



Élelmiszertudományi Kar

Sör- és Szeszipari Tanszék

**Alfa-galaktozidos kötés bonthatóságának vizsgálata
Bifidobacterium eredetű fehérjével**

TDK dolgozat

PENCZ NOÉMI KINGA

Biomérnök 4. évfolyam

Témavezetők: Styevkó Gabriella
Rezessyné dr. Szabó Judit
Havas Petra

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS.....	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1	Bifidobaktériumok.....	4
2.1.1	Csoportosítás	4
2.1.2	Előfordulás	4
2.1.3	Morfológia.....	5
2.1.4	Szaporodási tulajdonságok	6
2.1.5	Szükséges tápanyagok és bifidogén faktorok	7
2.1.6	Metabolizmus	9
2.1.7	A Bifidobaktériumok alfa-galaktozidáz aktivitása	10
2.2	Alfa-galaktozidáz	11
2.2.1	Az alfa-galaktozidáz enzim indukálásához alkalmazható vegyületek jellemzése	12
2.2.2	Felhasználási lehetőségek	14
3	KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉS	17
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
4.1	Alkalmazott törzsek.....	18
4.2	Alkalmazott tápközegek és pufferek	19
4.3	Alkalmazott módszerek	20
4.3.1	Az élősejtszám meghatározása	20
4.3.2	pH mérés	20
4.3.3	Szénhidrátok minőségi összetételének vizsgálata VRK-val.....	20
4.3.4	HPLC-s szénhidrát analitika.....	21
4.3.5	Alfa-galaktozidáz enzim aktivitás meghatározása.....	22
4.3.6	A fehérjetartalom meghatározása	23
4.3.7	Lombikos tenyésztések	24
4.3.8	Az enzimfermentáció kivitelezése	24
4.3.9	Sejtfeltárás.....	25
4.3.10	A biokonverziós módszer.....	26
5	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK.....	27
5.1	<i>Bifidobacterium</i> törzsek szaporodási tulajdonságai.....	27
5.2	A <i>Bifidobacterium longum</i> A4.8 törzs eredetű α -galaktozidáz tartalmú fehérje előállítás.....	29
5.3	A biokonverziós kísérletek eredményei.....	30
5.3.1	Raffinóz és guar gumi bonthatósága <i>B. longum</i> A4.8 eredetű fehérjével	30
5.3.2	A <i>Bifidobacterium longum</i> A4.8 eredetű fehérje által katalizált galaktozil transzfer reakciók raffinóz és melibióz szubsztrátumon.....	32
6	KÖVETKEZTETÉSEK	37
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	38
8	IRODALOMJEGYZÉK.....	40

1 BEVEZETÉS

A bifidobaktériumok számos tudományos kutatás tárgyául szolgálnak, ezek kitérnek felfedezésükre, rendszertani besorolásukra, morfológiájukra, biokémia jellemzőikre, szénhidrát metabolizmusukra, antimikrobás hatásaikra. Egyre inkább a figyelem fókuszába kerül egészségügyi hatásaik bizonyítása és az egyes törzsek probiotikumként történő elismertetése.

Jelentős erőfeszítés tapasztalható a probiotikus bifidobaktériumok élelmiszerfeldolgozásba történő bevonásába is. Egyre gazdagodik azon élelmiszerek köre, amelyek fermentálásában probiotikus baktériumok is szerepet játszanak, illetve adalékként kerülnek a termékekbe. A fogyasztói érdeklődés egyre nagyobb az egészségmegőrzést és a betegségek kockázatát csökkentő funkcionális élelmiszerek iránt. Ennek köszönhetően a hagyományos probiotikus tejtermékek mellett megjelentek a piacon a probiotikus gyümölcs- és zöldségkészítmények, valamint a gabona alapú termékek is.

A felhasználható nyersanyagok sokfélesége ráirányítja a figyelmet arra, hogy a bifidobaktériumok életben maradásukhoz gazdag enzimmészettel kell, hogy rendelkezzenek, ugyanakkor ez egy kevésbé tanulmányozott terület. Néhány közlemény található a bifidobaktériumok béta-galaktozidáz enzimére vonatkozóan. A bifidobaktériumok más bélbaktériumokhoz hasonlóan intracelluláris alfa-galaktozidáz enzimük segítségével hasznosítják a nem emészthető, antinutritív alfa-galakto-oligoszacharidokat. Így célul tűztem ki, hogy TDK munkám során alfa-galaktozidázt tartalmazó enzimpreparátumot állítok elő és hatását vizsgálom alfa-galaktozid kötéseket tartalmazó szubsztrátumokon.

Az alfa-galaktozidáz enzimek konformáció megtartó hatásmechanizmusuknak köszönhetően a hidrolízis mellett bizonyos környezeti feltételek esetén transzfer reakciót is katalizálhatnak (LAERE *et al.*, 1999). Amennyiben bifidobaktérium eredetű alfa-galaktozidáz esetében is bizonyítható a transzfer aktivitás, távlati célként megfogalmazható oligoszacharidok szintézisére való alkalmazása is.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Bifidobaktériumok

A bifidobaktériumok az emberi és állati bélrendszernek azon lakói, amelyek születés után néhány nappal telepednek le a bélben, számukat az étkezési szokások, antibiotikum fogyasztás, valamint a stressz is befolyásolja. A *Bifidobacterium* nemzetséghez tartozó baktériumot az anyatejjel táplált csecsemők székletében elsőként Tissier fedezte fel és izolálta 1900-ban, mint nagy számban lévő mikroorganizmust. Tissier ezt az Y (bifid) formájú, anaerob, Gram-pozitív, gázt nem termelő baktériumot *Bacillus bifidus*-nak nevezte el. Tissier mutatta be először, hogy nagy mennyiségű bifidobaktérium szájon át történő beadásával csökkenthetőek a csecsemőkori hasmenéssel küzdő gyerekek tünetei (ARUNACHALAM, 1999).

2.1.1 Csoportosítás

A bifidobaktériumok nemzetségbe való besorolása folyamatosan változott, tagjai voltak többek között a *Bacillus*, *Tissieria*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bacterium* vagy *Corynebacterium* nemzetségeknek is. A század elején a mikroorganizmusok rendszertani besorolását és azonosítását morfológiájuk alapján végezték, de Orla és Jensen 1924-ben új szempontot választott, a metabolikus és enzimes tulajdonságokat használta fel arra, hogy elkülönítse a bifidobaktériumokat a *Lactobacillus* nemzetségtől. Ezt a különbséget 1967-ben De Vries és munkatársai megerősítették, akik a fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz enzimet határozták meg a bifidobaktériumok biokémiai markerjeként. Jelenlegi állapot szerint a *Bifidobacterium* nemzetség a Gram-pozitív baktériumok *Actinomyces* családjába tartozik. (DOLEYRES & LACROIX, 2005).

2.1.2 Előfordulás

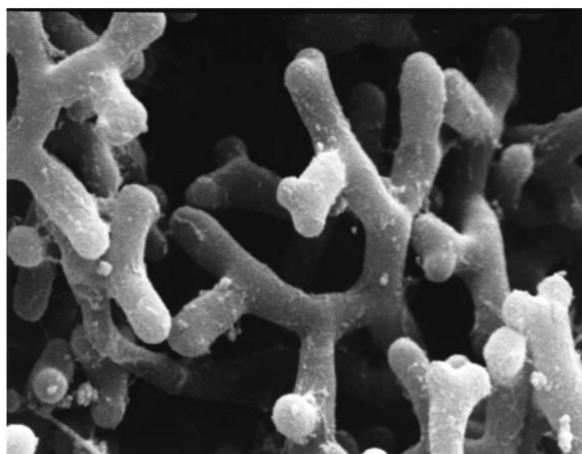
A ma ismert több mint 30 *Bifidobacterium* fajt számos helyről izolálták, ilyenek:

- humán források: csecsemő és felnőtt bélrendszer, női nemi szervrendszer, fogászati megbetegedések
- állati források: emlősök emésztőrendszere, méhe
- szennyvíz (ARUNACHALAM, 1999).

A *Bifidobacterium breve* és *Bifidobacterium infantis* fajokat jellemzően csecsemőkből izolálták, míg a *B. bifidum*, *B. longum*, *B. catenulatum* és *B. pseudocatenulatum* megtalálhatók az újszülött és a felnőtt bélcsatornában is. A *B. adolescentis* csak a felnőtt bélrendszerből izolálható. A női nemi szervrendszerben megtalálhatóak a *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* és a *B. longum* fajok. Fogászati betegségekből származnak a patogén *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. inopinatum* fajok, ezek fogszuvasodást, gennyesedést okozhatnak (BIVATI *et al.*, 2000).

2.1.3 Morfológia

A bifidobaktériumok nem spórázó baktériumok, különböző méretűek és alakúak lehetnek, általában 'V' vagy 'Y' formájúak (1. ábra). DNS-ükben magas Guanin + Citozin tartalommal (> 55 mol %) rendelkeznek (DOLEYRES & LACROIX, 2005).



1. ábra: *Bifidobacterium* morfológia (<http://micro.otago.ac.nz>)

Sejtfaluk a Gram-pozitív baktériumokra jellemző felépítésű, vastag peptidoglükán réteggel, amely poliszacharidokból, fehérjékből és teichnosavból áll. A murein alapvető tetrapeptideit alkotó aminosavak fajonként és törzsenként eltérőek. Általában a tetrapeptidek L-alanint, D-glutaminsavat, L-ornitint és D-alanint tartalmaznak, de néhány törzsnél lizin helyettesítheti az ornitint. A bifidobaktériumok sejtfalában található poliszacharidokat felépítő monomerek: a glükóz, a galaktóz és gyakran a ramnóz is, köztük minőségi és mennyiségi különbségek lehetnek fajtól, törzstől és növekedési paraméterektől függően. A sejt belfalhoz való kötődésének szempontjából fontosnak tartják a lipoteichonsav jelenlétét. Immunokémiai kutatások bebizonyították, hogy a lipoteichonsav gyakori antigén a *Bifidobacterium* nemzetségnél, továbbá, a fehérjék és a lipoteichonsav határozzák meg a sejt felületének

hidrofób jellegét is (BIVATI *et al.*, 2000). A mirisztinsav, palmitinsav, palmitoleinsav és olajsav a legfőbb zsírsav komponensek a sejtfalban, azonban változhatnak a táptalajtól, hőmérséklettől és a humán tej jelenlététől vagy azok hiányától függően. Foszfatidilglicerin, difoszfatidilglicerin és alanifoszfatidilglicerin is jellemzőek a bifidobaktériumokra (ARUNACHALAM, 1999).

2.1.4 Szaporodási tulajdonságok

A humán forrásból származó *Bifidobacterium* fajok szaporodásához az optimális hőmérséklet 36-38 °C, míg az állati eredetű bifidobaktériumok optimális szaporodási hőmérséklete 41-43 °C. Nem figyelhető meg növekedés 20 °C alatt vagy 46 °C fölött. A bifidobaktériumok savtermelő és savtoleráns mikroorganizmusok, optimális szaporodási pH-juk 6,5 és 7,0 között van, pH=4,5 alatt és pH=8,5 fölött nem növekednek. DONG és munkatársai (2003) leírták a *Bifidobacterium thermoacidophilum* más fajoktól eltérő tulajdonságait, miszerint néhány törzse 49,5 °C-on és viszonylag alacsony pH-n (4,0) is növekedik (BIVATI *et al.*, 2000; DOLEYRES & LACROIX, 2005).

Annak ellenére, hogy a bifidobaktériumok anaerobok, az oxigéntolerancia mértéke fajonként és törzsenként eltérő lehet. A szuperoxid-dizmutáz és a kataláz enzimek fontos szerepet játszanak a mikroorganizmusok védekezésében a szuperoxid és a hidrogén-peroxid mérgező hatása ellen. Ezek az enzimek nagyon kis aktivitással vannak jelen a *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis* fajokban, ezért a hidrogén-peroxid toxikussá válhat a bifidobaktériumokra nézve. Tehát esetükben a NADH-oxidáz és a NADH-peroxidáz az oxigén hasznosítás kulcsenzimeik, mivel megakadályozzák a hidrogén-peroxid szintézist. Így a *B. infantis*, *B. longum* és *B. breve* fajok mérsékelt koncentrációjú oxigén jelenlétében is szaporodnak, míg a *B. adolescentis* növekedését már igen kis mennyiségű oxigén is visszaszorítja.

A bifidobaktériumok bizonyos körülmények között felhasználhatják az oxigént anyagcseréjük során. Shimamura és munkatársai számoltak be arról a felfedezésről, hogy egyes *Bifidobacterium* törzsek exogén szénhidrát hiányában felhasználják az oxigént a sejten belüli szubsztrátumok metabolizmusára, annak érdekében, hogy életben maradjanak a fermentáció és a táplálékfelvétel után is (ARUNACHALAM, 1999, MAYER, 2004).

2.1.5 Szükséges tápanyagok és bifidogén faktorok

A *Lactobacillus* fajokkal ellentétben a bifidobaktériumok szaporíthatók kémiaiilag meghatározott összetételű tápközegekben is, amely kizárólag laktózt, három szabad aminosavat (cisztein, glicin, triptofán), néhány vitamint, nukleotidot és ásványi anyagokat tartalmaz. Bizonyos *Lactobacillus* törzsek meghatározott körülmények között nőhetnek egyszerű tápközegekben, ami kizárólag laktózt (fermentálható szénforrás), puffereket, ásványi anyagokat, ammónium sókat, ciszteint, vitaminokat- biotint és kalcium pantotenátot- tartalmaz. A *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* egy olyan mutáns törzs, amely pantotenát és N-acetil-glükózamin tartalmú szacharidokat igényel a növekedéséhez és a sejtfal szintézishez. Tissier által 1899-ben felfedezett *B. bifidum*, más *Bifidobacterium* fajokhoz hasonlóan szerves nitrogénforrást igényel, bár a pantotenátot és N-acetil-glükózamint tartalmazó szacharidok nem létfontosságúak számukra. Az anyatej és a tehéntej jótékony hatását a bifidobaktériumok növekedésére laboratóriumi körülmények között bizonyították. A szarvasmarha tej κ -kazein tartalmának növekedés elősegítő aktivitását az összekapcsolódott cisztein molekuláknak tulajdonították a *B. longum* faj szintetikus táptalajon végzett vizsgálatainál. A legfőbb tejsavó fehérjék, az α -laktalbumin és a β -laktoglobulin szintén kiváló elősegítői a bifidobaktériumok növekedésének. A fent említett szempontból hatékonyak találták a kereskedelmi forgalomban kapható élesztő kivonatot, amelyet 0,1 és 0,5 v/v %-os koncentrációban a táptalajhoz adva alkalmaznak. Más biológiai anyagokat is növekedés elősegítő összetevőként azonosítottak: treonin, cisztein, enzimmel kezelt alga, pepton, trypticase, dextrin, maltóz, répakivonat (koenzim A), kazein hidrolizátum és ultraszűrt hidrolizátum (GOMES *et al*, 1999).

A bifidogén faktorok olyan vegyületek, amelyek elfogyasztás után változatlan kémiai formában haladnak át a humán emésztőrendszer felső szakaszán, majd a vastagbélbe jutva az ott honos bifidobaktériumok energianyerés céljából metabolizálják, így a bifidobaktérium populáció részaránya növekedhet a bélmikrobiótán belül. A főbb bifidogén faktorokat a következőkben foglalom össze:

- **Frukto-oligoszacharidok:** A béltraktusban élő baktériumok növekedésének legfőbb szénforrásai. Ebben a tekintetben, a nem emészthető oligoszacharidok felhasználhatóak a bifidobaktériumok számának növelésére a bél mikrobiotájában. A lineáris és elágazó láncú frukto-oligoszacharidok közül az oligofruktóz rendelkezik a legjobb bifidogén tulajdonsággal. Az oligofruktóz egy 4-es polimerizációs fokú,

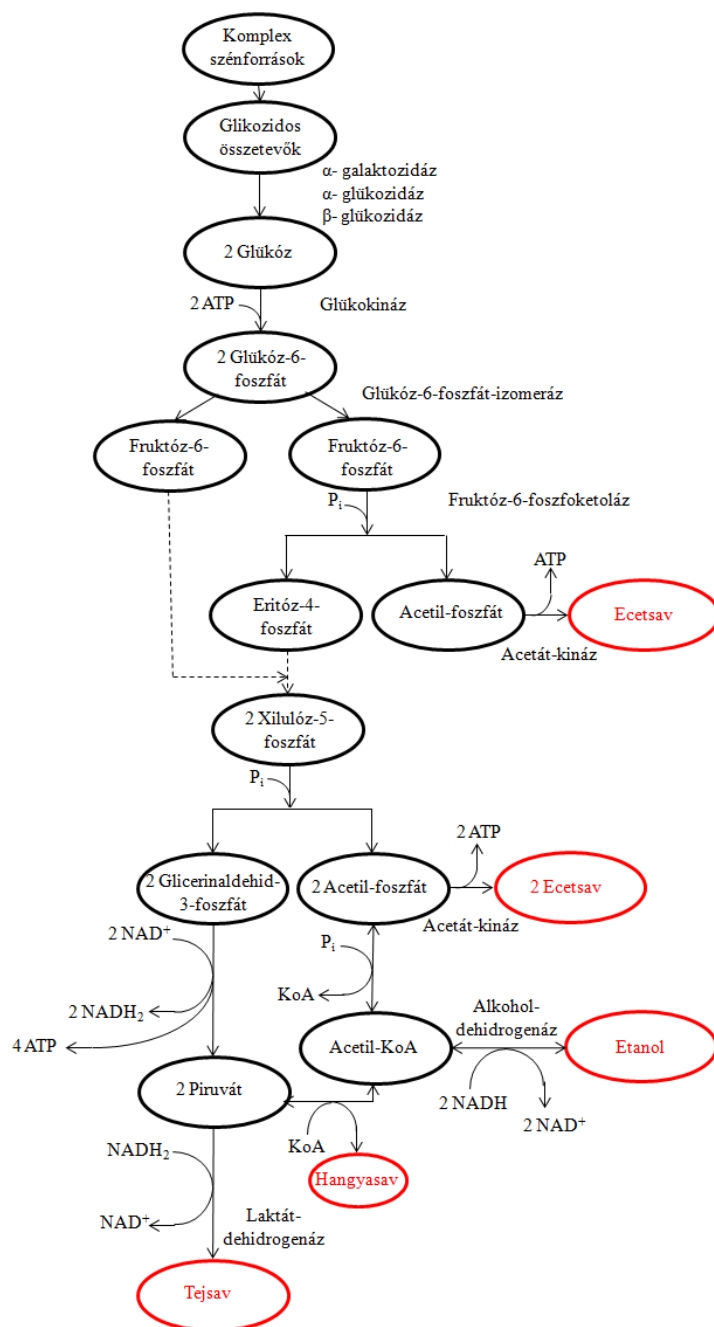
glükózból és fruktózból álló, lineáris láncú molekula. Laboratóriumi körülmények között az inulin is meggyőző eredményt hozott. A frukto-oligoszacharidok elősegítik a bifidobaktériumok növekedését és savtermelését, illetve kitűnő szén- és energiaforrások is (GOMES *et al*, 1999).

- Galakto-oligoszacharidok: Számos olyan humán eredetű *Bifidobacterium* faj erjeszti a galakto-oligoszacharidokat, amelyek más bélben élő baktériumokkal szemben jól hasznosítják a nem emészthető szénhidrátokat. A galakto-oligoszacharidok bifidogén hatása függ a bélcsatornában élő bifidobaktériumok populációjának méretétől.
- Szója oligoszacharidok: Legfőbb komponensei a raffinóz és a sztachióz, amelyeket számos humán eredetű *Bifidobacterium* faj erjeszt. Hatásuk a bélben élő bifidobaktériumok számának növelésében és a rothasztó baktériumok elnyomásában nyilvánul meg.
- Xilooligoszacharidok (pl.: xilobióz): A bifidobaktériumok a xilooligoszacharidok erjesztésére is képesek, amely során a bél mikrobiotájára háromszor-négyszer jobb hatást fejtenek ki, mint a természetes oligoszacharidok. Továbbá más oligoszacharidokhoz képest, jóval magasabb hőmérsékleten és savasabb kémhatású környezetben is stabilak, illetve kisebb dózisban is alkalmazhatóak.
- Izomaltooligoszacharidok: Más nem emészthető szénhidrátokkal ellentétben, az izomaltooligoszacharidok részben emészthetők és felszívódnak a vékonybélben. Az oligoszacharidok e típusát a *Bifidobacterium* fajok mellett a *Bacteroides* és a *Clostridium* fajok is hasznosítják.
- Laktoszukróz: A laktoszukróz ipari léptékben előállítható oligoszacharid. A bifidobaktériumok más bélbaktériumokhoz képest jól hasítják, így növeli a bélben lévő *Bifidobacterium* populációt.
- Kazein bifidus faktor (CBF): Savas és enzimes (papain és pepszin) hidrolízis segítségével állítható elő tehéntejből. Tartalmazza a növekedéshez szükséges peptideket és szénhidrátokat is.
- Laktulóz: A laktulóz galaktóz és fruktóz egységekből álló diszacharid. Az alsó bélszakaszban elősegíti a bifidobaktériumok szaporodását, a frukto-oligoszacharidok legtöbb előnyös tulajdonságával rendelkezik. A fertőzések korlátozásában és az immunválasz aktiválásában is szerepe van (GOMES *et al.*, 1999, PLAYNE *et al.*, 2004).

2.1.6 Metabolizmus

Szénhidrát metabolizmus

A bifidobaktériumok anyagcseréjük során hasznosítják a mono-, a di- és az oligoszacharidokat is. Hexóz fermentációjuk kulcsenzime a fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz (EC 4.1.2.2), amely a fruktóz-foszfátot eritroz-4-foszfáttá és acetyl foszfáttá hasítja. A fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz enzim a *Bifidobacteriaceae* család rendszertani markere.



2. ábra: A „bifid” anyagcsere útvonal

A bifidobaktériumok az úgynevezett „bifid” anyagcsere útvonal (2. ábra) segítségével ATP formájában sokkal több energiához jutnak, mint más baktériumok a fermentatív útvonalak segítségével. 1 mol glükóz fermentálásával 2,5 ATP molekulát nyernek, ezen kívül 1,5 mol ecetsavat és 1 mol tejsavat is képeznek. Tehát szénhidrát anyagcseréjük során 2:3 arányban tejsavat és ecetsavat képeznek, azonban ez az arány oxigén jelenlétében csökken. Összehasonlításként, a homofermentatív tejsavbaktériumok 1 mol glükózból 2 mol ATP molekulát és 2 mol tejsavat hoznak létre, míg a heterofermentatív tejsavbaktériumok 1 mol glükóz erjesztésével 1 mol ATP-t, 1 mol tejsavat és 1 mol etanolt állítanak elő. Minden bifidobaktérium erjeszti a laktózt, így tejalapú tápközegeken is szaporodnak. A *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis* és *B. longum* fajok sokféle szénhidrátot hasznosítanak (pl.: ribóz, galaktóz, fruktóz, szacharóz, maltóz, melibióz, raffinóz), míg a *B. bifidum* csak a fruktózt, galaktózt és laktózt metabolizálja. Rendszerint a bifidobaktériumok nem tudják felhasználni a következő szénhidrátokat: L-arabióz, ramnóz, N-acetilglükózamin, szorbit, melecitóz, trehalóz, glicerín, xilit. A *Bifidobacterium* fajok nagy része ABC traszporter segítségével végzi a szénhidrátok felvételét, de egy kisebb csoport a PEP-PTS (foszfoenolpiruvát-foszfotranszferáz) enzimszisztémát használja (ARUNACHALAM, 1999; DOLEYRES & LACROIX, 2005; POKUSAEVA *et al.*, 2011).

Nitrogén hasznosítás

A *Bifidobacterium* fajok szaporításához laboratóriumi körülmények között nitrogénforrásként elegendő az ammónium-szulfát biztosítása, kivéve a *B. cuniculi* és *B. suis* fajokat, amelyek növekedésükhöz szerves nitrogénforrást is igényelnek. Bizonyos esetekben a *B. bifidum* faj alanint, valint, aszpartátot és treonint is termel. Tekintettel arra, hogy a tej meghatározott mennyiségű szabad aminosavat és peptidet tartalmaz, ki kell egészíteni tápanyag dús húslevesrel, kazein hidrolizátummal vagy élesztő kivonattal (ARUNACHALAM, 1999).

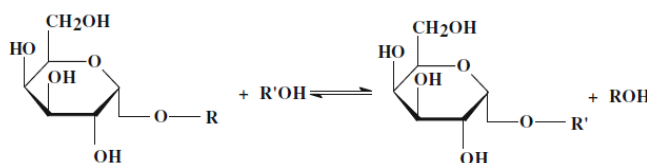
2.1.7 A Bifidobaktériumok alfa-galaktozidáz aktivitása

A *Bifidobacterium* fajok, más bélbaktériumokkal szemben, ugyanolyan jól hasznosítják szénforrásként a raffinózt, mint a glükózt. Ez az eredmény sugallta, hogy a bifidobaktériumok jelentős alfa-galaktozidáz (α -Gal) aktivitással rendelkezhetnek. XIAO és munkatársai (2000) *Bifidobacterium* törzseket teszteltek α -galaktozidáz aktivitásra, eredményeik alapján, raffinóz jelenlétében jelentős alfa-galaktozidáz aktivitást detektáltak.

Ugyanilyen körülmények között más bélbaktériumok nem mutattak α -Gal aktivitást. További kutatások bizonyították, hogy a raffinóz fontos növekedés elősegítő oligoszacharid a bifidobaktériumok számára. Raffinóz hasznosításra a *B. breve* 203 törzset tesztelték, mivel ez a törzs mutatta a legnagyobb alfa-galaktozidáz aktivitást. Annak ellenére, hogy jól növekedett glükózt, galaktózt, fruktózt, maltózt vagy laktózt tartalmazó táptalajon is, a sejtfeltárás után végzett aktivitás mérés eredményei kis α -galaktozidáz aktivitást mutattak. A *B. breve* 203 enzimaktivitása raffinóz szénforrás mellett majdnem 30-szorosára nőtt a glükózhoz viszonyítva, míg más glikozidázok aktivitása nem változott. A melibióz hasznosítása szénforrásként szintén jelentős α -Gal aktivitást eredményezett. A legnagyobb alfa-galaktozidáz aktivitást 10 mM raffinóz vagy melibióz koncentrációnál érték el, bár ennél a koncentrációnál a raffinóz kétszer-akkora enzimaktivitás értékeket eredményezett, mint a melibióz.

2.2 Alfa-galaktozidáz

Az alfa-galaktozidáz (alfa-D-galaktozid galaktohidroláz, α -Gal, melibiáz, EC 3.2.1.22) a hidrolázok osztályába tartozó enzim, ezen belül is a glikozidázok (GH= glikozid hidroláz) csoportjába sorolható. A glikozidázok olyan enzimek, amelyek az oligo- és poliszacharidokban lévő glikozidos kötéseket hasítják el víz jelenlétében (3. ábra). A legtöbb ismert alfa-galaktozidáz aminosav szekvencia hasonlóság alapján a GH-27-es és GH-36-os családba tartozik. Az alfa-galaktozidáz exoglikozidáz, a láncvégi α -1,6-os D-galaktóz egységeket hasítja le. A D-galaktóz molekulák megtalálhatóak számtalan szubsztrátumban, ilyenek a melibióz, raffinóz, galaktomannánok (szentjánoskenyér gumi, guar gumi), glikoproteinek, továbbá néhány szintetikus szubsztrátumban is (p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid). Az α -Gal enzim bizonyos körülmények között transzglikozidáz aktivitással is rendelkezik, tehát oligoszacharidok szintézisére is alkalmazható. Számos növény, állat és mikroorganizmus szintetizálja, lokalizációját tekintve lehet extracelluláris vagy intracelluláris (CAO *et al.*, 2010, SHIVAM *et al.*). Bau és munkatársai izolálták először az alfa-galaktozidázt alsó-erjesztésű élesztőből.



3. ábra: Alfa-galaktozidáz által katalizált reakció általános sémája (SHANKAR *et al.*, 2011)

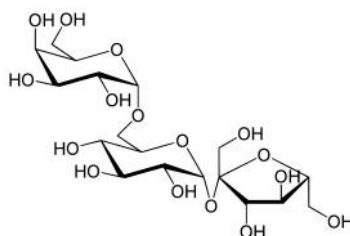
SHEN és munkatársai (2009) jelentették, hogy a kávébabból származó alfa-galaktozidáz volt az első, amit részben megtisztítottak és biokémiaailag azonosítottak. Ez az enzim két izomerrel rendelkezik, amelyeknek különböző a molekulatömege (28 és 36,5 kDa), a pH optimuma (5,3 és 6,3) és az izoelektromos pontja (5,5 és 5,7).

2.2.1 Az alfa-galaktozidáz enzim indukálásához alkalmazható vegyületek jellemzése

A hatékony alfa-galaktozidáz termeléshez általában induktív körülményeket alkalmaznak. A legjobb induktor vegyületek az adott enzim szubsztrátumai között találhatók. A következőkben ezen vegyületeket kívánom bemutatni, kémiai szerkezetük mellett kitérek természetes előfordulási helyükre, valamint ipari előállítási és felhasználási lehetőségeinek ismertetésére.

2.2.1.1 Raffinóz

A raffinóz (α – D – galaktopiranozil - (1,6) – α – D – glükopiranozil - (1,2) – β – D - fruktofuranozid) (4. ábra) a természetben széles körben előforduló oligoszacharid, amely megtalálható az olyan növényekben, mint a cukorrépa, a cukornád, a káposzta, a burgonya, a szőlő, a búza, az árpa, a kukorica, valamint a hüvelyes növények magjaiban (NAKATA *et al.*, 2013).

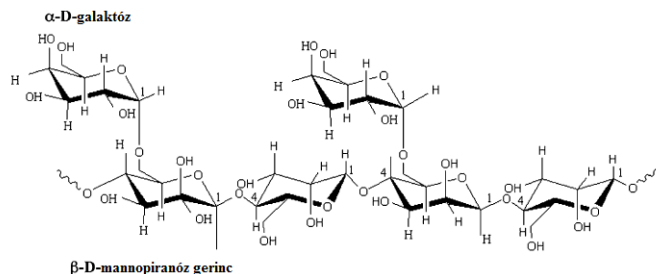


4. ábra: A raffinóz szerkezete (www.vitnik.ru/eda)

2.2.1.2 Guar gumi

A guar gumi (GG) egy olyan galaktomannán, amely a szárazságtűrő *Cyamopsis tetragonolobus* (guarbab) növényből származik, a guarbab rendszertanilag a *Leguminosae* családba tartozik. A hüvelyében található magvak gömbölyűek, barnás színűek és méretre kisebbek, mint egy borsó. A guar gumi főleg nagy molekulatömegű galaktomannánokból áll, amelyek tulajdonképpen az 1,4- β -D-mannopiranozil és az 1,6- α -D-galaktopiranozil (oldallánc) egységek lineáris láncolatai (5. ábra), a láncban a mannóz-galaktóz arány 1,6-

1,8:1. A guar gumi a természetben előforduló, vízben oldódó polimerek közül az egyik legnagyobb molekulatömeggel rendelkező poliszacharid. A kereskedelembe kapható guar gumi viszkozitása nagyban függ a galaktomannán molekulatömegétől (CUNHA *et al.*, 2007).



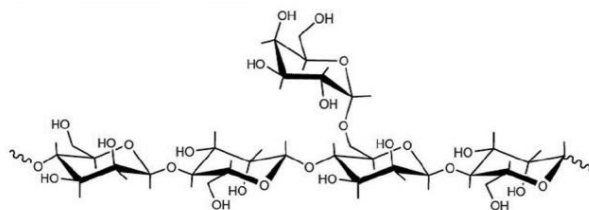
5. ábra: A guar gumi kémiai szerkezete (MUDGIL *et al.*, 2011)

A Guar gum egy széles körben alkalmazott ipari poliszacharid. A gyógyszeriparban használják többek között a hatóanyag felszívódásának kontrolálására a gyomor-bél traktusban, a vastagbélrák kezelésére használt gyógyszereknél, illetve a felnőttkori kolerás betegeknek szánt orális folyadékpótló készítményeknél is. Az élelmiszeriparban számos termékben hasznosítják adalékanyagként az ételek stabilizálására, konzisztenciájuk javítására, illetve rostforrásként is. Alkalmazható még nehéziparban (kőolaj, földgáz), textiliparban és papíriparban is (MUDGIL *et al.*, 2011).

2.2.1.3 A szentjánoskenyér gumi

A szentjánoskenyér gumi (Locust bean gum, LBG) mannóz és galaktóz egységekből álló poliszacharid, amely a galaktomannánok családjába tartozik. Az LBG-t a szentjánoskenyérfa (*Ceratonia siliqua*) magjaiból vonják ki, amely megtalálható a Mediterrán régiókon, ezen kívül Észak-Afrikában, Dél-Amerikában és Ázsiában is. A magok 80 %-a galaktomannánokból áll, a maradék 20 %-ot fehérjék és szennyeződések alkotják. Az LBG fehérje tartalmának 32 %-a albuminból és globulinból tevődik össze, 68 %-ot a glutelin tesz ki. A szennyeződések hamuból és savban oldhatatlan anyagokból állnak. A magok feldolgozása után, a nyers galaktomannánokat számos eljárásnak kell alávetni, hogy elválasszák a fehérje tartalomtól és a szennyeződésektől. Ezek a műveletek lehetnek enzimes vagy lúgos hidrolízis, csapadékképzés etanollal vagy izopropánollal, illetve tisztítás metanollal, réz vagy bárium komplexszel. A szennyeződések többnyire oldhatatlanok maradnak még 70 °C feletti hőmérsékleten is. A csapadékképzés izopropánollal igen hatékony módszernek bizonyult a fehérjék eltávolítása szempontjából, ugyanakkor a tisztítási

lépések nagyobb mannóz/galaktóz arányt eredményeztek, ugyanakkor csökkentették a fehérjék és szennyeződések mértékét.



6. ábra: A szentjánoskenyér gumi kémiai felépítése (DIONÍSIO *et al.*, 2012)

A szentjánoskenyér gumi kémiai szerkezete egy 1,4- β -D-mannóz gerincből és α -D-galaktóz oldalláncokból áll (6. ábra). A galaktomannánok között különbséget tehetünk mannóz/galaktóz arányuk és molekula tömegük alapján, az utóbbit az aratási és a feldolgozási műveletek is befolyásolják. A mannóz/galaktóz arány a mannóz gerincen elhelyezkedő galaktóz oldalláncok eloszlásától függ, az LBG-nél megközelítőleg 4:1. Általánosságban véve a szentjánoskenyér gumi molekulatömege 50 és 1000 kDa közé tehető.

Az LBG legnagyobb alkalmazási területei az élelmiszeripar és a kozmetikai ipar, ahol sűrítő és stabilizáló összetevőként használják fel. Az élelmiszeriparban E410-es számú adalékanyagként szerepel az Európai Unióban. A gyógyszeriparban számos készítmény előállításához használják fel kötő anyagként, bevonatként, sűrítő anyagként, viszkozitás növelőként, stabilizáló szerként, emulgálószerként, zselésítőként stb. (DIONÍSIO *et al.*, 2012).

2.2.2 Felhasználási lehetőségek

Az alfa-galaktozidáz enzimet számos helyen hasznosítják az élelmiszeriparban és egyéb iparágakban, valamint gyógyászati hasznosítása is ismert. E felhasználási területek egyre bővíthetnek, hiszen a mikroorganizmusok eltérő genetikai felépítésének és tulajdonságainak köszönhetően szinte kimeríthetetlen az adott célnak megfelelő enzim preparátumok előállítása.

Élelmiszeripari hasznosítás

A cukorgyártásban az alfa-galaktozidáz segítségével hidrolizálják a melaszban lévő raffinózt, ezáltal növelve a szacharóz hozamot. A szentjánoskenyér gumi kiváló zselésítő tulajdonsággal rendelkezik, ugyanakkor nagyon drága. A zselésítő képesség összefüggésbe hozható a mannóz/galaktóz aránnyal. Megoldási lehetőségként kínálkozik, hogy az alfa-

galaktozidáz enzim alkalmazásával az LBG galaktóz oldalláncainak részleges eltávolításával, a megfelelő mannóz/galaktóz arány beállítása a poliszacharid zselésítő tulajdonságának javítása céljából.

Táplálkozástudomány és takarmányozás

Mind a humán, mind a monogasztrikus állatok esetében is kimutatták, hogy emésztőrendszerükből hiányzik, vagy csökkent mértékű az alfa-galaktozidáz aktivitás. Így az alfa-galaktozidáz felhasználható az antinutritív hatású galakto-oligoszacharidok lebontása révén a hüvelyes alapú ételek táplálkozási értékének növelésére. Az enzimes kezelés kiaknázható lehet a szója takarmányok galakto-oligoszacharid tartalmának csökkentésére is. Ezek az emésztetlen alfa-galakto-oligoszacharidok a vastagbélbe kerülnek, ahol a mikrobiota metabolizálja ezeket a vegyületeket, amelynek eredményeként felpuffadás és gyomor-bélrendszeri zavarok jelentkeznek. Ezek a zavarok csökkentik az etetés hatékonyságát, illetve a szója tartalmú ételek általános elfogadottságát is (SHANKAR *et al.*, 2011).

Noha a szója oligoszacharidok potenciális prebiotikumként is felhasználhatók a megrendült egészségű, vagy idős embereknél, ahol a bélmikrobióta egyensúlya kedvezőtlen összetételű, a szója oligoszacharidokból a mikrobiális fermentáció eredményeként széndioxid, hidrogén és metán keletkezik, amely a vastagbél felpuffadását okozza. Ez a jelenség rossz közérzetet, fejfájást, szédülést, enyhe zavartságot, csökkent koncentrálóképeséget, hasmenést, gyomorfájdalmakat, székrekedést és fájdalmas bélösszehúzódásokat okozhat. E probléma is kiküszöbölhetővé válik alfa-galaktozidáz enzimmel megvalósított hidrolízis révén (BRYANT *et al.*, 2004).

Gyógyászati alkalmazás

Az α -galaktozidáznak gyógyászati jelentősége is van. Képes a 3-O- α -D-galaktopiranozidot tartalmazó B típusú vörösvérsejteket átalakítani a vérpótlásnál gyakrabban szükséges 0-ás vörösvérsejtekké.

A Fabry betegségként ismert kór az alfa-galaktozidáz enzim hiányának tulajdonítható, az X-kromoszómán elhelyezkedő alfa-galaktozidáz gén mutációja váltja ki (SHIVAM *et al.*, 2010). A Fabry betegség (FD, OMIM 301500) egy ritka, örökletes, több szervet érintő genetikai rendellenesség. A lizoszómális exoglikohidroláz, az alfa-galaktozidáz hiánya vagy hibás működése a felelős a globotriaoszil ceramidok és az ezekhez kapcsolódó

glikoszfingolipidek felhalmozódásáért a lizoszómán kívüli sejtekben, mint az érfalakban, vesében, szövetekben, szívben és agyban. Az első tünetek gyerekkorban mutatkoznak, évek múltán szervi elégtelenségek jelentkezhetnek. A vese betegség, szív- és érrendszeri, illetve agyi betegségek életveszélyesek lehetnek. A gyógymód folyamatos enzimpótló infúzió formájában érhető el, 2001-től a rekombináns úton előállított alfa-galaktozidáz A enzimet intravénás infúzióként adják be a betegeknek. Európában a Fabry betegségben szenvedők két fajta enzimmészítményhez juthatnak:

- agalzidáz alfa (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies, Inc., Cambridge, MA, USA): Az emberi bőr fibroblasztjaiban tenyésztették, adagolása 0,2 mg/kg testtömeg, ideje 40 perc, kéthetente esedékes. 2001 augusztusától 45 ország ismerte el a Fabry betegség gyógymódjának.
- agalzidáz béta (Fabrazyme®; Genzyme Corp, Cambridge, MA, USA): Kínai hörcsög petefészkében cDNS-ről expresszált emberi alfa-galaktozidáz, adagolása 1 mg/kg testtömeg, kéthetente. Az agalzidáz-béta enziminfúzió 55 országban jóváhagyott gyógymód, beleértve az Amerikai Egyesült Államokat is. 2008 februárjától rendelkezik EMEA (European Medicine Agency) engedéllyel (GERMAIN, 2010; GERMAIN *et al*, 2012).

3 KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉS

A bifidobaktériumok természetes élőhelye az emberi és állati szervezet emésztőrendszere, legfőképpen a vastagbél. E baktériumok tápláléka azon táplálék-összetevők, amelyek a tápcsatorna felsőszakaszán nem bomlanak le és nem szívódnak fel. Számos közlemény foglalkozik humán szervezet ezen szimbiótáival. Természetesen a közlemények túlnyomó többsége egészségügyi hatásaira, valamint az élelmiszergyártásba történő bevonásukra összpontosít. Az utóbbi időben megjelentek olyan művek is, amelyek szénhidrát metabolizmusukkal foglalkoznak. Enzimrendszereik vizsgálata újszerűnek tekinthető és ezek is elsődlegesen a laktóz hasznosítással összefüggésbe hozható béta-galaktozidáz enzimre fókuszál. A nem-emészthető, antinutritív élelmiszer-összetevők között tartják számon az alfa-galakto-oligoszacharidokat, amelyek főleg a hüvelyes magvakban fordulnak elő. Ennek köszönhetően szója oligoszacharidoknak, vagy raffinóz család oligoszacharidoknak is nevezik. A szója oligoszacharidok táplálkozási megítélése kettős, egyrészt flatulencia faktorként írják le, másrészt potenciális prebiotikumként tartják számon. Annyi bizonyos, hogy hüvelyesekben található raffinóz, sztachióz és verbaszkóz az emésztőrendszer felső szakaszán az endogén alfa-galaktozidáz enzim hiánya miatt nem bomlik le és nem szívódik fel. Megérkezvén a vastagbélbe az ott honos bélbaktériumok fermentálják, köztük a nem gázképző bifidobaktériumok.

A tudományos tényekre támaszkodva fő célkitűzésem bifidobaktérium eredetű alfa-galaktozidáz tartalmú enzimpreparátum előállítása és alkalmazása biokonverziók megvalósítására. Ennek érdekében következő részfeladatokat fogalmaztam meg:

- Különböző *Bifidobacterium* törzsek szaporodási tulajdonságainak feltérképezése alfa-galaktozidos kötéseket tartalmazó szubsztrátumokon. A kapott eredmények értékelése révén kívánom kiválasztani az enzimpreparátum előállítása szempontjából a legígéretesebb törzset. Továbbá döntést fogok hozni az alkalmazandó szénhidrátra/induktorra vonatkozóan.
- Az enzimpreparátum előállítása céljából a következő műveleteket terveztem:
 - a kiválasztott baktérium törzs tenyésztése léptéknöveléssel, laboratóriumi fermentorban
 - az intracelluláris alfa-galaktozidáz enzim kiszabadítása sejtfeltárással
 - a sejtextraktum liofilezése
- Biokonverziós kísérletek tervezése és megvalósítása melibióz, raffinóz és guar gumi szubsztrátumokon.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Alkalmazott törzsek

Kísérleteimhez különböző eredetű *Bifidobacterium* törzseket használtam fel (1. táblázat):

1. táblázat: A felhasznált törzsek

Törzsek	Eredet	Forrás
<i>B. longum</i> Bb-46	Starter kultúra (lío-filizátum)	Chr. Hansen
<i>B. longum</i> B6.1	Csecsemő bélsár	MAYER <i>et al.</i> , 2003
<i>B. longum</i> A4.8	Felnőtt bélsár	MAYER <i>et al.</i> , 2003
<i>B. longum</i> DSM 16603	Törzsgyűjtemény	Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>B. lactis</i> Bb-12	Starter kultúra (lío-filizátum)	Chr. Hansen
<i>B. bifidum</i> B3.2	Csecsemő bélsár	MAYER <i>et al.</i> , 2003
<i>B. breve</i> B9.15	Csecsemő bélsár	MAYER <i>et al.</i> , 2003

A törzseket minden esetben anaerob körülmények között tartottam az erre kifejlesztett laboratóriumi berendezésben, a Bug boxban (7. ábra). A belső légtérből szivattyú segítségével távolítjuk el a levegőt, amelynek helyére nitrogénben oldott 10 % szén-dioxid és 5 % hidrogén tartalmú gázelegyet engedünk be. A maradék oxigén a hidrogénnel vízzé egyesül a berendezésben található palládium katalizátor segítségével.



7. ábra: Az anaerob körülményeket biztosító Bug box

4.2 Alkalmazott tápközegek és pufferek

- **TPY (Trypticase-Phytone-Yeast) tápleves**

Trypticase pepton (BBL)	10 g
Phytone pepton (BBL)	5 g
Glükóz	5 g
Élesztőkivonat	2,5 g
Tween 80	1 ml
Cisztein-HCL	0,5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ * H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂	0,15 g
FeCl ₂	0,03 g
Desztillált víz	1000 ml

pH=6,8-7,0

Sterilezés 121 °C-on 15 percig.

Az alap TPY táplevesből még három féle variációt készítettem a szénforrás változtatásával, azaz a glükózt az alábbi összetevőkkel helyettesítettem:

- 0,5 % raffinóz
- 0,5 % guar gumi (GG)
- 0,5 % szentjánoskenyér gumi (LBG)

- **Beerens' agar**

Columbia-agar (OXOID CM331)	44 g
Glükóz	5 g
Cisztein-HCL	0,5 g
Agar-agar	5 g
Desztillált víz	1000 ml

Sterilezés 121 °C-on 15 percig. 70 °C-os termosztálás után 5 ml propionsavat kell hozzáadni és 1 n-os NaOH-val pH=5-re állítani (KUN, 2008).

- **Fiziológiás sóoldat**

NaCl	8,5 g
Desztillált víz	1000 ml

- **200 mM McIlvaine puffer (pH=6,6)**

Na ₂ HPO ₄	0,2 M	728 ml
citromsav	0,1 M	272 ml

4.3 Alkalmazott módszerek

4.3.1 Az élősejtszám meghatározása

Az élősejtszám meghatározását Beerens' agaron lemezöntéssel végeztem. A tenyészetekből tizedelő hígítási sort készítettem, a várható sejtszámnak megfelelően az utolsó három hígításból két párhuzamosban leoltást végeztem következőképpen: 2-2 Petri-csészébe 100 µl megfelelően hígított mintát pipettáztam, majd az előre elkészített, sterilizált és 45°C-ra temperált Beeren's agarból 15-20 ml mennyiséget öntöttem a csészék tartalmára és körkörös mozdulatokkal homogenizáltam. A művelet minden pontját steril körülmények között, lamináris bokszt alatti végeztem. Az agar megszilárdulása után a Petri-csészéket anaerob körülmények között, 37 °C-on, 2-3 napig inkubáltam, a baktériumszaporodási idő letelte után megszámoltam a kifejlődött telepeket. A párhuzamos mérések átlagolásával határoztam meg a sejtszámokat és eredményeket telepképzőegységként adtam meg 1 ml tenyészetre vonatkoztatva (tke/ml).

4.3.2 pH mérés

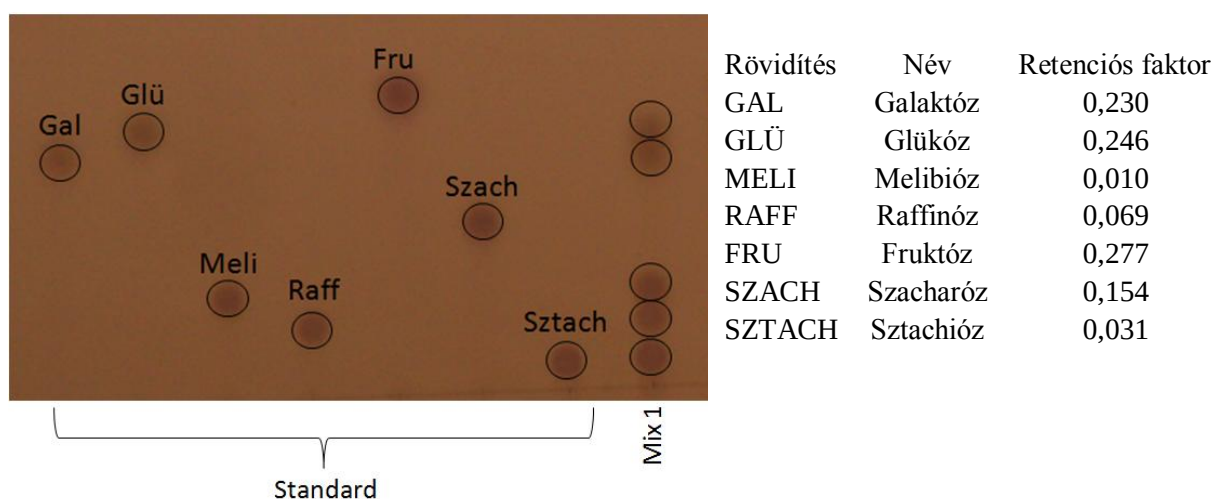
A pH mérést Mettler Toledo készülékkel végeztem, amelyet naponta kalibráltam puffer segítségével. A mérést a 0 órás és a 24 órás minták esetében is elvégeztem az élősejtszám eredmények kiegészítéseként. A pH csökkenése jelzi a baktériumok szaporodását.

4.3.3 Szénhidrátok minőségi összetételének vizsgálata VRK-val

A vékony réteg kromatográfia (VRK, thin layer chromatography, TLC) fázisok közötti megoszláson alapuló elválasztástechnikai módszer, amely segítségével meghatározhatóak egy

elegy komponensei. A VRK esetében az álló fázis egy vékony szilikagél réteg, míg a mozgó fázis folyadékok meghatározott arányú keveréke (futtatószer). A vegyületek azonosítását retenciós faktoruk alapján végezzük, amely a futási idő alatt a vegyület és a futtatószer által megtett utak hányadosa (STEFANOVITSNÉ, 2004).

Állófázisként TLC “silica gél 60”-nal borított alumínium lemezeket (20*20 cm, 0,2 mm) használtam (MERCK, Art. 5554). Az eluens 30:35:5 arányban kloroform: ecetsav: desztillált víz volt (UGRINOVITS, 1980). A színező anyag komponensei a következők: 3 g/100 ml N-(1-naftil)-etilén-diamin-dihidroklorid, 5 V/V % H_2SO_4 , 94,7 V/V % metanol (BOUNIAS, 1980). A következő szénhidrátokat használtam standardként: glükóz, galaktóz, melibióz, szacharóz, raffinóz, sztachióz, guar gumi, ezekből 1g/l-es koncentrációjú oldatokat készítettem és 1 μ l mennyiségben vittem fel az álló fázisra (8. ábra). A szénhidrátokból mixeket is készítettem a következő összeállításokkal: mix 1 (melibióz szubsztrátumhoz: galaktóz, glükóz, melibióz, raffinóz, sztachióz), mix 2 (raffinóz szubsztrátumhoz: galaktóz, szacharóz, glükóz, fruktóz, raffinóz, sztachióz). A futási időtartamot 1,5 órának állapítottam meg.



8. ábra: A standardek TLC képe

4.3.4 HPLC-s szénhidrát analitika

A HPLC - High performance liquid chromatography - nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát jelent. A folyadékkromatográfia olyan elválasztástechnikai módszer, amelynél az elválasztás alapja az álló- és a vele nem elegyedő mozgófázis közötti megoszláskülönbség. Különböző kémiai szerkezetű molekulák esetében a két fázis közötti

megoszlási hányados eltérő, ezért a mozgó fázisban más sebességgel áramolnak, így különböző idő alatt érik el az oszlop végén elhelyezkedő detektort (AMTMANN).

A szénhidrátok minőségi és mennyiségi értékelését Thermo Cientific Corporation Surveyor HPLC rendszer segítségével végeztem. A berendezés felépítése a következő: Surveyor négy csatornás pumpa, Surveyor automata mintaadagoló, Surveyor RI detektor és Aminex HPX-87H oszlop (Bio-Rad). A mérés paraméterei: az eluens 0,005 n H₂SO₄, az injektált minta mennyisége 10 µl, a detektor hőmérséklete 45°C, az oszlop hőmérséklete 45°C, az áramlási sebesség 0,6 ml/min, a futási idő 25 perc. A meghatározásra kerülő mintákat az oldat töménységétől függően hígítottam.

4.3.5 Alfa-galaktozidáz enzim aktivitás meghatározása

Az alfa-galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározását p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid szubsztrátummal végeztem. A mérés során felszabaduló p-nitrofenol az oldatot sárga színűvé változtatja, amely színintenzitás arányos a felszabaduló p-nitrofenol mennyiségével. Ez a színváltozás mérhető 405 nm-en spektrofotométer segítségével. Az enzimaktivitás meghatározásához a következő elegyeket készítettem el (3. táblázat):

3. táblázat: Az enzimaktivitás méréshez összemérendő elegyek (HAVAS, 2008)

	McIlvaine puffer (ml)	Desztillált víz (ml)	Szubsztrátum (ml)	Minta (ml)
Műszervak	0,3	0,7	-	-
Szubsztrátumvak	0,3	0,2	0,5	-
Enzimvak	0,3	0,5	-	0,2
Minta	0,3	-	0,5	0,2

A minta kivételével összemért elegyeket 37 °C-os vízfürdőben 5 percen keresztül előinkubáltam. Ezt követően a minta hozzáadásával elindítottam a reakciót. Az 5 perces reakcióidő letelte után Na₂CO₃ oldattal állítottam le a reakciót. A spektrofotométert a műszervakra nulláztam, majd 405 nm-en megmértem az elegyek abszorbanciáját. Az abszorbancia értékekből a következő képlet segítségével számolható az enzimaktivitás:

$$\text{Aktivitás} \left(\frac{\text{NE}}{\text{ml}} \right) = \frac{(A_m - A_{EV} - A_{SV}) * h * V_r}{V_m * t * \text{kalibrációs egyenes meredeksége}}$$

ahol:

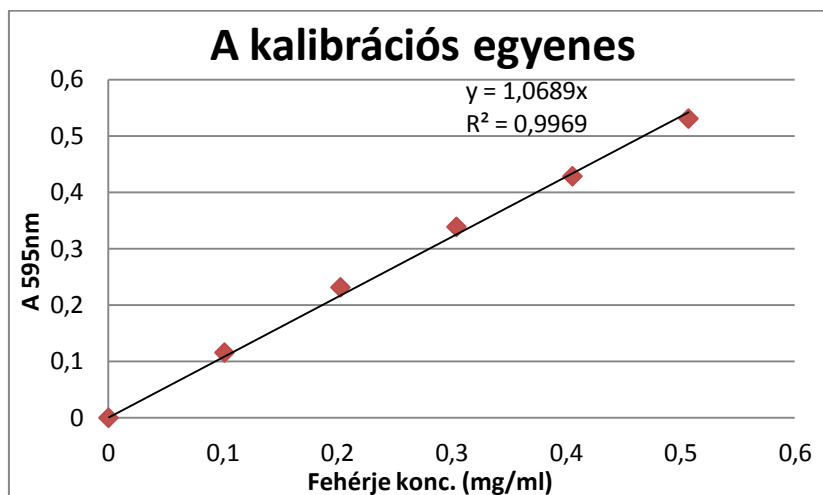
- A_m : a minta abszorbanciája
- A_{EV} : az enzimek abszorbanciája
- A_{SV} : a szubsztrátumok abszorbanciája
- h : a minta hígítása
- V_r : a reakció térfogata (1 ml)
- V_m : a minta térfogata (0,2 ml)
- t : a reakció ideje (5 perc)
- kalibrációs egyenes meredeksége: $y=2,559x$; $R^2= 0,9965$ (HAVAS,2008)

4.3.6 A fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalom meghatározásához a festékmegkötődésen alapuló Bradford módszert alkalmaztam. A reakció során a fehérje és a színező anyag (Coomassie Brilliant Blue G250) kék színű komplexet hoz létre, amely detektálható 595 nm tartományban spektrofotométer segítségével. A módszer 1 és 140 $\mu\text{g/ml}$ tartományban szenzitív fehérjére. A mintában lévő fehérje mennyisége a fényelnyelés mértéke alapján határozható meg a következő képlet segítségével:

$$\text{Fehérjetartalom}(\text{mg/ml}) = \{(A_{\text{minta}} - A_{\text{vak}}) \cdot \text{hígítás}\} / \text{kalibrációs egyenes meredeksége}$$

A meghatározáshoz a Bio-Rad cég által forgalmazott színező reagenst használtam, amit a méréshez négyszeresen hígítottam. A kalibrációs egyenes felvételéhez (9. ábra) hígítási sort készítettem 5 mg/ml-es BSA (Bovine Serum Albumin) törzsoldat segítségével, amelyet előzőleg tízszeresen hígítottam. A mérést mikrotiter lemezben hajtottam végre, amelyben a mintákat 200 μl színező reagenssel 10 percen keresztül reagáltattam. Minden mintánál három párhuzamos mérést végeztem, az abszorbanciákat mikrotiter lemezolvasó segítségével 595 nm-en határoztam meg (HAVAS, 2008).



9. ábra: A fehérjetartalom meghatározásához használt kalibrációs egyenes

4.3.7 Lombikos tenyésztések

250 ml-es névleges térfogatú üvegekbe 150 ml különböző szénhidráttartalmú TPY tápoldatokat készítettem. A szaporítást az 1 tf %-nyi 1 napos előtenyésztéssel indítottam. A 24 órás tenyésztést anaerob körülmények között, Bug boxban 37 °C-on vezettem.

4.3.8 Az enzimermentáció kivitelezése

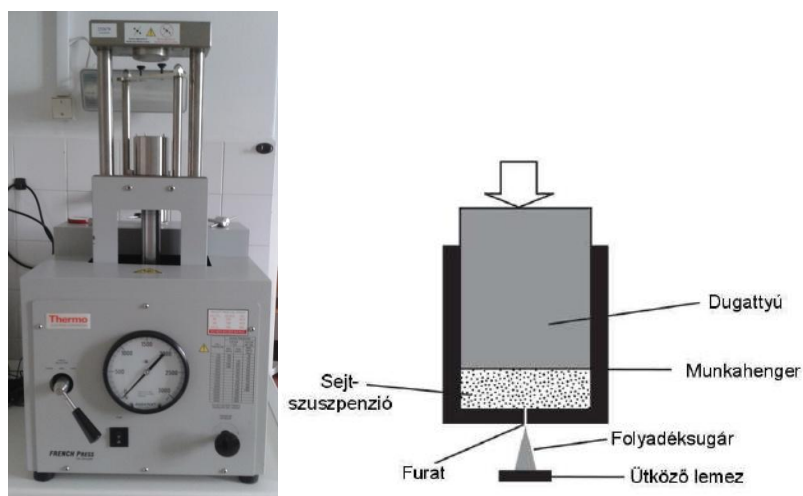
Az alfa-galaktózidáz enzim tartalmú preparátum előállításához *Bifidobacterium longum* A4.8 törzset használtam és az enzim indukálására raffinóz tartalmú TPY tápközeg szolgált. A fermentáció kivitelezése Biostat B (B. Braun Biotech International) laboratóriumi fermentorban (10. ábra) történt. A fermentáció indításához 10 tf %-os 24 órás inokulum tenyészetet használtam. A fermentorhoz tartozó panelen beállítottam a megfelelő hőmérsékletet (37 °C), amelyet a rendszer a duplikált falú köpenybe áramoltatott hűtő és fűtő víz segítségével biztosít. Mivel a bifidobaktériumok anaerob mikroorganizmusok, így a fermentor levegőztető rendszerén keresztül nitrogén gázt áramoltattam a fermentlébe. A gáz optimális eloszlásának és a fermentlé homogenitásának biztosítása érdekében keverést alkalmaztam 120 rpm fordulatszámmal. A kísérlet időtartama 21 óra volt.



10. ábra: *B. longum* A4.8 törzs tenyésztése Biostat B fermentorban

4.3.9 Sejtfeltárás

A sejtfeltárási művelet előkészítéseként a fermentlevet 4 °C-on 10000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltam. Ezt követően leöntöttem a felülúszót, majd a sejteket 0,2 M pH=6,602 McIlvaine pufferrel kétszer átmostam és centrifugáltam. A pufferes mosás segítségével megtisztítottam a sejteket a szennyeződésektől, majd 40 ml pufferes közegben fagyaszttva tároltam. A sejtfeltárást French Press nagynyomású homogenizátor (11. ábra) segítségével végeztem, amelynél a sejtfeltárás alapja a nyomás gyors változása, így az intracelluláris és az extracelluláris nyomások különbsége. A sejtszuszpenziót a berendezés speciális fojtásába pipettázzuk, majd 20000 psi nyomás segítségével feltárjuk a sejteket, az így keletkező sűrű folyadékot kémcsőbe összegyűjtjük. A hatékony sejtfeltárás elvégzése érdekében háromszor végeztük el a műveletet.



11. ábra: French Press nagynyomású homogenizátor

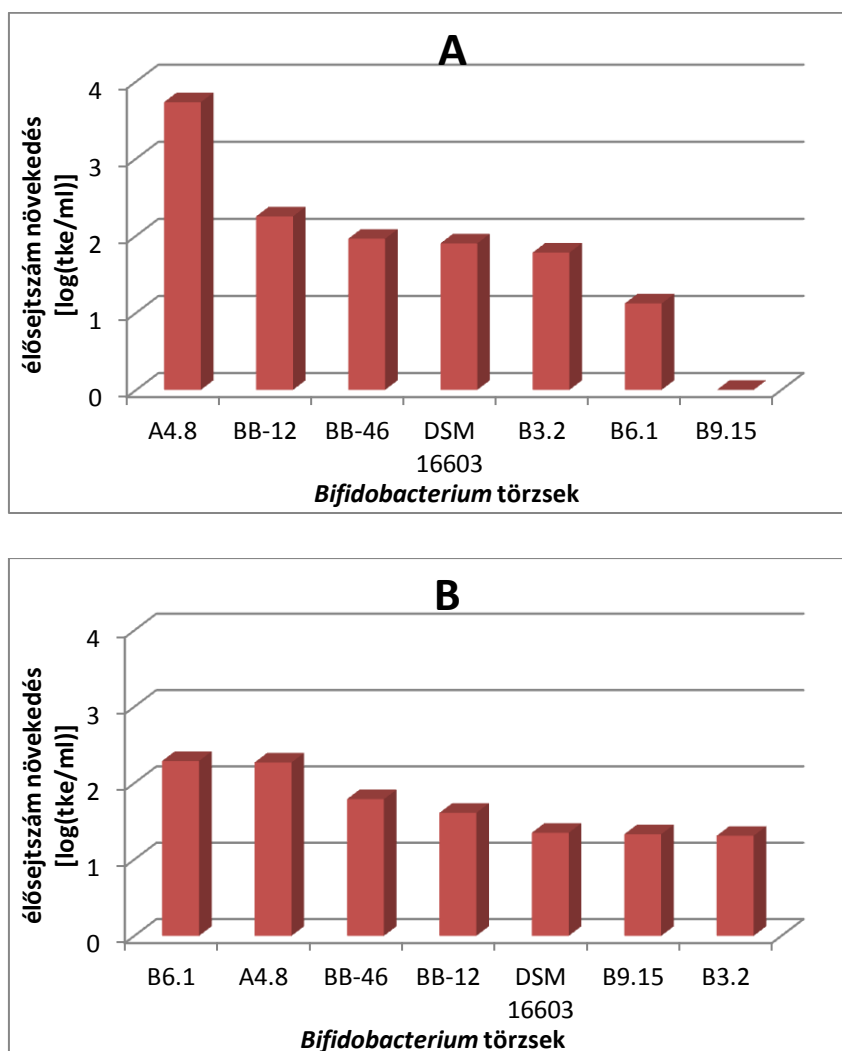
4.3.10 A biokonverziós módszer

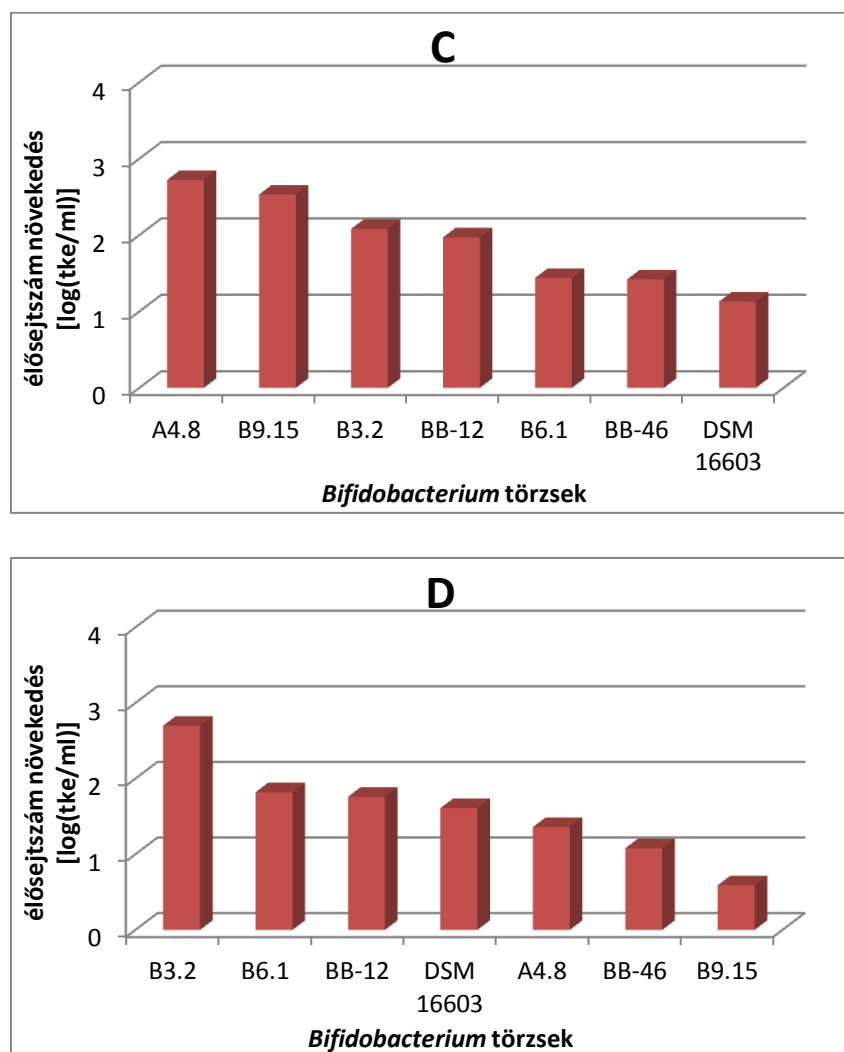
Biokonverziós kísérleteim célja az alfa-galaktozidáz enzim hidrolízis illetve transzferáz aktivitásának vizsgálata 3 féle szubsztrátum esetében (raffinóz, melibióz és guar gumi). A reakciókat 1 ml térfogatban vizsgáltam, melyek különböző koncentrációkban tartalmazták az egyes szubsztrátumokat (raffinóz: 2,5; 5; 25; 40%; guar gumi: 0,5%; melibióz: 25; 40%). A szénhidrát tartalom mellett a pH hatását is vizsgáltam. Három féle kémhatást alkalmaztam, amelyeket a következő pufferek segítségével biztosítottam: pH=7,0 McIlvaine, pH=7,5 Tris-HCl és pH=8,0 Tris-HCl. A reakció hőmérsékletét (37 °C) vízfürdő segítségével állítottam be. A biokonverziót 0,5 U α -galaktozidáz enzimmennyiséggel indítottam. A 100 μ l kivett mintához 500 μ l Na₂CO₃ oldatot mértem a reakció leállításának céljából. A különböző időpontokban vett minták szénhidrát összetételét VRK és HPLC módszerrel vizsgáltam.

5 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 *Bifidobacterium* törzsek szaporodási tulajdonságai

Hét *Bifidobacterium* törzs (*B. lactis* Bb-12; *B. longum* Bb-46; *B. longum* DSM 16603; *B. longum* B6.1; *B. longum* A4.8; *B. bifidum* B3.2; *B. breve* B9.15) szaporodási tulajdonságait vizsgáltam különböző szénforrást tartalmazó TPY tápközegekben. A szaporodás értékelése a sejtszaporulat, valamint az fermentációs folyamat végtermékei által okozott pH változás alapján történt. A kezdeti és a végső élősejtszámok közötti különbség képzésével számítottam ki sejtszaporulatot. A kapott eredményeket a 12. ábrán szemléltetem.





12. ábra: A vizsgált bifidobaktérium törzsek sejtszaporulatai különböző szénforrásokon

A: Glükóz

B: Raffinóz

C: Guar gumi

D: Szentjánoskenyér gumi

A *Bifidobacterium* törzsek szénhidrát hasznosítását vizsgálva jelentős különbségek láthatók, bár a törzsek valamennyi szénhidráton szaporodtak. A törzs szelekciós kísérlet eredményei megerősítették azt a hipotézisem, hogy az egyes törzsek szaporodási tulajdonságai között jelentős különbségek lehetnek. A különböző eredetű *B. longum* törzsek nagyon eltérő szaporodást mutattak az egyes szénhidrátokon.

A csecsemő eredetű B6.1 törzs mutatta a legkisebb szaporulatot glükózon, míg oligo- és poliszacharidon tenyésztve a legjobbak között volt. Ebből arra következtettem, hogy a törzsek előlete, azaz származási helye jelentős hatást gyakorol a törzsek genetikai állományára, illetve azok fenotípusos megnyilvánulására. A sejtszaporulatok alapján az egészséges fiatal felnőtt eredetű A4.8 törzs nőtt legjobban a négy táptalaj közül a glükózos és

guar gumis tápközegekben. Raffinózt tartalmazó tápközegekben szintén kiemelkedő sejthozamot ért el hasonlóan a csecsemő eredetű B6.1 törzshöz. Az eredmények megerősítése érdekében pH változás alakulását is vizsgáltam a fermentáció kezdetén és a 24 órás időpontban is. A pH értékeket a 4. táblázatban foglaltam össze:

4. táblázat: pH értékek alakulása a fermentáció során

Törzs	0. óra				24. óra			
	G	R	GG	LBG	G	R	GG	LBG
BB-12	6,61	6,88	6,90	6,87	3,93	5,43	5,193	5,27
BB-46	6,48	6,70	6,63	6,66	4,05	4,20	5,32	5,31
DSM 16603	6,51	6,80	6,70	6,76	3,86	5,65	5,90	5,62
B 6.1	5,52	6,81	6,74	6,72	3,94	6,11	6,26	6,20
B 3.2	6,50	6,75	6,77	6,76	3,94	6,10	5,54	6,09
B 9.15	6,50	6,76	6,68	6,68	4,10	4,38	5,40	5,47
A 4.8	6,49	6,78	6,70	6,78	3,90	4,2	5,15	5,12

Az eredmények vizsgálata során észrevehető, hogy a 24 órás baktériumszaporodási idő letelte után általában A4.8 törzsnél voltak a legkisebbek a fermentáció végén tapasztalt pH értékek. Így a pH értékek és az élősejtszám adatok alapján megállapítható, hogy a *Bifidobacterium longum* A4.8 törzs szaporodott legjobban a vizsgált körülmények között. Kísérleti céljaim elérése érdekében kiemelésre méltó, hogy ez a törzs jobb szaporulatot mutatott raffinóz triszacharidon és guar gumin, ugyanakkor kevésbé volt aktív kevesebb alfa-galaktozidos kötést tartalmazó szentjánoskenyér gumin. Ezen eredmények birtokában az alfa-galaktozidáz enzim tartalmú fehérje előállításának céljára a *B. longum* A4.8 törzset választottam és az enzim indukció elősegítésére a raffinózos tápközeget (KOVÁTS, 2010) alkalmaztam.

5.2 A *Bifidobacterium longum* A4.8 törzs eredetű α -galaktozidáz tartalmú fehérje előállítása

Az alfa-galaktozidos kötések bonthatóságának vizsgálatához nagyobb mennyiségű preparátum előállítására volt szükségem, ennek érdekében laboratóriumi fermentorban, 1,5 liter térfogatban raffinózos tápközegekben szaporítottam az előzőekben kiválasztott törzset. A fermentorban lévő steril tápközeget 150 ml inokulum tenyészzettel oltottam be. A fermentor irányítása és a fermentációs paraméterek követése számítógép segítségével történt.

A 21 órás fermentáció során - az optimális szaporodási pH értékről, ami közel pH=7,0 volt - mintegy két pH érték nagyságú csökkenést tapasztaltam. A sejteket centrifugálással kinyertem és háromszori mosást követően a 4.3.9 pontban leírtak szerint sejteltávolítást végeztem az intracelluláris alfa-galaktozidáz enzim kiszabadítása érdekében. A kapott fehérjetartalmú oldatot liofileztem. Az így kapott anyagot tekintettem alfa-galaktozidáz tartalmú enzimpreparátumnak. Az enzimpreparátum jellemző adatait az 5. táblázatban adom közre.

5. táblázat: Az alfa-galaktozidáz tartalmú enzimpreparátum főbb jellemzői

Tömeg	0,97 g
Alfa-galaktozidáz aktivitások	974 U/ g preparátum
	0,227 g fehérje/g preparátum
Specifikus alfa-galaktozidáz aktivitás	4,29 U/mg fehérje

5.3 A biokonverziós kísérletek eredményei

Az alfa-galaktozidáz enzim tartalmú preparátum alkalmazásával biokonverziókat valósítottam meg melibióz, raffinóz és guar gumi szubsztrátumokon. Munkám során HPLC analízist, illetve VRK módszert használtam fel a biokonverzió nyomon követésére, illetve a keletkező szénhidrátok koncentrációjának meghatározására.

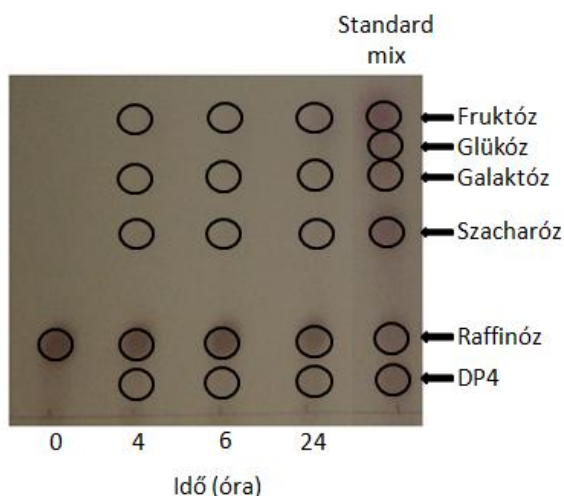
5.3.1 Raffinóz és guar gumi bonthatósága *B. longum* A4.8 eredetű fehérjével

TDK kutatómunkám fontos részét képezi a *B. longum* A4.8. törzs által termelt α -galaktozidáz enzim hidrolízis aktivitásának tanulmányozása. Ennek megvalósítására biokonverziót indítottam 2,5%-os és 5%-os raffinóz szubsztrátumon, valamint 0,5%-os guar gumit tartalmazó szénhidrát oldatban. Mindkét szubsztrátum esetén a pH (7; 7,5; 8) hatását is vizsgáltam. A mintavételi időpontok a következők voltak: 0, 4, 6, 24 óra.

A kapott eredmények azt mutatták, hogy az alfa-galaktozidáz enzimpreparátum a raffinózt hidrolizálja, azonban 0,5 %-os guar gumi szubsztrátumon egyik pH beállítás esetén sem történt kimutatható változás a szénhidrát összetétel tekintetében. Ebben az esetben a VRK módszerrel csupán poliszacharidokat detektáltam.

A hidrolízis tekintetében az 5% raffinóz koncentráció pH=7,0 beállítás bizonyult a legjobbnak. Ebben az esetben kaptam a legnagyobb mennyiségű hidrolízis terméket a

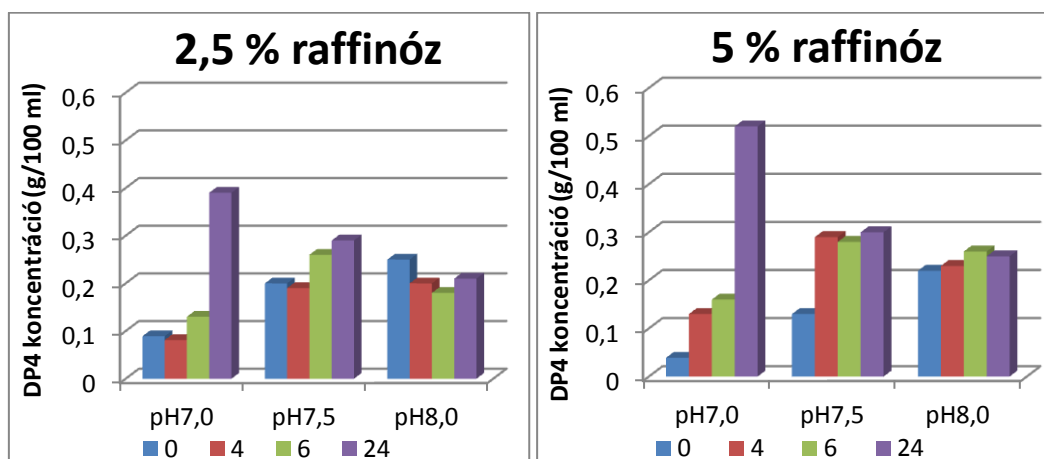
biokonverzió 24. órájában. E paraméterek mellett megvalósított biokonverzió VRK képe a 13. ábrán látható.



13. ábra: A hidrolízis és a transzfer aktivitás termékei 5 %-os raffinóz koncentrációnál, $pH=7,0$ érték mellett

A 13. ábrán megfigyelhető, hogy a hidrolízis aktivitás mellett az enzim rendelkezett transzglikozidáz aktivitással is, amely ilyen kis szubsztrátum koncentrációnál váratlan reakció volt. A hidrolízis során szacharóz, galaktóz és fruktóz keletkezett, a transzfer aktivitás következtében pedig DP_4 oligoszacharid szintézise ment végbe. A biokonverzió során kimutatott fruktóz hidrolízis termék arra enged következtetni, hogy a preparátumnak az α -galaktozidáz enzime mellett invertáz aktivitása is van. Ezt megerősítették a HPLC vizsgálatok eredményei is, ahol a hidrolízis termékek között kimutatható volt a glükóz jelenléte is.

A HPLC mérés eredményei alapján megállapítható, hogy a DP_4 szénhidrátok keletkezésének céljából kedvezőbb kísérleti beállításnak az 5 %-os raffinóz koncentráció és a $pH=7,0$ érték bizonyult. Ezzel a beállítással a maximális DP_4 oligoszacharid hozam 0,52 g/100 ml volt. A két szénhidrát koncentráció esetén a DP_4 hozamokat a 14. ábrán szemléltetem.

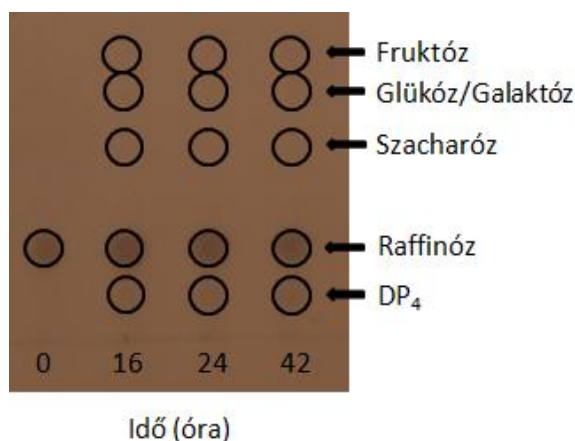


14. ábra: A pH hatásának összehasonlítása a transzfer termékek képződésére 2,5 %-os és 5 %-os raffinóz koncentráció jelenlétében megvalósított biokonverzióknál

5.3.2 A *Bifidobacterium longum* A4.8 eredetű fehérje által katalizált galaktozil transzfer reakciók raffinóz és melibióz szubsztrátumon

Az általam vizsgált fehérje preparátum kis koncentrációjú raffinóz szubsztrátumon mutatott transzferáz aktivitása miatt a továbbiakban azt vizsgáltam, hogy a szénhidrát tartalom növelése (és ezzel a vízaktivitás csökkentése is) miként befolyásolja a készítmény oligoszacharid szintetizáló képességét. Tekintettel arra, hogy a raffinóz szubsztrátumon megvalósított biokonverzió rávilágított arra, hogy a raffinóz szénhidrát növekedési szubsztrátumként való alkalmazása nemcsak az α -galaktozidáz, hanem béta-fruktozidáz (invertáz) enzim szintézisét is indukálta. Így a raffinóz mellett csupán alfa-galaktozidos kötést tartalmazó diszacharidot, a melibiózt is bevontam a biokonverziós kísérletekbe. Az előző kísérletben alkalmazott pH értékek mellett követtem az egyes reakciók időbeli lefolyását. Mintavételek a biokonverzió 0., 16., 24. és a 42. órájában történtek.

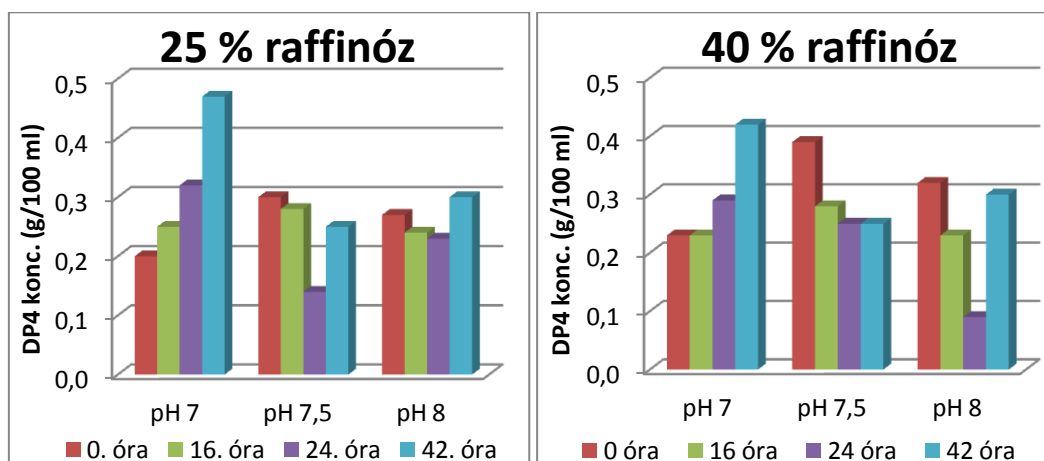
Eredményeim az mutatták, hogy raffinóz esetében a nagyobb szubsztrátum koncentráció esetén is végbemegy a hidrolízis és a transzfer reakció. E megállapítást a 15. ábra is megerősíti, amely a 25% raffinózon végrehajtott biokonverzió termékeit mutatja különböző időpontokban pH=7,0 közegben.



15. ábra: A megvalósult transzfer és hidrolízis reakció 25 %-os raffinóz koncentrációjánál, pH=7,0 értéken

A VRK képen jól látható, hogy ezzel a beállítással is ugyanazok a termékek jelentek meg, mint kisebb szénhidrát koncentráció esetében. A 40 %-os szubsztrátum koncentrációjánál pH=7,0 értéken a keletkező termékek a következők: DP₄ oligoszacharid és fruktóz.

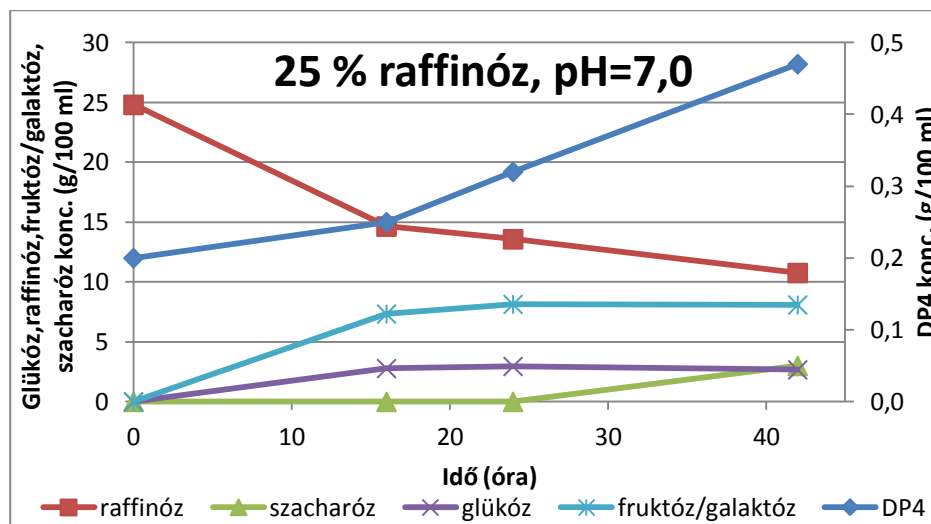
A HPLC vizsgálat eredményeinél megfigyelhető, hogy a felhasznált raffinóz készítmény esetében mindkét szubsztrátum koncentrációjánál és mindhárom pH értéken a DP₄ szénhidrát tartalom már a nulladik időpontban jelen volt. Ennek oka valószínűleg az, hogy a bemért szénhidrát nem csak raffinózt tartalmazott, hanem valamilyen 4 polimerizációs fokú szénhidrát is volt a felhasznált termékben.



16. ábra: A pH hatása a transzglikozidáz aktivitásra 25 és 40 %-os raffinóz koncentráció esetén

A 16. ábrán látható, hogy a két szubsztrátum koncentráció közül a 25 %-os koncentráció eredményezett nagyobb transzfer aktivitást. A transzglikozidáz aktivitás maximális értékét a 25 %-os raffinóz koncentráció, pH=7,0 beállításokkal érte el a 72 órás

időpontra. Ez számszerűen 0,47 g/100 ml koncentrációt jelent. Ez az érték azonban kisebb volt az előző biokonverziós kísérlet során kapott legnagyobb DP₄ oligoszacharid hozamnál (0,52 g/100ml), melyet 5% raffinóz koncentráció esetében kaptam a biokonverzió 24. órájában pH=7,0 értéken.



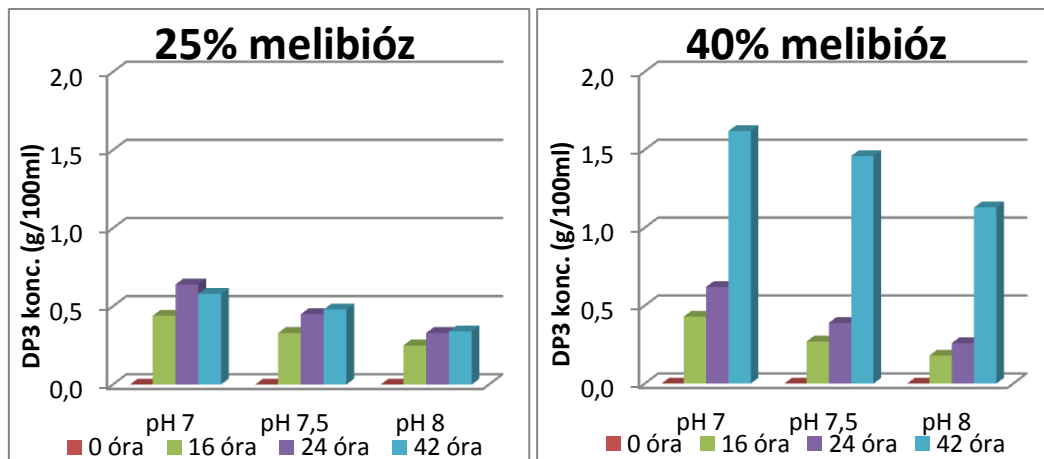
17. ábra: A szénhidrát koncentrációk változása a HPLC analízis eredményei alapján

A 17. ábrán látható a pH=7,0 érték és 25 %-os szubsztrátum koncentráció alkalmazása esetén a szénhidrátok mennyiségének változása. Megfigyelhető a DP₄ oligoszacharidok koncentrációjának növekedése a reakció időtartama alatt, illetve a hidrolízis útján képzett szacharóz tovább bontása monoszacharidokká (glükóz, fruktóz/galaktóz). A HPLC és VRK módszerrel kapott értékek alapján feltételezhető, hogy az enzim e paraméterek mellett is galaktóz transzfer segítségével állított elő DP₄ oligoszacharidokat termékként.

Következtetésként elmondható, hogy a transzfer termék létrehozása érdekében hosszabb ideig kellene vizsgálni a biokonverzió alakulását és a maximális mennyiség biztosítása érdekében optimalni szükséges az enzim/szubsztrátum arányt. A biokonverzió jobb megértése érdekében információt kell szerezni a preparátum béta-fruktozidáz aktivitásáról, illetve egyéb kísérő enzim aktivitására vonatkozóan. Továbbá részletesebb szénhidrát analízis alapján következtethetünk a reakció mechanizmusára. A raffinóz szubsztrátum alfa-galaktozidos kötésének bonthatóságát érdemes lenne fehérje kicsapást követően tisztított galaktozidáz enzimmal is megvalósítani.

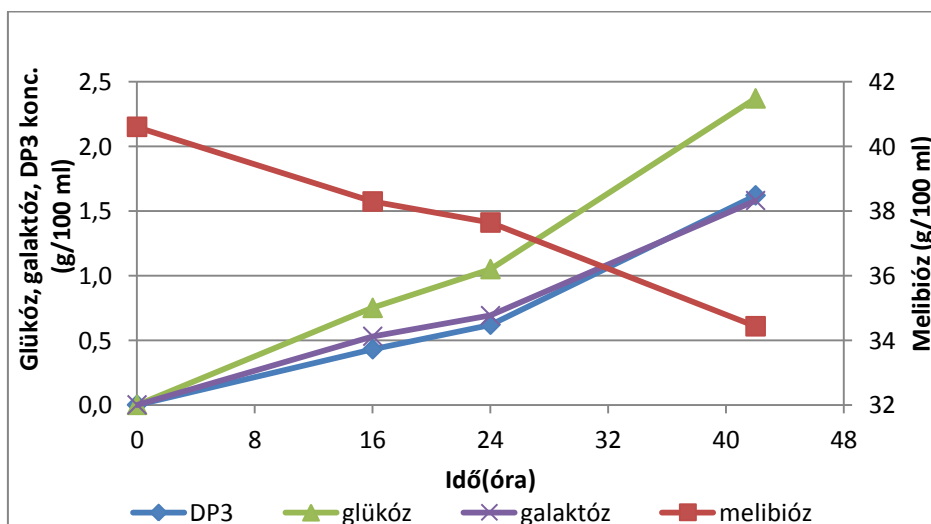
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az alfa-galaktozidáz enzim működésének feltárása céljából biokonverziós kísérleteket valósítottam meg alfa-galaktozidos kötést tartalmazó diszachariddal, a melibiózzal ugyanazon paraméterek mellett, mint a raffinóz esetében.



18. ábra: A DP₃ oligoszacharid mennyiségének változása különböző melibióz koncentrációk és pH értékek esetén

A 18. ábrán látható, hogy a melibióz esetében az alkalmazott két szénhidrát koncentráció, jelentős eltérést mutatott az oligoszacharidok (DP₃) képződése tekintetében. Az alkalmazott paraméterek közül a 40 %-os melibióz, pH=7,0 beállítás volt a legmegfelelőbb. Ebben az esetben 1,62 g/100 ml oligoszacharid hozamot értem el. Az egyes szénhidrátok mennyiségének alakulása az említett paraméterek mellett a következő, 19. ábrán látható.



19. ábra: A szénhidrát összetétel változása 40 % melibióz szubsztrátum esetén pH=7,0 értéken

Megfigyelhető, hogy a reakció során a DP₃ oligoszacharidok mellett monoszacharid (glükóz, galaktóz) termékek is képződtek, illetve a DP₃ oligoszacharid koncentráció növekedett. A glükóz és a galaktóz koncentrációjának változását elemezve következtethetünk arra, hogy galaktóz transzfert katalizált az enzim preparátum, ugyanis az enzim működése során kevesebb galaktóz keletkezett. A kapott eredményeket VRK módszerrel is megerősítettük.

Hasonló eredményeket kaptak Broek és munkatársai (1999), akik *Bifidobacterium adolescentis* eredetű alfa-galaktozidáz enzim hidrolízis és transzferáz aktivitását vizsgálták melibióz és sztachióz szubsztrátumokon, pH=8,0 értéken és 40 °C-on. Munkájuk során az alkalmazott enzim hidrolízis aktivitása mellett transzglukozidáz aktivitást is mutatott. A biokonverzió termékei melibióz szubsztrátum esetén galaktóz és glükóz monoszacharidok, míg sztachióz szubsztrátum esetén galaktóz keletkezett. Mindkét szubsztrátum esetében bizonyították, hogy a vizsgált alfa-galaktozidáz enzim felhasználható α-galakto-oligoszacharidok előállításához.

A biokonverziós kísérleteim eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a *B. longum* A4.8 törzs eredetű alfa-galaktozidáz enzim az alfa-galaktozid kötések hidrolízisével párhuzamosan alfa-galaktozidos kötések kiépítésére is képes. Ennek bizonyítéka a melibiózon megvalósított biokonverzió. További feladatot jelent a transzfer reakció hozamának növelésének érdekében az enzim/szubsztrátum arány optimalása, valamint a reakció idő meghatározása. A kapott eredmények azonban jó alapot biztosítanak és ígéretesnek tűnnek galakto-oligoszacharidok előállítása szempontjából.

Céljaink között szerepel más paraméterek (pl. hőmérséklet, enzim: szubsztrátum arány, ionok, szerves oldószer adagolás) hatásának tanulmányozása is.

A raffinóz szubsztrátumon megvalósított biokonverziók megvalósítása ráirányítja a figyelmet arra, hogy két enzim együttműködése/szinergizmusa hasznos eszköz lehet az oligoszacharidok szintézisében. Ennek bizonyításához részletesebb és racionálisan tervezett kísérletek, valamint mélyebb szénhidrát-kémiai ismeretek szükségesek

6 KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A raffinóz triszacharodon előállított alfa-galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimpreparátum nem hidrolizálta a guar eredetű galaktomannánt. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen irodalmi adatok is bizonyítják, hogy egyes szervezetek több alfa-galaktozidáz enzimet is szintetizálnak, amelyek szubsztrátum specifikusa is eltérő. Rezessyné (2003) dolgozatában szintén beszámol egy olyan *Thermomyces lanuginosus* eredetű oligoszacharidon szintetizált enzimről, amely nem mutatott aktivitást galaktomannán szubsztrátumon csupán láncvégi alfa-galaktozidos kötéseket hidrolizálta. Ademark és munkatársai (2001) négy *Aspergillus niger* eredetű alfa-galaktozidáz enzimet izolált. Ezek közül az α -Gal II, III és IV enzimek nagyon hasonló szerkezetű izoenzimeknek tűntek, míg az α -Gal I teljesen eltérő tulajdonsággal rendelkezett. Az α -Gal II, III és IV enzimek nemcsak a melibiózból, raffinózból és sztachiózból szabadítottak fel galaktózt, hanem a galaktomannánokból is. Ugyanakkor az α -Gal I csak mannozidáz enzimmel együttműködésben szabadított fel galaktózt a galaktomannánokból.

Raffinóz szubsztrátumon végzett biokonverziók során kiderült az alkalmazott szubsztrátum szennyezettsége, valamint az is, hogy az előállított enzimpreparátumnak béta-fruktozidáz aktivitása is van. A hidrolízis mellett transzfer reakcióból származó termékeket is detektáltam. Ez ráirányította a figyelmet arra, hogy több enzimes rendszer is sikeresen alkalmazható lenne oligoszacharidok enzimes szintéziséhez.

Alfa-galaktozidos kötést tartalmazó melibióz szubsztrátumon megvalósított biokonverzió eredményei bizonyították, hogy a *B. longum* A4.8 törzs által szintetizált alfa-galaktozidáz enzim a hidrolitikus aktivitás mellett rendelkezik transzfer aktivitással is. Ezen eredmény ígéretes lehet prebiotikus hatással bíró oligoszacharidok szintézisére. Ha sikerül az élelmiszerfeldolgozásban alkalmazandó probiotikus mikroorganizmusból származó enzimmel prebiotikus oligoszacharidot előállítani, akkor ezzel megalapozható lenne az integrált szinbiotikumok előállítása (PLAYNE *et al.*, 2004).

7 ÖSSZEFOGLALÁS

A bifidobaktériumok az emberi és állati bélrendszer állandó lakói, számukat az étkezési szokások, antibiotikum fogyasztás, valamint a stressz is befolyásolja. Az egészséges szervezet fenntartásához biztosítanunk kell a bifidobaktériumok megfelelő mennyiségét a bélmikrobiotán belül, ennek céljából fogyaszthatunk olyan élelmiszereket, illetve probiotikum tartalmú gyógyszerkészítményeket, amelyek növelik aktivitásukat és számukat a vastagbélben. Továbbá táplálkozásunk során felhasználhatunk olyan nem emészthető élelmiszer összetevőket is, amelyek elősegítik az egészség szempontjából fontos baktériumok számát a béltraktusban, ezek az ún. prebiotikumok. A bifidobaktériumok más bélbaktériumokhoz hasonlóan intracelluláris alfa-galaktozidáz enzimük segítségével hasznosítják a nem emészthető, antinutritív alfa-galakto-oligoszacharidokat, így TDK munkám célkitűzése alfa-galaktozidázt tartalmazó enzimpreparátum előállítás, illetve hidrolízis és transzfer aktivitásának vizsgálata különböző α -galaktozidos kötést tartalmazó szubsztrátumokon.

TDK kutatómunkám során elsőként törzsselektációs kísérletet végeztem hét bifidobaktérium törzs bevonásával, hogy kiválasszam az alfa-galaktozidos kötések tartalmazó szubsztrátumokon melyik törzs mutatja a legjobb szaporodó képességet. Ennek megállapítására az élőcsíraszám és a pH csökkenés együttes értékelése szolgált. Eredményeim alapján alfa-galaktozidáz enzim tartalmú preparátum előállításához a *Bifidobacterium longum* A4.8 törzset és az enzim indukálására kiválóan alkalmas raffinóz tartalmú tápközeget választottam. Az enzimfermentációt 1,5 literes fermentorban 37°C-on, anaerob körülményeket biztosítva valósítottam meg. A kapott biomasszatömeget centrifugálással kinyertem és háromszori mosást követően sejtfeltárást végeztem az intracelluláris alfa-galaktozidáz enzim kinyerése érdekében. A kapott fehérjetartalmú oldatot liofileztem. Az így kapott anyagot tekintettem alfa-galaktozidáz tartalmú enzimpreparátumnak. Az enzimpreparátum további tisztítása nem szerepelt a terveim között, mivel az intracelluláris enzimek tisztított formája nagyon instabil és ezért természetes környezetük meghagyásával kívántam alkalmazni a biokonverziós kísérletekben.

Biokonverziós kísérleteimet különböző kémiai szerkezetű α -galaktozid kötések tartalmazó oligoszacharidokon (melibióz és raffinóz), valamint guar eredetű galaktomannán szubsztrátumon valósítottam meg. Különböző szubsztrátum koncentrációkat alkalmazva vizsgáltam a termékösszetétel alakulását, továbbá információt kívántam kapni a pH hatására vonatkozóan is. Megállapítható volt, hogy az adott reakciókörülmények között, az általam

alkalmazott nyers enzimpreparátum hidrolizálta a raffinóz és a melibióz (α -galaktoligoszacharid) szénhidrátokat, ugyanakkor a vizsgálati körülmények között guar eredetű galaktomannán szubsztrátumon termékképződést nem detektáltam. Ez az eredmény nem meglepő, mivel különböző szervezetek esetében is leírták, hogy több α -galaktozidáz enzimet is szintetizálnak, amelyek szubsztrátum specifitása is eltérő. Rezessyné (2003) dolgozatában szintén beszámol egy olyan *Thermomyces lanuginosus* eredetű oligoszacharidon szintetizált enzimről, amely nem mutatott aktivitást galaktomannán szubsztrátumon csupán láncvégi α -galaktozidos kötéseket hidrolizálta. Ademark és munkatársai (2001) négy *Aspergillus niger* eredetű α -galaktozidáz enzimet izolált. Ezek közül az α -Gal II, III és IV enzimek nagyon hasonló szerkezetű izoenzimeknek tűntek, míg az α -Gal I teljesen eltérő tulajdonsággal rendelkezett. Az α -Gal II, III és IV enzimek nemcsak a melibiózból, raffinózból és sztachiózból szabadítottak fel galaktózt, hanem a galaktomannánokból is. Ugyanakkor az α -Gal I csak mannozidáz enzimmal együttműködésben szabadított fel galaktózt a galaktomannánokból.

A melibióz szubsztrátumon megvalósított biokonverziós kísérleteim bizonyították, hogy *Bifidobacterium longum* A4.8 α -galaktozidáz enzim a hidrolízis mellett transzfer reakciót is katalizál. A raffinóz szubsztrátumon megvalósított biokonverziók termék skálájának analízise során fény derült arra, hogy az előállított enzimpreparátum az α -galaktozidáz enzim mellett béta-fruktozidáz enzimet is tartalmaz, mivel a galaktóz mellett glükóz és fruktóz felszabadulást is regisztráltunk. Ugyanakkor ebben az esetben is detektálható volt magasabb polimerizációs fokkal rendelkező oligoszacharidok képződése. További feladatot jelent annak kiderítése, hogy milyen az együttműködés/szinergizmus a két enzim között és ez hogyan aknázható ki oligoszacharidok szintézisére.

Kísérleti eredményeim alapjául szolgálhat oligoszacharidok enzimes szintéziséhez. Ezen oligoszacharidok között megtalálhatók prebiotikumként hasznosítható szénhidrátok is. A probiotikum és a prebiotikum együttes alkalmazása révén szinbiotikum jön létre. Integrált szinbiotikumoknak nevezzük az olyan élelmiszer-összetevőket, amikor a cél mikroorganizmus enzimének felhasználásával állítanak elő a prebiotikumot (PLAYNE *et al.*, 2004). Kísérleti eredményeim ígéretesek abból a szempontból, hogy rávilágítanak az integrált szinbiotikum létrehozásának lehetőségére. Mivel a fogyasztói érdeklődés egyre nagyobb az egészségmegőrzést és a betegségek kockázatát csökkentő funkcionális élelmiszerek iránt, így az integrált szinbiotikumok felhasználása az élelmiszer-feldolgozásban a jövő egyik alapvető technológiája lehet.

8 IRODALOMJEGYZÉK

- Ademark, P., Larsson, M., Tjerneld, F., Stålbrand, H. 2001. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology*. 29:441–448.
- Amtmann, M. Nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia órai jegyzet. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék.
- Arunachalam, K. D. 1999. Role of Bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*. Vol. 19, 10: 1559-1597.
- Bivati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 50: 117-131.
- Bounias M. (1980) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride as a new reagent for nanomole quantification of sugars on thin layer plates by a mathematical calibration process. *Analytical Biochemistry*, 106: 291-295
- Bryant, R. J., Rao, D. R., Ogutu, S. 2004. α and β -galactosidase activities and oligosaccharide content in peanuts. *Plant Foods for Human Nutrition*. 58: 213–223.
- Cunha, P. L.R., de Paula, R.C.M., Feitosa, J. P.A. 2007. Purification of guar gum for biological applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 41:324–331.
- Dionísio, M., Grenha, A. 2012. Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*. 4(3): 175-185.
- Doleyres, Y., Lacroix, C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal* 15: 973–988.
- Germain, D. P., Giugliani, R., Hughes, D. A., Mehta, A., Nicholls, K., Barisoni L., Jennette, C. J., Bragat, A., Castelli, J., Sitaraman, S., Lockhart D. J., Boudes P.F. 2012. Safety and pharmacodynamic effects of a pharmacological chaperone on α -galactosidase A activity and globotriaosylceramide clearance in Fabry disease: report from two phase 2 clinical studies. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 7:91.
- Germain, D. P. 2010. Fabry disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 5:30.

- Gomes, A. M. P., Malcata F. X. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science & Technology 10: 139-157.
- Havas, P. 2008. Bifidobaktériumok enzimeinek vizsgálata és kimutatása. Diplomamunka. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszíparti Tanszék.
- Kováts, V. 2010: A bifidobaktériumok néhány karbohidroláz enzimének vizsgálata. Diplomamunka. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszíparti Tanszék.
- Kun, Sz. 2008. Nem tejalapú probiotikus élelmiszerek előállítási lehetőségeinek megalapozása. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszíparti Tanszék.
- Mayer, Á., Rezessy-Szabó, J., Bognár, CS., Hoschke, Á. 2003. Research for creation of functional foods with Bifidobacteria. Acta Alimentaria, Vol. 32 (1): 27–39.
- Mayer, Á. 2004. Bifidobaktériumok izolálása, azonosítása, fiziológiai, biokémiai és funkcionális jellemzésük. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszíparti Tanszék.
- Mudgil, D., Barak S., Khatkar, B. S. 2011. Guar gum: processing, properties and food applications - A Review. Journal of Food Scientists & Technologists (India).
- Nakata, H., Sakurai, H., Nagura, T., Tanaka, M., Sone, T., Asano, K. 2013. Raffinose production using α -galactosidase from *Paraphaeosphaeria* sp. Mycoscience. 54:247-251.
- Playne, M. J., Crittenden, R. G. 2004. Prebiotics from lactose, sucrose, starch and plant polisaccharides in Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals (edb. J. R. Neeser, J. B. German). pp:103-108. Marcel Dekker. New York, USA.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., Douwe van Sinderen. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. Genes Nutrition. 6:285–306.
- Rauen, H. M., Kuhn, R. 1964. Biochemisches taschenbuch. pp: 90-99. Springer-Verlag. Berlin.

Rezessyné, Sz. J. 2003. *Thermomyces lanuginosus* eredetű α -galaktozidáz enzim előállítása és jellemzése. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszipari Tanszék.

Shankar, S. K., Kumar, S. K. P., Mulimani, V. H. 2011. Calcium alginate entrapped preparation of α -galactosidase: its stability and application in hydrolysis of soymilk galactooligosaccharides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38:1399–1405.

Shen, W., Li, Y., Chen, H., Jin, Z., Xu, X., Zhao, J., Xie, Z. 2009. Purification and application of α -galactosidase from germinating coffee beans (*Coffea arabica*). *European Food Research Technology*. 228:969–974.

Shivam, K., Mishra, S. K. 2010. Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase with transglycosylation activity from *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796. *Process Biochemistry* 45:1088–1093.

Stefanovitsné, B. É., Hegedűs A. 2004. Biokémia gyakorlatok. Kísérleti jegyzet. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék.

Urginovits M. (1980) Zuckeranalyse mit GC, HPLC, DC und enzymatisch- Ein Vergleich der Methoden. *Chromatographia* 13: 386-394.

Van Laere, K. M. J., R. Hartemink, R., Beldman, G., Pitson, S., Dijkema, C., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. 1999. Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 α -galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52: 681-688.

Xiao, M., Tanaka, K., Qian, X.M., Yamamoto, K., Kumagai, H. 2000. High-yield production and characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* grown on raffinose. *Biotechnology Letters* 22:747–751.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Rezessyné dr. Szabó Judit Tanárnőnek, hogy lehetőséget biztosított számomra a TDK dolgozatom megvalósításához, illetve a szakmai tanácsokat, amelyekből rengeteget tanulhattam.

Szeretném megköszönni Styevkó Gabriellának és Havas Petrának, hogy időt és fáradságot nem kímélve segítették feladataim elvégzését.