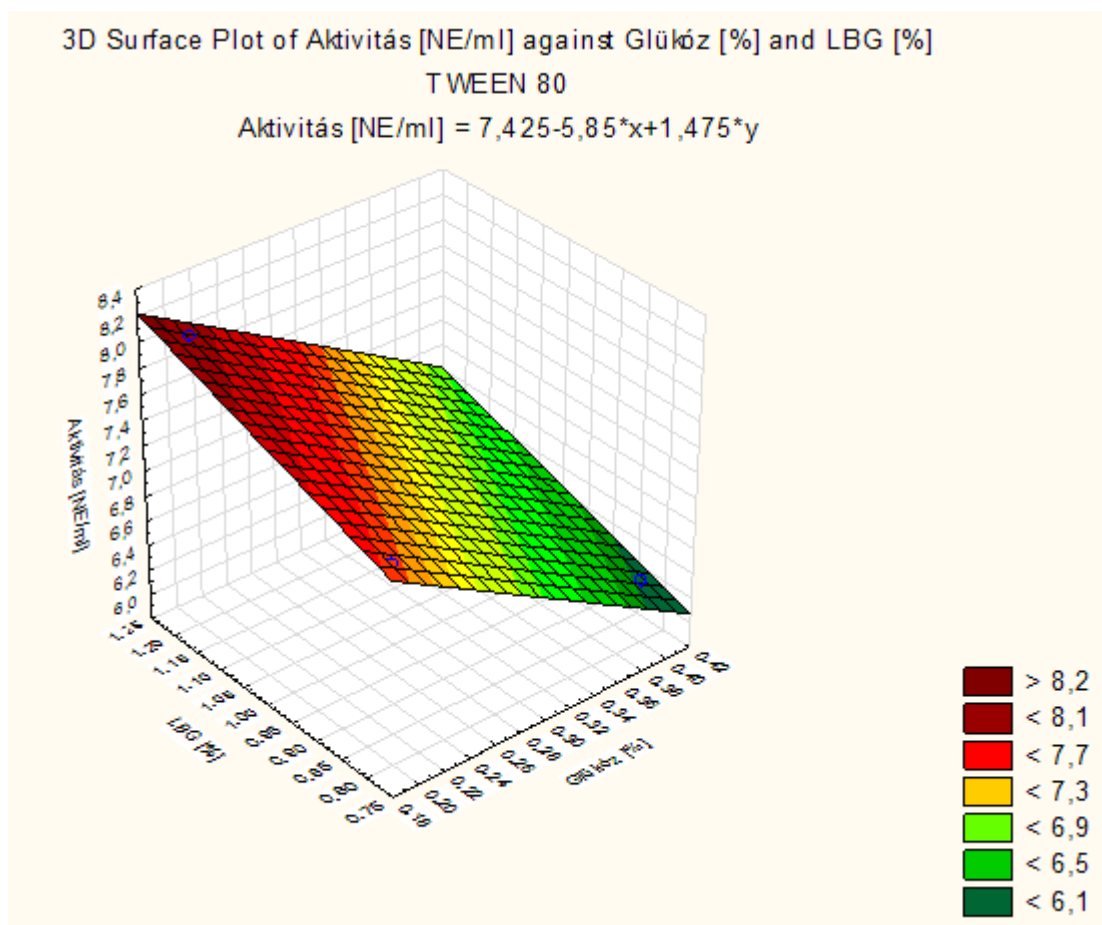


14. ábra Az α -galaktozidáz enzimaktivitás alakulása a glükóz és LBG koncentráció függvényében TWEEN 65 felületaktív anyag alkalmazása mellett
(STATISTICA 10 for Windows programcsomag)

Tween 80 felületaktív anyag jelenlétében ennek ellentmondó eredményt kaptam, ahol is a galaktomannán koncentráció növelése és a glükóz koncentráció csökkentése vezethet nagyobb α -galaktozidáz aktivitás eléréséhez (15. ábra).

Tween 80 alkalmazásával kapott függvény:

$$\alpha\text{-galaktozidáz aktivitás [NE/ml]} = 7,425 - 5,85x + 1,475y$$



15. ábra Az α -galaktozidáz enzimaktivitás alakulása a glükóz és LBG koncentráció függvényében TWEEN 80 felületaktív anyag alkalmazása mellett
(STATISTICA 10 for Windows programcsomag)

Ezen eredmények megerősítésére újabb kísérletsorozatok elvégzését tervezem. TWEEN 65 felületaktív anyag jelenlétében az új munkapontnak 0,4 (m/v) % glükóz és a 0,8 (m/v) % LBG koncentrációt választom, míg TWEEN 80 jelenlétében új munkapontként 0,2 (m/v) % glükóz és 1,2 (m/v) % LBG tartalmú tápközeg összetétel szolgálna. A kísérletek megvalósításához olyan modellt kívánok választani, amely a vizsgált tápkomponensek kölcsönhatására is felvilágosítást ad.

6 KÖVETKEZTETÉS

Az enzimes technológiák széleskörű elterjedése megkívánja az újabb felhasználási céloknak legjobban megfelelő tulajdonsággal rendelkező enzimek felkutatását és előállítás-technológiájuknak kidolgozását. E témakörhöz kapcsolódnak TDK dolgozatomban bemutatott kutatási eredmények is. Egy olyan fermentációs technológia továbbfejlesztését tűztem ki célul, amely galaktomannánon is aktív α -galaktozidáz enzimet eredményezhet. A *Thermomyces lanuginosus* fonalas gombáról korábban kimutatták, hogy eltérő kémiai szerkezetű növekedési szubsztrátum alkalmazásával két különböző tulajdonságú α -galaktozidáz enzimet szintetizál. Ezek az enzimek molekulatömegükben és szubsztrátum specifitásban eltérnek egymástól. A galaktomannánon szintetizált enzim nagyon ígéretesnek tűnik a különböző galaktomannának gélesedési tulajdonságainak modifikálására és szintézis folyamatokban történő alkalmazásra. Mindezen távlati célok eléréséhez fontosnak tartottam a fermentációs technológia hozamának fokozását. Ennek érdekében a technológiai idő csökkentésére törekedtem, valamint a tápközeg összetétel változtatásával igyekeztem célt érni.

Pozitív eredményként értékelhető, hogy 4 napos fermentációs idő alkalmazása mellett biztonsággal elérhető 10 NE/ml enzimaktivitás, amely legalább kétszerese Svastits-Dücső és munkatársai (2009) által közölt értéknek, melyet 6 napig tartó fermentációval értek el. Itt szeretném megemlíteni azt, hogy ezzel az eredménnyel még nem lehetek elégedett, mivel néhány fermentációmban a 4 napos enzimaktivitások 15 NE/ml körüli értéket mutattak, ami arra utal, hogy a gomba genetikai tulajdonságai biztosítják e titer körüli értékek elérését is. Távlati kutatásaim céljai között szerepel azon környezeti feltételek felderítése és rögzítése, amelyek az enzim fermentáció termelékenységének további fokozását eredményezhetik.

A felületaktív anyagok az enzim kiválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálatánál megállapítottam, hogy összefüggésben lehet azok kémiai szerkezetével. Tween 20, Tween 40, Tween 60 és Tween 80 molekulák a polioxietilén szorbitan láncához kapcsolódó zsírsav molekulák minőségében térnek el. Kémiai felépítésük szerint:

- a Tween 20 polioxietilén (20) szorbitan monolaurát
- a Tween 40 polioxyetilén (20) szorbitan monopalmítát
- a Tween 60 Polioxietilén (20) szorbitan monosztearát
- a Tween 80 Polioxietilén (20) szorbitan monooleát

Ezekkel szemben a Tween 65 és Tween 85 molekulák többszörösen szubsztituált polioxietilén szorbitan molekulák:

- a Tween 65 polioxietilén (20) szorbitan trisztearát
- a Tween 85 polioxietilén (20) szorbitan trioleát

Eredményeim arra utalnak, hogy a 18 szénatomszámú telített zsírsavval többszörösen szubsztituált polioxietilén szorbitan olyan szerkezeti változást idézett elő a vizsgált fonalagomba törzs sejtmembrán szerkezetében, amely elősegítette az extracelluláris α -galaktozidáz kiválasztását a tenyészlébe. Újabb feladatként fogalmazható meg az extracelluláris enzimaktivitások alakulásának vizsgálata a Tween 65 felületaktív anyag koncentrációjának függvényében.

A tápközeg összetétel optimalizálására irányuló kísérleteim eredményei újabb kérdéseket vetnek fel a téma továbbfejlesztésére vonatkozóan. Először is az itt kapott eredmények megerősítésre szorúlnak. Ha a felállított hipotézis igaznak bizonyul, hogy a *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs esetében a két különböző szerkezetű felületaktív anyag használata eltérő tápanyag összetétel esetén biztosítja az aktivitások növekedését, akkor szükség lenne az okozati összefüggések tisztázására. Itt elsődlegesen a fermentlében található α -galaktozidáz enzim fajták meghatározását, illetve ezek arányának kimutatását tervezném.

A fentiekben vázolt kutatások az enzimtermelés fokozása mellett új tudományos eredményekhez is vezethetnek.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Az α -galaktozidáz egy hidroláz enzim, mely konformáció megtartó tulajdonságú és megfelelő körülmények között transzglykózidáz aktivitással is rendelkezik. Ez azt jelenti, hogy bizonyos enzimek az oligo- és poliszacharidok hidrolízése mellett a galakto-oligoszacharidok szintézisét is katalizálják. Ez a két folyamat nagyon sok esetben párhuzamosan megy végbe. Hasznosíthatók a cukoriparban, az élelmiszer-feldolgozásban, a papíriparban, valamint az orvostudományban. Az enzimes technológiák széleskörű elterjedése megkívánja az újabb felhasználási céloknak legjobban megfelelő tulajdonsággal rendelkező enzimek felkutatását és előállítás-technológiájuknak kidolgozását.

A fonalas gombák családjába tartozó *Thermomyces lanuginosus* termofil gomba egy kiváló tulajdonságokkal rendelkező és az élővilágban széles körben előforduló mikroorganizmus. Biotechnológiai szempontból számos felhasználási lehetőséget rejt magában, mivel könnyen szaporítható, nem patogén és nem termel toxinokat. Magas hőmérséklet optimummal rendelkező extracelluláris enzimeket termel, mely lényegesen megkönnyíti a fermentléből való kinyerését/tisztítását. A gombának számos törzse alkalmas extracelluláris enzimek előállítására, beleértve a xilanázt (Singh *et al.*, 2003), az α -amilázt (Nguyen *et al.*, 2002), a glükóamilázt (Li *et al.*, 1998), a lipázt (Berg *et al.*, 1998) és az α -galaktozidázt (Rezessy-Szabo *et al.*, 2007).

Svastits-Dücső és munkatársai (2009) a *Thermomyces lanuginosus* fonalas gombáról korábban kimutatták, hogy eltérő kémiai szerkezetű növekedési szubsztrátum esetében két különböző tulajdonságú α -galaktozidáz enzimet szintetizál. Ezek az enzimek molekulatömegükben és szubsztrátum specifitásban eltérnek egymástól. A galaktomannánon szintetizált enzim nagyon ígéretesnek tűnik a különböző galaktomannánok gélesedési tulajdonságainak modifikálására és szintézis folyamatokban történő alkalmazásra. Mindezen távlati célok eléréséhez fontosnak tartottam a fermentációs technológia hozamának fokozását. Ennek érdekében a technológiai idő csökkentésére törekedtem, valamint a tápközeg összetétel változtatásával igyekeztem célt érni.

Kísérleti munkám során a *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b törzset és galaktomannánként szentjánoskenyér gumit (Locust bean gum – LBG) használtam növekedési szubsztrátumnak. A fermentációs folyamatot enzimaktivitás méréssel és pH ellenőrzéssel követtem. Fermentációs idő minimalizálására LBG 1 %-os tápközeget alkalmaztam és három párhuzamos fermentációt végeztem. A 4 napos fermentációs idő alkalmazása mellett elért 10 NE/ml enzimaktivitás legalább kétszerese Svastits-Dücső és munkatársai (2009) által közölt értéknek, melyet 6 napig tartó

fermentációval érték el. Az eddigi eredmények nagy valószínűséggel tovább is javíthatóak mivel néhány fermentációmban a 4 napos enzimaktivitások 15 NE/ml körüli értéket mutattak, ami arra utal, hogy a gomba genetikai tulajdonságai biztosítják e titer körüli értékek elérését is.

Az enzim fermentáció léptéknöveléséhez laboratóriumi fermentorban történő tenyésztést valósítottam meg. A laboratóriumi fermentoros kísérlet eredményeinek értékelésére kontroll vizsgálatokat is végeztem. Ugyanazzal az inokulummal indítottam különböző térfogatokban rázatott lombikos kísérleteket, valamint a beoltást követően a laboratóriumi fermentorból leszívott közeggel is indítottam rázatott lombikos tenyésztéseket. A legjobb enzimaktivitást rázatott lombikos tenyésztés során értem el, amely 16,85 NE/ml értéknek adódott. A nagyobb térfogatban megvalósított fermentációknál az oldott oxigén koncentráció nem bizonyult elegendőnek, mivel itt az előbbi értéknek, mint egy felét (8,54 NE/ml) mértem. A fermentorban történő enzim fermentációnál a maximális enzimaktivitást már a 3. napon detektáltam, amely számértékileg 4,3 NE/ml volt. Ennek magyarázataként szolgálhat, hogy fermentorban nem volt egyenletes sem a micélium tömeg eloszlása, sem a levegőztetés mértéke.

A tápközeg összetétel optimalizálásához egy ortogonális elrendezésű, kétszintű három faktoros kísérleti tervet állítottam fel és valósítottam meg, melyben mennyiségi és minőségi faktorok is szerepeltek. Mennyiségi faktorként a glükóz és a szentjánoskenyér gumi koncentrációk hatásait vizsgáltam, míg minőségi faktorként a Tween 65 és Tween 80 alkalmazásának hatását kívántam felderíteni.

A kísérleteimben alkalmazott különböző Tween készítmények polioxietilén szorbitán származékok, amelyek a zsírsav oldalláncok minőségében illetve, mennyiségében különböznek. A Tween 65 felületaktív anyag jelenlétében a glükóz koncentráció növelése, illetve a LBG koncentráció csökkentése az enzimaktivitás növekedését eredményezheti. Tween 80 felületaktív anyag jelenlétében ennek ellentmondó eredményt kaptam, ahol is a galaktomannán koncentráció növelése és a glükóz koncentráció csökkentése vezethet nagyobb α -galaktozidáz aktivitás eléréséhez. A tápközeg összetétel optimalizálására irányuló kísérleteim eredményei újabb kérdéseket vetnek fel a téma továbbfejlesztésére vonatkozóan. Először is az itt kapott eredmények megerősítésre szorulnak. Ha a felállított hipotézis igaznak bizonyul, hogy a *T. lanuginosus* CBS 395.62/b törzs esetében a két különböző szerkezetű felületaktív anyag használata eltérő tápanyag összetétel esetén biztosítja az aktivitások növekedését, akkor szükség lenne az okozati összefüggések tisztázására.

8 FELHASZNÁLT IRODALOM

- ADYA, S., ELBEIN, A.D. (1977): Glycoprotein Enzymes Secreted by *Aspergillus niger*: Purification and Properties of α -Galactosidase. *Journal of Bacteriology*. 129: 850-856
- ANNUNZIATO, M.E., MAHONEY, R.R. MUDGET R.E. (1986): Production of α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture. *J. Food Sci.* 51: 1370-1371
- BREEMEN, M.J., ROMBACH, S.M., DEKKER, N., POORTHUIS, B.J., LINTHORST, G.E., ZWINDERMAN, A.H., BREUNIG, F., WANNER, C., AERTS, J.M., HOLLAK, C.E. (2011): Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in patients with classic Fabry disease following enzyme replacement therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1812: 70-76.
- BULPIN, P.V., GIDLEY, M.J., JEFFCOAT, R., UNDERWOOD, D.J. (1990): Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant α -galactosidase. *Carbohydr. Polym.* 12: 155-168.
- CASTILLO, E.M., DE LUMEN, B.O., RAYES, P.S., DE LUMEN, H.Z. (1990): Raffinose synthase and galactinol synthase of legumes in developing seeds and leaves. *Journal of Food Chemistry*. 38:351-355.
- CIVAS, A., EBERHARD, R., LE DIZET, P., PETEK, F. (1984): Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Secreted α -D-galactosidase and β -D-mannanase. *Biochem. J.* 219: 857-863.
- COONEY, D.G., EMERSON, R. (1964): *Thermophilic fungi: An Account of their Biology, Activities and Classification*, Freeman, San Francisco, CA 80-88.
- BERG, O.G., CAJAL, Y., BUTTERFOSS, G.L., GREY, R.L., ALSINA, M.A., YU, B., JAIN, M.K. (1998): Interfacial activation of triglyceride lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*: kinetic parameters and a basis for control of the lid. *Biochemistry*. 37: 6615-6627.
- DEY, P.M. PRIDHAM, J.B. (1972): Biochemistry of α -galactosidase. *Adv. Enzymol.* 36: 91-130
- DEY, P.M., PATEL, S., BROWNLEADER, M.D. (1993): Induction of α -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonobola*) gum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 361-371
- DOBOLYI, I. (1997): *Thermomyces lanuginosus* gomba glükóamiláz enzim termelésének fokozása. Diplomamunka. Budapest
- FALKOSKI, D.L., GUIMARAES, V.M., CALLEGARI, C.M., REIS, A.P., DE BARROS, E.G., DE REZENDE, S.T. (2006): Processing of soybean products by semipurified plant and microbial α -galactosidases. *Agric. Food Chem.* 54: 10184-10190.

- GHERARDINI, F., BABCOCK, M., SALYERS, A.A. (1985):** Purification and Characterization of Two α -Galactosidases Associated with Catabolism of Guar Gum and Other α -Galactosidases by *Bacteroides ovatus*. Journal of Bacteriology. 161: 500-506.
- HAASUM, I., ERICKSEN, S.H., JENSEN, B., OLSEN, J. (1991):** Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 656-660
- KANEKO, R., KUSAKABE, I., IDA, E., MURAKAMI, K. (1991):** Substrate specificity of α -galactosidase from *Aspergillus niger* 5-16. Agric. Biol. Chem. 55: 109-115.
- KANEKO, R., KUSAKABE, I., SAKAI, Y., MURAKAMI, K. (1990):** Substrate specificity of α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Agric. Biol. Chem. 54: 237-238.
- KEMÉNY, S, DEÁK, A. (2002):** Mérések tervezése és eredmények értékelése. Műszaki Könyvkiadó. Budapest. 341.
- LENNY, L.L., HURST, R., GOLDSTEIN, J., GALBRAITH, R.A. (1994):** Transfusions to group 0 subjects of 2 units of red cells enzymatically converted from group B to group 0. Transfusion. 34: 209-214.
- LEFLER, D. D. (2003):** A tápközeg összetétel és az α -galaktozidáz enzim formák közötti összefüggés a *Thermomyces lanuginosus* termofil gombánál. Budapest.
- LI, D.H., YANG, Y.J., PENG, Y.L., SHEN, C.Y. (1998):** Purification and characterisation of extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Mycol. Res. 102: 568-572.
- LINDEN, J.C. (1982):** Immobilized α -D-galactosidase in the sugar beet industry. Enzyme Microb. Technol. 4: 130-136.
- MANSFIELD S.D, ESTEGHLALIAN A.R. (2003):** Applications of biotechnology in the forest products industry. ACS Symp. Ser. 855 Applications of enzymes to lignocellulosics. Szerkesztők: Mansfield S.D, Saddler J.N. American Chemical Society, Washington, DC, 2-29.
- NGUYEN, D.Q., REZESSY-SZABÓ, J.M., CLAEYSSSENS, M., STALS, I., HOSCHKE, Á. (2002):** Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. Enzyme Microbiol. Techn. 31: 345-352.
- PUCHART, V., BIELY, P. (2005):** Glycosylation of Internal Sugar Residues of Oligosaccharides Catalyzed by α -Galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. Biochim. Biophys. Acta., 1726: 206-216.
- PUCHART, V., VRSANSKA, M., BHAT, M.K., BIELY, P. (2000):** Purification and characterization of α -galactosidase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Biochim. Biophys. Acta 1524: 27-37.
- REZESSYNÉ-SZABO, J.M. (2003):** *Thermomyces lanuginosus* eredetű α -galaktozidáz enzim előállítás és jellemzése. 97.

- REZESSY-SZABO, J.M., NGUYEN, Q.D., HOSCHKE, A., BRAET, C., HAJOS, G., CLAEYSENS, M. (2007):** A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1770: 55-62.
- SCHOMBURG D., SALZMANN M. (1990) :** Enzyme Handbook 4. Bp. Springer Verlag
- SCIGELOVA, M, SINGH, S., CROUT, D.H.G. (1999):** Glycosidases – a great synthetic tool. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 6:483-494.
- SHIBUYA, H., KOBAYASHI, H., YOSHIDA, S., KANEKO, S., PARK, G.G., KUSAKABE I. (1999):** Purification and Characterization of Recombinant *Mortierella vinacea* α -Galactosidases I and II Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1096-1099.
- SINGH, S., MADLALA, A.M., PRIOR, B.A. (2003):** *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbio. Reviews.* 27: 3-16.
- SINITSYNA, O.A., FEDOROVA, E.A., VAKAR, I.M., KONDRATIEVA, E.G., ROZHKOVA, A.M., SOKOLOVA, L.M., BUBNOVA, T.M., OKUNEV, O.N., CHULKIN, A.M., VINETSKY, Y.P., SINITSYN, A.P. (2008):** Isolation and characterization of extracellular α -galactosidases from *Penicillium canescens*. *Biochemistry (Moscow)* 73: 97-106.
- SVASTITS-DÜCSŐ, L., NGUYEN, Q.D., LEFLER, D.D., REZESSY-SZABÓ, J.M. (2009):** Effects of galactomannan as carbon source on production of α -galactosidase by *Thermomyces lanuginosus*: Fermentation, purification and partial characterisation. *Enzyme and Microbial Techn.* 45: 367-371.
- VOGEL, H.J. (1964):** Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* 903: 435-446.
- WAGHMARE, S.R., GHOSH, J.S., GOVINDWAR, S.P. (2007):** α -Galactosidase activity from *Aspergillus species* on melibiose. *Microb. World* 9: 218-222.
- WONG, H.C., HU, C.A., YEH, H.L., SU, W., LU, H.C., LIN, C.F. (1986):** Production, Purification, and Characterization of α -Galactosidase from *Monascus pilosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(5): 1147-1152.
- ZAPATER, I.G., ULLAH, A.H.J., WODZINSKY, R.J. (1990):** Extracellular α -galactosidase (e.c. 3.2.1.22.) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 purification and characterization. *Prep. Biochem.* 20: 263-296.
- ZEILINGER, S., KRISTUFEK, D., ARISAN-ATAK, I., HODITS, R., KUBICEK, C.P. (1993):** Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Thichoderma reesei* RUT C-30. *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 1347-1353.

INTERNET CÍMEK:

<http://fabry.mnsza.hu/> (2012.08.26)

<http://www.lsbu.ac.uk/water/hygua.html> (2012.03.12)

<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyloc.html> (2012.03.12)

<http://www.vilaglex.hu/Lexikon/Html/Felulakt.htm> (2012.10.13)

www.rcsb.org/pdb

SZOFTVER CSOMAG:

STATISTICA 10 (2010), StatSoft

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Rezessyné dr. Szabó Judit** egyetemi docensnek aki lehetővé tette számomra, hogy kutatócsoportjában dolgozhassam, megismertetett a téma alapjaival és irányította a munkámat.

Köszönöm **Bujna Erika** egyetemi tanársegédnek, hogy segítségemre volt a törzsfenntartásban és egyéb felmerülő problémák megoldásában, valamint a dolgozat átolvasásában.

Továbbá szeretném megköszönni **Dr. Habil. Nguyen Duc Quang** egyetemi docensnek, hogy részt vehettem Kísérlettervezés című óráin.

Végül köszönöm a **Sör- és Szeszipari Tanszék** minden dolgozójának, hogy munkám során támogattak, mindvégig a segítségemre voltak és, hogy a felmerülő problémákkal mindig fordulhattam hozzájuk.