

37. OTDK Biológia Szekció

Étrendkiegészítőként alkalmazott natto kináz enzim bioszintézisének vizsgálata *Escherichia coli*-ban

Hallgató: *László Dalma*- Fenntartható biotechnológiák mesterszak, II. évf.,
Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem

Témavezetők: *Dr. Albert Csilla*- Élelmiszertudományi tanszék
Dr. Salamon Pál- Biomérnöki tanszék

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	4
1. Bevezető	5
1.1. A téma bemutatása.....	5
1.2. A modern biotechnológia ipari alkalmazása	6
1.3. A rekombináns fehérjék/enzimek bioszintézise.....	7
1.4. A fehérjetermelés növelésére tett kísérletek	9
1.5. A nattokináz enzim ipari jelentősége.....	11
1.5.1. Az enzim szerkezete és tulajdonságai.....	12
1.5.2. A NK előállításának kutatása <i>E. coli</i> -ban	13
1.6. Zárványtestek képződése	14
2. Célkitűzés	15
3. Anyagok és módszerek	16
3.1. A nattokináz enzim génjének izolálásához szükséges oligonukleotid-, illetve a rekombináns konstrukció tervezése	16
3.2. Genomi DNS izolálása <i>Bacillus subtilis</i> törzsekből.....	16
3.3. A nattokináz enzim génjének izolálása és a gén felsokszorozítása.....	18
3.4. A rekombináns konstrukció <i>in vitro</i> létrehozása	18
3.5. A célgént tartalmazó plazmid transzformálása <i>Escherichia coli</i> baktériumsejtekbe.....	21
3.6. A nattokináz enzim bioszintézise	23
3.7. Az enzim feltárása és a bioszintézis hatékonyságának vizsgálata.....	23
4. Eredmények	25
4.1. Génizoláláshoz szükséges oligonukleotidok és rekombináns konstrukció tervezése	25
4.2. Genomiális DNS izolálás <i>Bacillus subtilis</i> törzsekből.....	26
4.3. A NK gén amplifikációja a genomiális DNS-ről.....	27

4.4.	A rekombináns konstrukció <i>in vitro</i> létrehozása	27
4.5.	A különböző expressziós körülmények hatékonyságának összehasonlítása 30	
5.	Diszkusszió	33
6.	Irodalom	35

Kivonat

A biológia, molekuláris biológia, mikrobiológia és biotechnológia területén végzett kutatások jelentős mértékben hozzájárulnak a korszerű fejlesztések folyamatához a különböző iparágak területén, mint például a gyógyszeripar vagy élelmiszeripar. A natto nevű japán fermentált élelmiszerből izolált nattokináz enzim (NK) a *Bacillus subtilis* sp. natto baktériumtörzs által termelt szerin proteáz, melynek táplálkozástudományi szempontból szerepe van a vérrögök elosztatásában, ezáltal megakadályozva a trombózis kialakulását. A NK rekombináns módon történő bioszintézise hozzájárul az enzim mennyiségi és minőségi tulajdonságainak fokozásához, illetve az enzim funkcionális paramétereinek kutatásához.

Célkitűzésünk a NK bioszintéziséhez szükséges rekombináns konstrukció tervezése, a gén izolálása *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) baktériumtörzsből, a rekombináns konstrukció létrehozása *in vitro*, majd transzformálása *Escherichia coli* (*E. coli*) baktériumtörzsekbe a rekombináns fehérjeszintézis vizsgálatához, három különböző sejtvonal és két izopropil- β -1-D-tiogalaktopiranozid (IPTG) koncentráció alkalmazásával.

1. Bevezető

A mesterségesen létrehozott gének megalkotása és expressziós rendszerekbe való bejuttatása lehetővé tette a heterológ génexpresszió megvalósítását amely a biotechnológiai kutatások alapjának egy részét képezi. A biotechnológiai eljárások alkalmazásával előállított termékek jelentős része emberi illetve állati diagnosztikában, terápiákban, illetve oltóanyagokként felhasznált heterológ fehérjék vagy enzimek valamint biopolimerek. Napjainkban számos új fehérje termelését valósítják meg a kutatásoknak és fejlesztéseknek köszönhetően. A különböző expressziós rendszerek felhasználásával, melyek különböznek az expressziós gazdaszervezetekben illetve az alkalmazott szabályozó elemekben és lehetőséget biztosítanak a rekombináns fehérjék széleskörű előállítására költség-, idő- és energiahatékony módon (McDonald 2011).

A prokarióta sejtek, nagy többségben a baktériumok és élesztőgombák számos előnnyel rendelkeznek a heterológ fehérje termelés megvalósításához, mivel szaporodásukhoz és életfolyamataikhoz szükséges szén- és energiaforrások költséghatékony módon biztosíthatóak, gyors a biomassza növekedése, a magas sejtsűrűség mellett történő fermentáció magasabb termékhozatazt kínál illetve genetikai módosításuk és fermentációs paramétereik megteremtése nem igényel speciális körülményeket. A bakteriális expressziós rendszerek hátránya, hogy a fehérjeexpresszió során nem működik bennük poszt-transzlációs rendszer és számos esetben inaktív fehérjék termelődnek, inklúziós testekben (Sahdev, Khattar, és Saini 2007).

1.1. A téma bemutatása

Az fejlődő biotechnológiai eljárások lehetővé teszik, hogy számos területen alkalmazzák az egyes technológiákat a termékek költséghatékony és gazdaságos előállítására. A fehérjetermelési eljárások kutatása és optimalizálása jelentősen hozzájárul a rekombináns fehérjék és enzimek előállításának fejlesztéséhez az ipari lépték tekintetében is. A rekombináns fehérjetermelési eljárások lehetővé teszik a fehérje expressziót olyan gazdaszervezetekben melyek fenntartása költséghatékony módon kivitelezhető az alacsony tápanyag igény és a könnyen megteremthető fermentációs paraméterek miatt, valamint a gyors szaporodási képesség miatt. Ezen tulajdonságokat figyelembe véve a rekombináns fehérjetermelésre alkalmazott baktériumok egyike a kiemelkedően sokat kutatott *Escherichia coli* (*E. coli*). Az *E. coli* baktériumtörzsek genetikailag jól jellemzett, alacsony tápanyag igényű és gyors szaporodási képességgel rendelkező baktériumtörzsek, melyek a rekombináns fehérjetermelés területén az egyik legtöbbet kutatott expressziós rendszerek (Cronan 2005).

Az *E. coli* expressziós rendszereket jelentős mértékben alkalmazzák különböző organizmusokból származó fehérjék vagy enzimek bioszintézisére a gazdaságos és hatékony termelés miatt. Az egyes eljárások mint például az autoindukciós eljárás kutatása és fejlesztése növeli az *E. coli* baktériumtörzsekben előállítható rekombináns fehérjék mennyiségét a gyógyszeripar, élelmiszeripar és más iparágak számára is.

1.2. A modern biotechnológia ipari alkalmazása

Az ipari fenntarthatóság alapja a fenntartható termelés és feldolgozás az ökológiai és társadalmi fenntarthatóság összefüggésében. A biotechnológia egy olyan terület mely széleskörűen alkalmazható a változatos iparágak esetében. A terület három fő tevékenységet foglal magába: a géntechnológiát, a fehérjemérnökséget illetve az anyagcsere mérnökséget. A negyedik tevékenység úgy ismert mint biokémia, bioeljárás vagy biotechnológia, mely szükséges a biotechnológiai termékek kereskedelmi termeléséhez illetve a szolgáltatások hasznosításához. A sokoldalú biotechnológiai eljárások kulcsfontosságú szerepet töltenek be a fenntartható vegyipari technológiákban. Az iparágak melyek előzőleg nem voltak biológiaiinak meghatározva, az üzletre való hatása miatt, vizsgálják a biotechnológia alkalmazhatóságának lehetőségeit a jövedelm érdekében. A biotechnológia új lehetőségek tárházát jelenti a már meglévő illetve új termékek és szolgáltatások fenntartható előállításához (Gavrilescu és Chisti 2005)

Az ipari biotechnológia fejlesztése megoldást jelenthet azon elgondolásra, hogy az emberiséget tápláló, biztonságos és egészséges ételekkel lássák el, vegyi és innovatív anyagokkal együtt, olyan előállítási eljárást alkalmazva mely során csökkenteni próbálják az energia-, területi- és víz erőforrásokat, törekedve a szezonális és geográfiai függetlenségre és a hulladék csökkentésére. A biotechnológia legismertebb területei a vörös, zöld és fehér biotechnológia, melyek jelentős hatást gyakorolnak a modern társadalomra és gazdaságra. A biotechnológia zöld ágazatai tették lehetővé a „zöld forradalmat” a masszív növekedés és termés hozam növelés céljából nemesített fajok által, melyek agronómiaiailag előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek, például magas tápértékkel és betegségekkel szemben mutatott ellenálló képességgel. A vörös és fehér biotechnológia középpontjában a nem-sejtes termékek foglalnak szerepet, mint a gyógyszerészeti alkalmazású vegyületek illetve finom és ömlesztett vegyszerek (Risner, Szilvay, és Oksman-Caldentey 2020).

A biotechnológiák ipari alkalmazása lehetővé teszi kereskedelmi enzimek bioszintézisét, melynek fejlesztésére számos kutatási területen keresnek megoldásokat, innovatív előállítási és

termelési folyamatok tervezésével. Az enzintermelés magas hozamú megvalósításához és gazdaságos előállításához szükségeltetik a biotechnológia területén végzett kutatások összessége. A kereskedelem illetve az ipari ágazatok általi enzim kereslet növekedése miatt fontos az eljárások hatékonyságának növelése, az idő- energia- és költséghatékony előállítás, a lépték növelés illetve a fenntarthatóság szem előtt tartása. A folyamatok megtervezéséhez és kutatásához elengedhetetlenek a biotechnológiai, génsebészeti, fehérje- és anyagcsere mérnökségi ismeretek.

Az ipari hasznosítású enzimek származhatnak növényekből, állatokból vagy mikroorganizmusokból. Leggyakrabban ezeket a kereskedelmi és ipari enzimeket mikroorganizmusokat használva állítják elő, a baktériumokat és egysejtű gombákat tápoldatban, szubmerz fermentációval vagy szilárd fermentációk során nevelik és ezekben a kultúrákban történik a fehérjék és enzimek bioszintézise. Az ipar számára előállított enzimek jelentős részét a technológiai folyamatok során alkalmazott enzimek képezik, az élelmiszeriparban, textil iparban, bőrfeldolgozó iparban, illetve bioüzemanyag előállítása során. Az előállított enzimek második jelentős csoportjába tartoznak a kutatások, orvostudományok és gyógyszeripari területeken alkalmazott enzimek. Annak függvényében, hogy az előállított enzimek tudományos kutatás során vagy ipari területen kerülnek felhasználásra különböző tulajdonságokkal kell rendelkezzenek, melyek közül az egyik a tisztaság. Minél nagyobb tisztaságú enzimet követel meg az alkalmazási terület annál költségesebbek az előállítási és tisztítási folyamatok (Tarafdar és mtsai. 2021).

1.3. A rekombináns fehérjék/enzimek bioszintézise

A rekombináns fehérjék termelésére különböző expressziós rendszereket, gazdaszervezeteket alkalmaznak, melyek közül a bakteriális bizonyult a leggyakrabban alkalmazottnak a rekombináns fehérjetermelés megvalósításához. A bakteriális expressziós rendszerek közül a kutatások során leggyakrabban a szervezet idegen gén bejuttatására illetve az azokról történő expresszióra az *Escherichia coli* baktériumsejteket alkalmazzák és fejlesztik a fehérjetermelés hatékonyságának növeléséhez. A fehérjetermelés optimalizálásának érdekében több szempont érvényesülését is figyelembe kell venni a hatékonyság növeléséhez, a magasabb hozamú rekombináns fehérje termelése érdekében. A hatékonyság növelésének érdekében több fermentációs feltétel, paraméter együttes alkalmazása illetve ezek változtatásaival történő optimalizálás teszi lehetővé a sikeres fehérje szintézis megvalósulását, mivel a hatékonyság számos esetben több tényező együttes meglétének hatásaként

eredményeztethető. A kutatások során vizsgált esetekben a génmódosított *E. coli* baktérium törzsek, a változó promóter és terminátor szekvenciák, dajkafehérjékkel való együttes fehérje expresszió az optimális fehérje feltekeredéshez, a stabilitás és az oldékonyság növeléséhez alkalmazhatóak a hatékonyság növelés érdekében (Sahdev, Khattar, és Saini 2007).

A sikeres fehérje szintézis megvalósulásához vélhetően az első és feltehetően legfontosabb lépés az expressziós rendszer, az organizmus kiválasztása, melynek feltétele a kiválasztott heterológ rendszer expressziós mechanizmusának megfelelő ismerete. Az *E. coli* bakteriális expressziós rendszer alkalmazása mellett szóló legfontosabb érv a mechanizmusok megfelelő ismerete, a genomjának pontosan feltérképezett szerekezete, a költséghatékony módon megvalósítható fermentációs kísérletek, ezen kívül a kutatások során meghatározták a baktériumsejtek expressziós és szabályozási mechanizmusait melyek ismerete lehetőséget nyújt a genetikai módosítások széleskörű és könnyen kivitelezhető megvalósításához a genetikai mérnökség és fehérjemérnökség eszközeivel. A baktériumtörzs felhasználásának előnyei közé tartozik továbbá, hogy a kultúra növekedése gyors, populáció dinamikai változásai rövid időtartam alatt mutatnak látványos változásokat, tápanyagigénye alacsony, amely tulajdonság lehetővé teszi a gazdaságosan kivitelezhető tápoldatok és táptalajok előállítását és legfőbb előnyei közé tartozik a fehérjetermelés szempontjából, hogy magas a rekombináns fehérje szintézis szintje a szabályozási és expressziós mechanizmusok által (Jo, Pichaimuthu, és Srimeenakshi 2015).

A rekombináns fehérjetermelés esetében fontos lépés a fermentáció során a tápoldat megfelelő kiválasztása, melynek változtatása a legegyszerűbb a fehérjetermelés növelésének érdekében történő optimalizálási kísérletek során. A tápoldatok vagy táptalajok elkészítéséhez használt sók, pepton és élesztő kivonat koncentrációjának változtatásával illetve a tápoldat típusok változtatásával is magasabb mennyiségű rekombináns fehérje termeltethető. Különböző tápoldatokat használnak a fermentációk során ilyenek például az LB, TB és 2YT tápoldatok, melyek használhatóak az expresszió optimalizálásához. Továbbá megfelelő prosztetikus csoportok vagy kofaktorok hozzáadásával a tápoldathoz kivédhető a zárvány testekben való termelődése a rekombináns fehérjének és növeli a fehérje oldékonyságát, mivel hozzájárul a fehérje helyes feltekeredésének megvalósulásához és növeli a stabilitását is ezáltal. A rekombináns fehérje szintézis során a periplazmatikus térbe kiküldött fehérjék mennyiségének megnövekedése meggátolható ha figyelembe vesszük, hogy a sejtek viszonylag magas szorbit és szacharóz koncentráció mellett kedvező növekedést mutatnak (Jo, Pichaimuthu, és Srimeenakshi 2015).

A DNS szerkezeti megismerése és az egyes szekvenciák meghatározása lehetővé tette a DNS technikák által megvalósítható, fehérjekódoló szekvenciák megismerését, azok szelekcióját illetve más, az eredeti gazdaszervezettől eltérő organizmusba való bejuttatásukat, mint például a plazmidok általi bejuttatásukat baktérium sejtekbe, megvalósítva a szervezet-idegen fehérjék bioszintézisét az erre alkalmas baktérium törzsekkel. A legtöbbet használt szabályozási rendszerek közül az egyik legismertebb és leghatékonyabb rendszer erre a T7 szabályozási mechanizmus az *E. coli* baktérium törzsekben. Ennek alapja egy olyan *E. coli* génmódosított baktériumtörzs melybe a módosítások által beépítették a T7 bakteriofágból származó T7 RNS polimeráz génjét. A gén expressziója a *lacUV5* promóter által van szabályozva, illetve a törzsbe bejuttatott célfehérjét kódoló gén plazmidba építve, a T7 promóter szabályozása alatt áll. A így létrehozott génmódosított baktériumtörzset nevezzük *E. coli* BL21 (DE3)-nak. Abban az esetben ha a *lacUV5* promóter indukálódik, expresszálódik a T7 RNS polimeráz génje, és az RNS polimeráz megkezd a T7 promóter szabályozása alatt álló célgén átírását, így valósul meg a célfehérje génjének transzkripciója majd későbbiekben transzlációja (Studier 2005).

1.4. A fehérjetermelés növelésére tett kísérletek

Chhetri és munkatársai kísérleteik során vizsgálták fehérjetermelés hatékonyságának növelésére az etanol alkalmazását. Annak ismeretében, hogy az etanol amfipatikus molekula lehet, változásokat indukálhat az intracelluláris környezetben, megváltoztatva például a membrán fluiditását, a membrán transzportját vagy a membrán lipid összetételét. Ezek a változások befolyásolhatják a membránköti folyamatokat, például a DNS-replikációt, befolyásolhatják a DNS-szintézist. A kutatás során azt feltételezték, hogy a DNS-szintézis fokozása is hozzájárult a fehérjetermelés fokozásához, ezért a felhasznált *E.coli* baktériumsejteket etanollal kezelték. A kutatás során az etanolt 1, 2, illetve 3 térfogatszázalékban alkalmazták az LB-leveshez adva. A kutatás eredményeként azt vették észre, hogy a legmagasabb fehérjeexpressziót 3%-os etanol alkalmazásával érték el. Ha 5%-nál nagyobb mennyiségben használták, az etanol gátolta a sejtnövekedést (Chhetri, Kalita, és Tripathi 2015).

Kutatásukban Georg Faust és munkatársai az autoindukciós fermentációban a laktóz szerepét betöltő IPTG alkalmazható koncentrációjának meghatározására törekedtek. A kísérletben a célfehérje egy zöld fluoreszcens fehérje (eGFP) volt, amelynek génjét a pET28 plazmidba integrálták. A fermentációs folyamatot szakaszosan, 37 °C-os inkubációs

hőmérsékleten végezték, a sejtsűrűséget 600 nm-en illetve a képződött eGFP koncentrációját folyamatosan monitorozták mikrotitráló lemezen megfelelő leolvasó műszerrel. Ennek eredményeként megállapították, hogy az eGFP expressziója hozzáadott IPTG-vel az IPTG koncentrációjától is függ. Az autoindukció során laktóz helyett IPTG-t alkalmazó hasonló expressziók esetében magasabb expressziós szintet figyeltek meg. A fehérjetermelés során 40 μ M IPTG-koncentrációval, 2,7 g/l végső eGFP-koncentrációt értek el, ami magasabb volt, mint a laktóz alapú autoindukció során elért 1,8 g/l eGFP-koncentráció (Faust, Stand, és Weuster-Botz 2015).

Leila Rezaei és munkatársai kutatásaik során antitest fragmensek termeltetésével foglalkoztak *E. coli* baktérium sejtekben. Az antitest fragmensek kiválasztása a tápoldatba növeli a termék tisztaságát és csökkenti a tisztítási folyamatok költségeit. Kutatómunkájuk során *E. coli* BL21 (DE3) sejtvonalat és autoindukciós fermentációs eljárást alkalmaztak, melynek optimalizálása által vizsgálták a fehérje termelés hatékonyságát. Az anti-MUC1 nanotest előállításának növelése érdekében a kutatók az autoindukciós fermentáció során, autoindukciós tápoldatot felhasználva a hőmérséklet, a indukció időtartamának illetve a szénforrás és a glicin koncentrációjának optimalizálásával érték el a legnagyobb mennyiségű nanotestet. Eredményeikben megállapították, hogy a hőmérséklet és az indukálás időtartama esetében a legmagasabb fehérjehozamot 33°C-nál érték el 21 óra alatt (Rezaei és mtsai. 2020).

A rekombináns fehérje expressziós kutatások területén nagy előrelépést jelentett az autoindukciós eljárás felfedezése, mely lehetővé teszi az expresszió megvalósítását a baktérium kultúra növekedésének monitorozása és indukálószer hozzáadása nélkül. Ezen expressziós folyamat egy autoindukciós tápleves alkalmazását tételezi fel melyben glükóz, laktóz és glicerin szén-forrásokat használnak. A glükóz jelenti a baktériumsejtek számára az elsődleges szénforrást, majd a glükóz koncentráció csökkenésével a laktóz jelenlétében a sejtekben aktiválódik a laktóz hasznosításához szükséges útvonal a laktóz bontás érdekében, ezáltal valósul meg a génexpresszió is, a glicerin ezeken kívül egy állandó kiegészítő szénforrásként van jelen a táplevesben (Li és mtsai. 2011).

Az autoindukciós fermentációs eljárást alkalmazva, nagyobb intenzitással valósul meg a baktérium kultúra növekedése ezáltal magasabb sejttömeg érhető el, a rekombináns fehérje expressziója magasabb hozammal valósul meg, a széleskörűen alkalmazott indukálószerként használt izopropil-tiogalaktozidáz hozzáadása nem igényelt így a baktérium kultúra növekedésének monitorozása nem szükséges. A felsorolt előnyök ismeretében az autoindukciós fermentáció alkalmazásával hatékony fehérjeszintézis érhető el idő- és költséghatékony megvalósításban (Studier 2005).

Az autoindukciós módszer nyilvánvaló előnye, hogy az átmenetet az indukálatlan állapotból az indukált állapotba az expressziós gazdaszervezet metabolikus szabályozása alá helyezi. Ez minimálisra csökkenti a tenyészetek szükséges monitorozását az beoltástól a kívánt sejtsűrűség eléréséig. Számos tényező azonban nehezíti az autoindukció használatát. Mivel több szénforrás van jelen az autoindukciós közegben, ezek mennyisége és felhasználási formái fontos szerepet játszanak az autoindukciós expresszió megvalósulásában. Továbbá az optimális használhatóság érdekében az autoindukciós módszernek könnyen végrehajthatónak kell lennie mind a kisméretű, mind a nagyüzemi gyártási folyamatok során és biztosítania kell a korrelációt a különböző működési léptékekben kapott eredmények között. Ez a léptéknövelés olyan fizikai paraméterekből eredő változékonyságot vezet be, mint például a kultúra nevelése során használt különböző típusú edényekhez kapcsolódó levegőztetés mértéke. Valójában korábban megjegyezték, hogy az O₂ elérhetősége befolyásolhatja az autoindukciós kísérletek kimenetelét, de ennek a hatásnak az eredete nem volt világos. Tekintettel a bakteriális fehérje expressziós vizsgálatok fontosságára, fontos, hogy jobban megértsük az autoindukciós megközelítések reprodukálhatóságának és termelékenységének mögöttes metabolikus és fizikai korlátait (Blommel és mtsai. 2008).

1.5. A nattokináz enzim ipari jelentősége

A WHO jelentései szerint, világszerte 17 millió ember veszíti életét évente a szív-érrendszeri betegségek miatt. Az erekben kialakuló trombózis, egy vérrögökből kialakult képződmény, amely legfőbb okozója számos szív-érrendszeri betegségnek. A vérrögöket alkotó fehérjék túlnyomó része a fibrin, mely a fibrinogén enzim működése által jön létre a trombin fehérje hidrolizálásával. A kialakult fibrint a plazmin enzim képes hidrolizálni ezáltal megakadályozva a vérrögök kialakulását. Azokban az esetekben amikor valamilyen hatás miatt a két folyamat egyensúlyában zavar következik be a fibrin hidrolizációja nem történik meg, ezáltal alakulnak ki a vérrögök (Peng és mtsai. 2016). A trombózis súlyos betegség mely veszélyezteti az emberi egészséget valamint más betegségek kialakulásában is szerepet játszhat, mint például a stroke, az agyi- és szívinfarktusok. A trombózis kutatásával egyre több gyógyszert fedeztek fel, a kutatók *in vitro* és *in vivo* is kutatták a terápiás gyógyszerek hatását a trombózis kezelésére (Kamiya és mtsai. 2010).

A nattokináz (tobábbiakban: NK) egy szerin proteáz, melyet a „natto” nevű tradicionális japán ételből vontak ki illetve tisztítottak, az étel, a szójabab *Bacillus subtilis* baktérium fermentációs folyamatai által készül (Weng és mtsai. 2017). 1980-ban Hiroyuki Sumi és

munkatársai felfedezték, hogy a natto képes oldani a mesterséges fibrint, majd izolálták az enzimet. Ezt az enzimet nevezték el „nattokináz”-nak (Sumi és mtsai. 1987). A nattokináz egy fibrinolitikus enzim mely a vérrögök elosztatásában a fibrin és plazmin szubsztátok közvetlen hidrolizálásával, az endogén prourokinázt urokinázzá alakítja, lebontja a plazminogén aktiváló inhibitor-1 –et, és növeli a szöveti plazminogén aktivátor szintjét amely elősegíti a fibrinolitikus aktivitást. Az enzim egy biztonságos, erőteljes, alacsony költségű és természetes étrendkiegészítő a szív- és érrendszeri megbetegedések kezelésére. Állati illetve emberi kísérletek együttesen is alátámasztották, hogy a NK támogatja a keringési rendszer működését a vér hígításával és a vérrögök felosztatásával (Weng és mtsai. 2017).

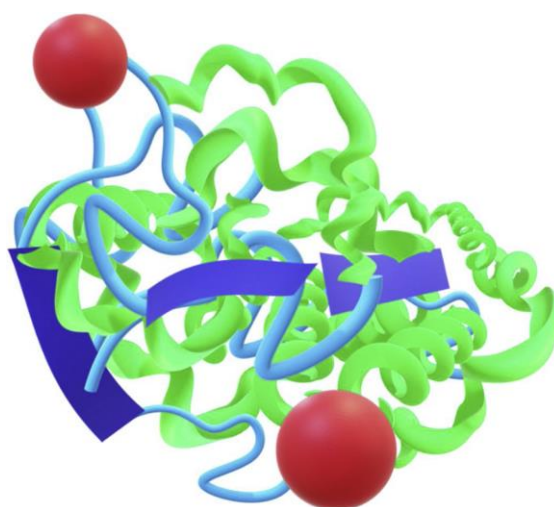
A nattokináznak más fibrinolitikus enzimekkel szemben nincsen mellékhatása és hosszú élettartamú ezért felhasználása mint gyógyszer egy lehetséges megoldás a szív-érrendszeri megbetegedések kezelésére illetve, szolgálhat funkcionális élelmiszer adalékanyagként is. Mint funkcionális élelmiszer adalékanyag a nattokináz élelmiszerbiztonsági és gazdaságos előnyöket mutat a hosszútávú hatékonysággal együtt. A nattokináz hozzáadása csökkenti a vér viszkozitását és a II plazma koncentrációját, ami előnyös a trombózisos betegségek megelőzésére és kezelésére. A NT enzimet innovatív módon is alkalmazták bevonva orvosi anyaggal, mely egy biofunkcionális nattokináz-nanoezüst-polietilénimin komplexből lett megtervezve, hatékony antitrombozisos és antimikrobiális aktivitással (Cai, Zhu, és Chen 2017).

1.5.1. Az enzim szerkezete és tulajdonságai

A szerin proteázokhoz tartozó fibrinolitikus enzimek általában semleges és bázikus pH értékeken aktívak, optimális pH értékeik pH 8.0 és pH 10.0 között vannak. Molekulasúlyuk 27.7 és 44 kDa között található és izoelektromos pontjuk pH 8.0 körüli értéken található. Az optimális hőmérsékletük széles tartományt képez 30 °C-tól 70 °C-ig, a leggyakoribb optimális hőmérsékleti értékek 50 °C körüliek. A *Bacillus* eredetű subtilizin enzimek ugyanazzal a katalitikus triáddal rendelkeznek (Ser221, His64, Asp32) és nem tartalmaznak intramolekuláris diszulfid hidakat. Fibrinolitikus aktivitásuk a fenil-metil-szulfonil fluorid, diizopropil-fluorofoszfát vagy az E-64 által irreverzibilisen gátolható. A *Bacillus* fajokból származó fibrinolitikus enzimek aktivitását a kelátképző ágensek (EDTA) inhibálják (Peng és mtsai. 2016).

Az NK enzim egy szerin proteáz, mely 275 aminosavból épül fel, izoelektromos pontja megközelítőleg $pI = 8,6$. Egyetlen láncból álló polipeptid melynek molekulásúlya 27,7 kDa, tartalmaz nyolc lizint és nem tartalmaz ciszteint. Az erőteljes trombolitikus hatást ezzel az egyedi molekuláris struktúrával hozzák összefüggésbe. Összehasonlítva más trombolitikus

enzimekkel mint például az urokinázzal amelyben az két diszulfid struktúra molekuláris blokkot jelentenek, a NK az egyetlen radiális szerkezettel rendelkező enzim a trombolitikus molekulák között. A NK 3D-s szerkezete hét darab α -hélixet, kilenc darab β -redőt és két Ca^{2+} -kötő helyet tartalmaz. Az enzim aktív központja a hidrogén kötésekkel kapcsolódó katalitikus triád: Asp32, His64, Ser221, oxigén ion rés (Asn155), és a szubsztrát kötő hely (Ser125, Leu126, Gly127), melyek a globuláris nattokináz felületén helyezkednek el. A NK S3 hely (Gly100, Ser101, Leu126) a kulcshelye a legfontosabb szubsztrát specificitásnak (Zhou, Liu, és Zeng 2021). A NK szerkezete látható az 1. ábrán.



1. ábra: A nattokináz szerkezete (Zhou, Liu, és Zeng 2021)

1.5.2. A NK előállításának kutatása *E. coli*-ban

He Ni és munkatársai a *Bacillus subtilis* ssp. *natto* törzsből izolálták a NK génjét majd a teljes hosszúságú és az érett gént is a pQE30 vektor segítségével expresszálták az *E. coli* sejtekben. Kutatásuk alapján az *E. coli* BL21 (DE3) baktériumtörzsben expresszált NK esetében a teljes hosszúságban integrált génről kifejeződő enzim aktivitása alacsonyabb mértékű volt mint az érett génről kifejeződő enzim aktivitása, viszont az utóbbi géntermék nagyrésze zárványtestekben képződött. A magas expressziós szintet mutató, ugyanakkor zárványtestek formájában képződött enzim renaturálása nehezen valósítható meg. A szekréción expresszió ajánlott mint hatékony folyamat a zárványtest képződés megelőzésére és az aktív fehérje termelésére. Két különböző szignálpeptid segítségével, a nattokináz natív szignálpeptidje és a PelB szignálpeptidje, az aktív nattokináz sikeresen expresszáldott *E. coli*-ban periplazmatikus szekréciónal, de a fibrinolitikus aktivitás sokkal alacsonyabb volt, mint a természetes nattokinázé *Bacillus subtilis*-ben (Ni és mtsai. 2016).

1.6. Zárványtestek képződése

Az inklúziós testeket vagy más néven zárvány testeket eredetileg a baktériumok salakanyagának tartották egészen addig, amíg rá nem jöttek, hogy ezek a sejt képződmények hajlamosak a sejtek stresszreakciójaként képződni, ami biológiailag inaktív fehérjét eredményez. Ezeket a stresszreakciókat kiválthatja a magas hőmérséklet, a pH eltolódás, vagy a magas táplálási arány, ugyanakkor ezek a hatások egyes esetekben a magas termékhozamot is előidézhetik. Ez a megközelítés előnyben részesíthetné a zárványtestek képződésének növelését ugyanakkor számolni kell a toxikus fehérjék termelődésének lehetőségével is. A zárványtest képződés esetén a kinyerési folyamatok során a zárványtestek feltárása és a fehérjék újraterjedésének elvégzése időigényes és több technológiai lépést igénylő folyamat (Slouka és mtsai. 2019).

A zárványtestek képződésének egyik oka a fehérjék helytelen feltekeredése a szintézis során. A fehérjék a sejtekben a riboszómáknak nevezett sejtalkotókon szintetizálódnak, majd a sejt belsejében történik meg a fehérjék feltekeredése (foldingja). A feltekeredés egy önálló folyamat amely során a fehérjék az aminosav szekvenciájukból átalakulva elnyerik natív, funkcióképes szerkezetüket. A fehérjék feltekeredésének szemléltetésére a szekvencia alapú modell illetve a folding tölcsér alapú modell vált elfogadottá. Az utóbbi modell egy energia mezőt és egy folding tölcsért helyez a folyamat középpontjába, míg a szekvencia alapú modell egy kinetikai versenyt ír le helyesen feltekeredett állapot és az egyéb reakciók között, amelyek nem feltekeredett részeket és aggregátumokba rendeződött részeket eredményeznek (Naidoo 2011).

2. Célkitűzés

Kutatásunk fő célkitűzése a *B. subtilis* baktériumtörzsből származó nattokináz enzim génjének *E. coli* expressziós rendszerben való előállítása.

A rekombináns NK bioszintézisének feltétele három olyan célkitűzés meghatározása, melyek időrendi megvalósítása hozzájárul a fő célkitűzés kivitelezéséhez:

- Célkitűzésünk a rekombináns konstrukció megtervezése *in silico*: a NK gén *E. coli* sejtekbe történő inkadrációjához a NK gén DNS szekvenciája, illetve a pET20b vektor felhasználásával.
- A *B. subtilis* genomiális DNS- ből történő NK gén izolálása.
- A molekuláris klónozást követően a rekombináns konstrukciókat transzformálva *E. coli* expressziós sejtvonalakba vizsgáljuk a NK enzim bioszintézisét különböző körülmények között.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A nattokináz enzim génjének izolálásához szükséges oligonukleotid-, illetve a rekombináns konstrukció tervezése

A *Bacillus subtilis* baktériumból származó nattokináz gén bejuttatásához *Escherichia coli* baktériumsejtbe olyan rekombináns konstrukciót kellett terveznünk, mely lehetővé teszi a célgén rekombináns technikával történő bioszintézisét. A célgén *B. subtilis* genomi DNS-éből való izoláláshoz, illetve az *E. coli* sejtekbe való bejuttatásához, szükségünk volt a nattokináz génjének szekvenciájára, melyet az NCBI adatbázisban kerestünk meg. A pET20b plazmid (Thermo Scientific) szekvenciát és a NK (1. függelék) gén szekvenciát felhasználva, az NdeI és az XhoI restriktációs hasítóhelyeket kiválasztva terveztük meg a nattokináz (NK) enzim génjének izolálásához szükséges oligonukleotidokat. A rekombináns konstrukció tervezése során online szoftverek segítségével szimulációt végeztünk az átíródo szekvencia helyességéről, megfelelő leolvasási keretbe való inkadrációjáról, továbbá jellemeztük a keletkező rekombináns enzim fiziko-kémiai tulajdonságait.

3.2. Genomi DNS izolálása *Bacillus subtilis* törzsekből

A genomi DNS izoláláshoz, a Sapientia EMTE törzsgyűjteményéből származó, három *B. subtilis* törzset (*Bacillus subtilis* SZC102B, *Bacillus subtilis* SZX102, *Bacillus subtilis* SZC101A) nutrient tápoldatban (1.táblázat) neveltünk, 28 °C hőmérsékleten, 150 rpm rázatósi sebesség mellett, 24 órát. A populációdinamikai adatokat sejtsűrűség méréssel határoztuk meg, spektrofotometriás eljárással, 600 nm hullámhosszon mérve, az első tíz órában óránkénti méréssel, majd a növekedés tizedik órája után a 22. óráig két óránkénti méréssel. A populációdinamikai adatok alapján meghatároztuk a növekedés exponenciális fázisának időtartamát, a DNS izolálás hatékonyságának növelése érdekében.

1. táblázat: A nutrient tápoldat összetevői 1 L térfogatra

Összetevő	Mennyiség
Pepton	5 g
Élesztőkivonat	2 g
NaCl	5 g
Húskivonat	1 g

A genomi DNS izolálásához a GenElute- Bacterial Genomic DNA Kit-et (Sigma-Aldrich) használtuk. Első lépésként 5 mL *B. subtilis* baktériumkultúrát centrifugáltunk (Thermo

Scientific SL 40R Centrifuge) 14000 rpm-en, 2 percig, majd a felülúszót lepipettáztuk és a pelletet 200 µL lizozim oldatban felszuszpendáltuk. 37 °C -on inkubáltuk az elegyet 30 percig.

Az inkubálás után 20 µL RN-ázt tartalmazó oldatot adtunk hozzá, majd ismét inkubáltuk 2 percig szobahőmérsékleten (RT). A mintákhoz hozzáadtunk 200 µL lízis C oldatot, majd 20 µL proteináz K oldatot, vortexeltük és 55 °C-on inkubáltuk 10 percig. A membránszűrővel ellátott oszlopokra 500 µL előkészítő oldatot pipettáztunk és 12000 rpm-en centrifugáltuk 1 percig. Ezt követően 200 µL etanolt adtunk a lizátumhoz és vortexeltük. A mintákat az oszlopok közepére pipettáztuk, majd 6500 rpm-en centrifugáltuk 1 percig, ezt követően az oszlopokat új centrifuga csövekbe helyeztük át, majd 500 µL mosó oldatot pipettáztunk rá és 6500 rpm-en centrifugáltuk 1 percig. A koncentrált mosó oldathoz előzőleg etanolt adtunk, majd ebből 500 µL-t pipettáztunk az oszlopokra és 16000 rpm-en centrifugáltuk 3 percig. Az etanolt eltávolításának érdekében az üres oszlopot is centrifugáltuk 16000 rpm-en 1 percig. Az oszlopokat ismét új centrifugacsövekbe helyeztük, majd 200 µL eluáló oldatot pipettáztunk az oszlopokra, 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a hatékonyság növelés érdekében, majd 6500 rpm-en centrifugáltuk 1 percig. A DNS izolálás hozamának növelése érdekében az előző lépést megismételtük, majd az izolált DNS-t -20 °C hőmérsékleten tároltuk

A DNS izolálás sikerességének ellenőrzését agaróz-gélelektroforézis alkalmazásával végeztük. A gélfuttatáshoz 0,6 %-os agaróz tartalmú gél és 50 x-es TAE pufferből (2. táblázat) hígított 1x es TAE puffert használtunk. A gélfuttatást 80 V-on végeztük 30 percig. A detektálható sávok méretének meghatározásához a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 0,1 µg/µL (Thermo Scientific) DNS markert használtuk.

2. táblázat: 50x-es TAE puffer komponensei 1 L térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
Tris base	-	242 g
Jégecetsav	99,7%	57,1 mL
EDTA	0,5 M	100 mL
dH ₂ O	-	1000 mL-ig

3.3. A nattokináz enzim génjének izolálása és a gén felsokszorozítása

A genomi DNS izolálást követően, *B. subtilis* törzsekből, az izolált DNS-t és a megtervezett oligonukleidokat felhasználva, PCR reakciót (ESCO Swift-Mini Pro) alkalmazva izoláltuk és szaporítottuk fel a NK enzim génjét. A reakció komponenseit az 3. táblázat

3. táblázat: A NK enzim génjének izolálásához alkalmazott PCR reakció komponensei

50 μ L térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
PCR Bio reakció puffer	5x	10 μ L
Forward primer	10 μ M	2 μ L
Reverse primer	10 μ M	2 μ L
DNS	-	1 μ L
PCR Bio HIFI polimeráz	2 U/ μ L	0,5 μ L
PCR tisztaságú H ₂ O	-	34,5 μ L

tartalmazza.

A reakció körülményeit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A PCR reakció körülményei

Ciklus	Hőmérséklet	Időtartam
1	95 °C	4 perc
30	95 °C	15 másodperc
	48 °C	30 másodperc
	72 °C	30 másodperc
1	72 °C	7 perc

A PCR reakció sikerességének ellenőrzését agaróz-gélelektroforézis alkalmazásával végeztük. A gélfuttatáshoz 1,5 %-os agaróz tartalmú gélrt használtunk. A gélfuttatást 80 V-on végeztük 30 percig. A detektálható sávok méretének meghatározásához a GeneRuler 100 bp DNA Ladder 0,5 μ g/ μ L (Fermentas) DNS markert használtuk.

3.4. A rekombináns konstrukció *in vitro* létrehozása

A rekombináns konstrukció létrehozása során a pET20b vektorba integráltuk a NK gént. A gén bejuttatásához a vektorba, a gén izolálás során kapott PCR (1. függelék) termékeket és a vektort is emésztettük az oligonukleotidok tervezésénél figyelembe vett restriktációs endonukleázokkal, melyek esetünkben az NdeI és az XhoI (Thermo Scientific) enzimek voltak. A restriktációs enzimekkel történő emésztés előtt a PCR termékeket tisztítottuk, annak érdekében, hogy a PCR reakció komponensei ne befolyásolják a további folyamatokat. A

tisztításhoz a GeneJet PCR Purification Kit 100 bp-10 kb DNA (Thermo Scientific) kitet alkalmaztuk. A folyamat során a PCR termékekhez 1:1 arányban (45-45 µL) Binding puffert adtunk, felfuszpendáltuk, majd ellenőriztük, hogy sárga színű elegyet kaptunk (jelzi a megfelelő pH-t). A mintákat membránszűrővel ellátott oszlopokra pipettáztuk és centrifugáltuk 14000 rpm-en 1 percig. Ezt követően 700 µL Wash puffert pipettáztunk az oszlopokra és centrifugáltuk 14000 rpm-en 1 percig. Az oszlopokat üresen ismét centrifugáltuk 14000 rpm-en 1 percig, majd 1,5 mL-es centrifugatubusokba helyeztük őket. Az oszlopokra pipettáztunk 30 µL Elution puffert, inkubáltuk a mintákat 5 percig szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk 14000 rpm-en 1 percig. A tisztított PCR termékeket -20 °C hőmérsékleten tároltuk a felhasználásig.

A NK enzim génjét tartalmazó rekombináns konstrukció *in vitro* létrehozása során a ligálás érdekében a vektor és a célgén DNS szekvenciáin tapadós végeket hoztunk létre. A tapadós végek létrehozását restriktációs endonukleázokkal történő emésztéssel valósítottuk meg. A PCR termékek és a vektor esetében is az NdeI és az XhoI (Thermo Scientific) enzimekkel külön-külön végeztük az emésztést. A két egymást követő emésztés között a termékeket tisztítottuk a fentiekben leírt protokoll alapján a GeneJet PCR Purification Kit 100 bp-10 kb DNA (Thermo Scientific) kittel. Az emésztéseket követően a DNS (1. függelék) szekvenciákat agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (1,5 % -os, 80 V, 30 perc) és a vektort gélből izoláltuk az első és második emésztést követően is GeneJet Gel (Thermo Scientific) kittel. A gélből történő izoláláshoz analitikai mérlegen lemértünk egy 1,5 mL-es centrifugatubust, majd a gélből egy penge segítségével óvatosan kivágtuk a szekvenciát tartalmazó gél, áthelyeztük a centrifugatubusba és a géllal együtt is lemértük, hogy meghatározzuk a kivágott gél tömegét. A tömeg meghatározása után 1:1 arányban (1 mg:1 µL) Binding puffert adtunk a gélhez, majd 60 °C -on inkubáltuk 10 percig (felolvasásig), a tubus percenkénti átforgatásával. A membránszűrővel ellátott oszlopra pipettáztuk az elegyet és centrifugáltuk 14000 rpm-en 1 percig. Ezt követően hozzáadtunk 700 µL Wash puffert, centrifugáltuk 14000 rpm-en 1 percig, majd a centrifugálást megismételtük az üres oszloppal. Az oszlopot új centrifugatubusba helyeztük, majd 30 µL Elution puffert pipettáztunk az oszlopra, 5 percet inkubáltuk szobahőmérsékleten, és centrifugáltuk 14000 rpm-en 1 percig.

Az emésztésekhez alkalmazott reakciókomponensek láthaóak az 5. táblázatban.

5. táblázat: A restrikciós emésztések reakció komponensei 20 µL térfogatra

Reakció	Összetevők	Koncentráció	Mennyiség
NdeI	O puffer	10 x	2 µL
	plazmid/ PCR termék	-	5 µL
	enzim	10 U/µL	1 µL
	usp H ₂ O	-	12 µL
XhoI	R puffer	10 x	2 µL
	plazmid/ PCR termék	-	5 µL
	enzim	10 U/µL	1 µL
	usp H ₂ O	-	12 µL

Az restrikciós emésztések reakció időtartama 1 óra, 37 °C-on, majd ezt követően inaktiválás érdekében 20 perc, 65 °C-on.

A NK enzim bioszintéziséhez szükséges rekombináns konstrukciót az emésztett gén szekvencia és az emésztett vektor ligálási reakciójával hoztuk létre. A ligálást T4 DNS ligáz enzim (Thermo Scientific) segítségével valósítottuk meg. A ligálási reakcióhoz a vektor és az inszert DNS koncentrációjának megfelelően, 1:1, 1:3, 1:5 arányban adtuk a reakcióhoz a szekvenciákat, 20 µL reakció térfogatban. A ligálási reakció komponenseit tartalmazza a 6. táblázat.

6. táblázat: A ligálási reakció komponensei 20 µL térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
lineáris vektor	1,405 ng/µL	
inszert	3,413 ng/µL; 5,186 ng/µL; 4,53 ng/µL	1:1; 1:3; 1:5
DNA ligáz puffer	10 x	2 µL
T4 DNA ligáz enzim	5 U/µL	1 µL
nukleáz mentes H ₂ O	-	20 µL-ig

A ligálási reakciót O.N. (overnight) inkubáltuk, 22 °C hőmérsékleten, ezt követően transzformáltuk a ligálási terméket *E. coli* NEB 10, *E. coli* BL21 (DE3) Star, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta sejtvonalakból létrehozott baktériumkultúrákba.

3.5. A célgént tartalmazó plazmid transzformálása *Escherichia coli* baktériumsejtekbe

A rekombináns konstrukció létrehozását követően a bioszintézis megvalósításához a NK enzim génjét tartalmazó pET20b plazmidot *E. coli* NEB 10 klónozó sejtvonalba transzformáltuk. A transzfomációt megelőzően kémiai kompetens sejteket hoztunk létre. A kompetens sejtek létrehozása során 150 mL *E. coli* NEB 10 sejt kultúrát neveltünk LB (1. függelék) tápoldatban, 37 °C inkubálási hőmérsékleten, 250 rpm rázatási sebességgel, OD₆₀₀=0,4 sejtsűrűségig. A sejt kultúrát jégen inkubáltuk 20 percig, majd centrifugáltuk 5000 rpm-en, 4°C-on, 5 percig. A pellethez hozzáadtunk 10 mL jég hideg 0,1 M CaCl oldatot és felszuszpendáltuk, majd centrifugáltuk 5000 rpm-en, 4 °C-on, 5 percig. A centrifugálás után a pellethez ismét hozzáadtunk 2 mL jég hideg 0,1 M CaCl oldatot és felszuszpendáltuk, inkubáltuk 20 percet jégen, majd hozzáadtunk 500 µL 80%-os steril glicerint. A létrehozott kémiai kompetens sejteket a transzformálásig -80 °C hőmérsékleten tároltuk.

A ligálási reakció termékeit hősokk alkalmazásával transzformáltuk az *E. coli* BL21 (DE3) sejtekbe. A transzformálás első lépéseként 100 µL kémiai kompetens sejt kultúrához adtunk 1 µL ligálási terméket, majd 30 percet inkubáltuk jégen. Ezt követően hősokkot alkalmaztunk 42 °C-on 90 másodpercig és újra inkubáltuk jégen 10 percet. A sejtekhez hozzáadtunk 900 µL LB tápoldatot és inkubáltuk 1 órát 37 °C-on, 250 rpm rázatási sebességgel. Az inkubálás után a sejteket centrifugáltuk 3500 rpm-en 3 percig. A felülúszót óvatosan lepipettáztuk, a pelletet felszuszpendáltuk 100 µL LB tápoldatban. A ligálási reakció sikerességének ellenőrzéséhez a transzformált sejteket tartalmazó sejt kultúrát 100 mg/mL Ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettük, 24 órát inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten és az inkubálási idő elteltével megjelenő baktériumtelepeket ellenőriztük kolónia PCR reakcióval. A kolónia PCR reakció komponensei 50 µL térfogatra a 7. táblázatban láthatóak.

7. táblázat: A kolónia PCR reakció komponensei 50 µL térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
MgSO ₄ tartalmú puffer	10 x	5 µL
Forward primer	10 µM	2 µL
Reverse primer	10 µM	2 µL
MgCl ₂	25 mM	4 µL
Taq polimeráz	5 U/µL	0,3 µL
dNTP mix	10 mM	2 µL
PCR tisztaságú H ₂ O	-	33,7 µL
DNS	-	1 telep

A 8. táblázatban láthatóak a kolónia PCR reakció körülményei.

8. táblázat: A kolónia PCR reakció körülményei

Ciklus	Hőmérséklet	Időtartam
1	94 °C	5 min
35	94 °C	15 sec
	53 °C	30 sec
	72 °C	80 sec
1	72 °C	7 min

A PCR reakció sikerességének ellenőrzését agaróz-gélelektroforézis alkalmazásával végeztük. A gélfuttatáshoz 1 %-os agaróz tartalmú gélt használtunk. A gélfuttatást 80 V-on 30 percig végeztük. A detektálható sávok méretének meghatározásához a GeneRuler 1 kb DNA Ladder 0,1 µg/µL (Thermo Scientific) DNS markert használtuk.

A kolónia PCR eredményéből megfelelőnek bizonyuló telepekből O.N. szubmerz baktériumkultúrát neveltünk és ebből plazmid izolálást végeztünk a ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research) plazmid izoláló kittel. A plazmid izoláláshoz 5 mL O.N. kultúrát centrifugáltunk 12000 rpm-en 3 percig, majd a pellethez hozzáadtunk 200 µL P1 puffert, felszuszpendáltuk és vortexeltük. A mintához hozzáadtunk 200 µL P2 puffert és 2 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a tubusok átforgatásával. Ezt követően hozzáadtunk az elegyhez 400 µL P3 puffert majd ismét 2 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a tubusok átforgatásával. A mintákat centrifugáltuk 13000 rpm-en 4 percig, majd a felülúszót membránszűrővel ellátott oszlopokra pipettáztuk és centrifugáltuk 13000 rpm-en 30 másodpercig. A centrifugálás után 200 µL Endo-Wash puffert pipettáztunk az oszlopra, majd centrifugáltuk 12000 rpm-en 30 másodpercig. Ezt követően 400 µL Plasmid-Wash puffert pipettáztunk az oszlopra és centrifugáltuk 12000 rpm-en 1 percig. A puffer teljes mennyiségének eltávolítása céljából centrifugáltuk az oszlopot üresen is 12000 rpm-en 2 percig. Az oszlopot 1,5 mL-es centrifugatubusba helyeztük, majd 50 µL DNA Elution puffert pipettáztunk rá, inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percig és centrifugáltuk 13000 rpm-en 1 percig.

A plazmid izolálás eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A gélfuttatáshoz 1 %-os agaróz tartalmú gélt használtunk. A gélfuttatást 80 V feszültség alkalmazásával végeztük 30 percig. A detektálható sávok méretének meghatározásához a GeneRuler 1 kb DNA Ladder 0,1 µg/µL (Thermo Scientific) DNS markert használtuk.

3.6. A nattokináz enzim bioszintézise

A plazmid izolálást és ellenőrzést követően a bioszintézishez megfelelő plazmidokat expressziós *E. coli* sejtvonalakba transzformáltuk hősokk alkalmazásával a fent említett protokoll alapján. Az alkalmazott sejtvonalak: *E. coli* BL21 (DE3) Star, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta.

Az expressziót 100 mL LB tápoldatban (9. táblázat), szubmerz baktériumkultúrával, rázatott inkubálással végeztük, az indukciótól számítva négy órán át. A plazmidokat tartalmazó baktériumkultúrákból neveltünk O.N. baktériumkultúrát 37 °C hőmérsékleten, 250 rpm rázatósi sebességgel. Az O.N. kultúrákból 100 mL, 100 mg/mL ampicillin tartalmú LB tápoldatba oltottunk át, a sejtsűrűséget $OD_{600}=0,2$ értékre állítva. $OD_{600}=0,7$ sejtsűrűségnél adtuk hozzá az IPTG-t a tenyészetekhez, az expresszió megkezdésének indukálásához. A fehérjetermelés során a három különböző sejtvonalat (*E. coli* BL21 (DE3) Star, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta) és két IPTG koncentrációt (1 mM és 0,1 mM) alkalmaztunk.

9. táblázat: LB tápoldat összetevői 1 L térfogatra

Összetevő	Mennyiség
Pepton	10 g
Élesztő kivonat	5 g
NaCl	5 g

3.7. Az enzim feltárása és a bioszintézis hatékonyságának vizsgálata

Az expressziót követően a sejttenyészeteket centrifugáltuk 5000 rpm-en, 4 °C-on, 10 percig. A pelleteket az expresszió végén mért sejtsűrűségnek megfelelő mennyiségű lízis pufferben ($OD_{600}=1$: 1mL) felszuszpendáltuk, majd 3×5 percig végeztünk szonikálást a mintákon 70 amplitúdó és 0,5 ciklus körülmény mellett. A lízis puffer komponensei láthatóak a 10. táblázatban.

10. táblázat: A lízis puffer komponensei 200 mL térfogatra

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	50 mM	1,78 g
NaCl	300 mM	3,5 g
Imidazol	20 mM	0,27 g
DTT	2 mM	0,0617 g
Triton x 100	1%	2 mL
Lizozim	0,1 mg/mL	0,02 g

A szonikálás után centrifugáltuk a mintákat 20000 rpm-en 20 percig, 4 °C hőmérsékleten, majd a felülúszót és a pelletet külön tároltuk.

A fehérjetermelés ellenőrzését SDS PAGE alkalmazásával végeztük. Az expresszió során óránként-, illetve az expresszió végén vett mintákkal végeztük a gélelektroforézist. A szonikálás után a mintákat centrifugáltuk 18000 rpm-en 20 percig, 4 °C-on, majd 50 µL felülúszóhoz adtunk 10 µL minta előkészítő festéket és a mintákat inkubáltuk 98 °C hőmérsékleten 5 percig. Ezt követően centrifugáltuk a mintákat 18000 rpm-en 3 percig és a felülúszóból vittünk fel a gélre 7-7 µL mintát.

A minták előkészítését követően 12 % akrilamid tartalmú gélen végeztünk elektroforézist. A szeparáló és koncentráló gél összetevői láthatóak a 11. táblázatban.

11. táblázat: Az SDS PAGE-hez alkalmazott gél komponensei

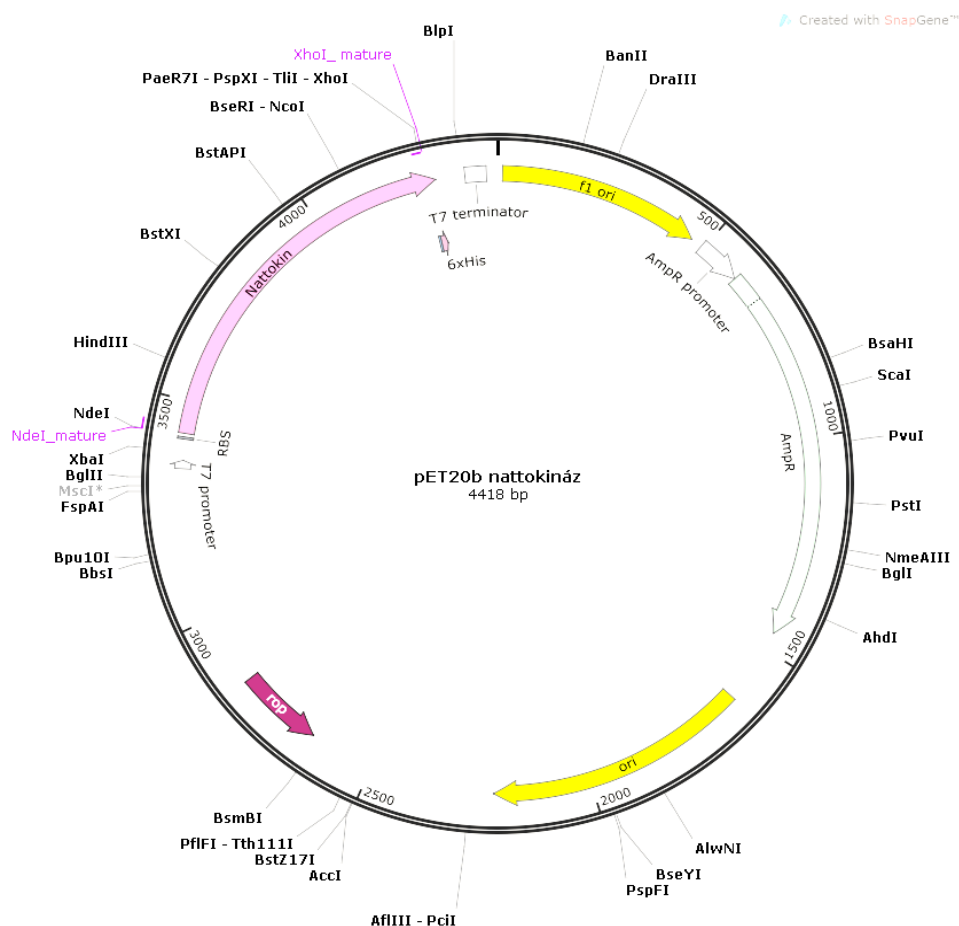
	Összetevő	Mennyiség
Szeparáló gél	H ₂ O	4 mL
	40% Acrilamid	3 mL
	1,5 M Tris-HCl	2,5 mL
	10% SDS	100 µL
	TEMED	10 µL
	10% APS	100 µL
Koncentráló gél	H ₂ O	6 mL
	40% Acrilamid	1,3 mL
	0,5 M Tris-HCl	2,5 mL
	10% SDS	100 µL
	TEMED	10 µL
	10% APS	100 µL

Az elektroforézist a felső gél esetében 80 V feszültség alkalmazásával 30 percig, majd a minták koncentrálódása után 120 V feszültség alkalmazásával 90 percig végeztük. A méret szerinti meghatározáshoz az elektroforézis során a Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) molekulasúly markert használtuk.

4. Eredmények

4.1. Génizoláláshoz szükséges oligonukleotidok és rekombináns konstrukció tervezése

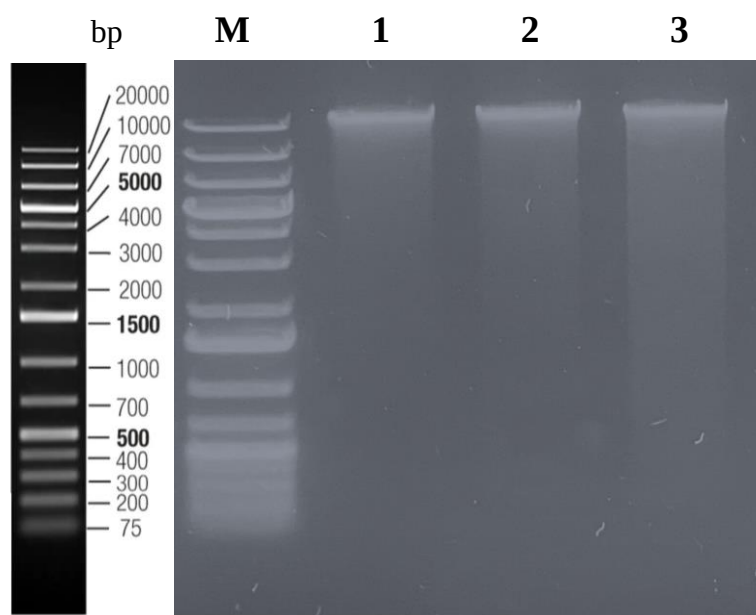
A rekombináns NK enzim bioszintézisének megvalósítása érdekében a *B. subtilis* törzsből izolált NK gént molekuláris biológiai eszközök révén olyan expressziós vektorba integráltuk (pET20b), amelynek megfelelő gazdatörzsbe (*E. coli*) való transzformációjával a célgén kifejeződése indukálható. A génizoláláshoz szükséges oligonukleotid szekvenciákat az NK gén és a pET20b plazmid szekvencia felhasználásával terveztük meg, a SnapGene szoftver segítségével. A 2. ábra tartalmazza a tervezett rekombináns vektor térképét (pET20b_NK): NK gén, ampicillin rezisztenciáért felelős gént, illetve a génexpresszió szabályozásához szükséges szekvenciákat tartalmazó rekombináns konstrukció látható a 2. ábrán.



2. ábra: A rekombináns konstrukció tervezésének eredménye in silico

4.2. Genomiális DNS izolálás *Bacillus subtilis* törzsekből

A rekombináns konstrukció létrehozása során alkalmazott inszert (NK gén) előkészítésének feltételeként genomiális DNS-t izoláltunk *Bacillus subtilis* törzsekből. A DNS izolálást három *Bacillus subtilis* törzsből végeztük, amelyeket a Sapientia EMTE Csíkszeredai Karának Biomérnöki Tanszéke bocsájtott rendelkezésünkre, az egyetem törzsgyűjteményéből. A genomi DNS izolálásának sikerességét agaróz gélelektroforézissel végeztük 0,6 %-s gélen. A gélképen (3. ábra) detektálható sávok a genomiális DNS izolálás sikerességét támasztják alá.

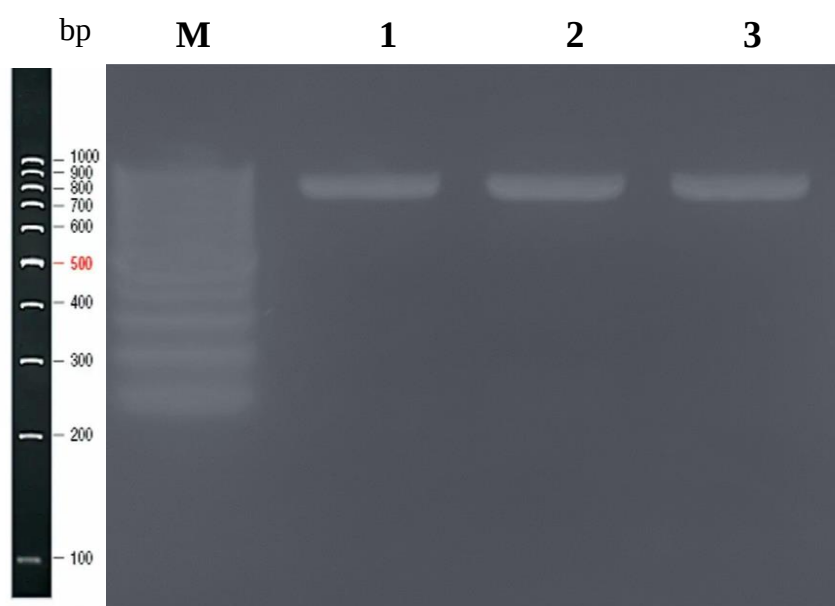


3. ábra: A genomiális DNS izolálás ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

(M: molekulasúly marker-GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 5 µL; 1: *B. subtilis* SZC102B genomiális DNS, 10 µL; 2: *B. subtilis* SZC101A genomiális DNS, 10 µL; 3: *B. subtilis* SZX102 genomiális DNS, 10 µL)

4.3. A NK gén amplifikációja a genomiális DNS-ről

A NK enzim génjének izolálását a genomi DNS-ből PCR reakció alkalmazásával végeztük. A célgén amplifikáció sikerességét 1,5 %-os agaróz gélen ellenőriztük. A 4. ábrán látható a gélfuttatás eredménye. A gélképen detektálható sávok molekulásúly markerrel való összehasonlítása során megállapítható, hogy a PCR reakció során alkalmazott oligonukleotidok megfelelőek a célgén genomiális DNS-ből való kinyeréséhez. A detektált sávok mérete (842bp) igazolja, hogy a NK enzim génjének izolálása a *B. subtilis* törzsekből sikeresen megvalósult.



4. ábra: A PCR reakció ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

(M: molekulásúly marker-GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), 5 µL;
1: *B. subtilis* SZC102B-NK gén, 5 µL; 2: *B. subtilis* SZX102-NK gén, 5 µL; 3: *B. subtilis* SZC101A-NK gén, 5 µL)

4.4. A rekombináns konstrukció *in vitro* létrehozása

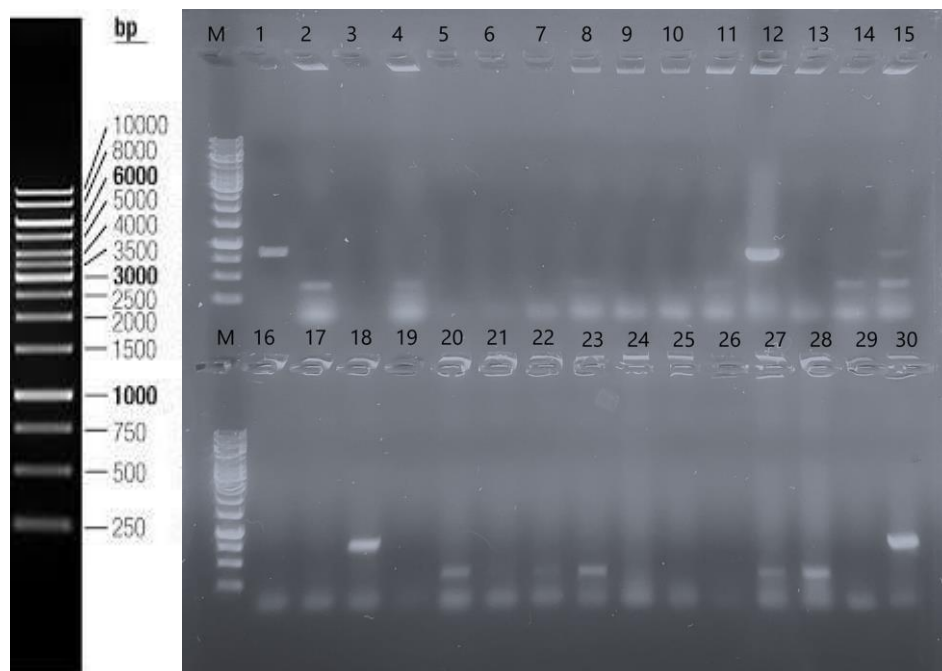
A rekombináns konstrukció létrehozását a NK génjét tartalmazó emésztett inszert és a linearizált (emésztett) pET20b vektor ligálásával valósítottuk meg. A ligálási reakcióhoz a T4 DNS ligázt alkalmaztuk. A ligálás ellenőrzéséhez a reakció termékeket transzformáltuk *E. coli* NEB 10 sejtekbe. A transzformálást követően a sejteket az antibiotikum rezisztencián alapuló

szelekcióhoz 100 mg/mL ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettük és 37 °C-on inkubáltuk O.N., amely az 5. ábrán látható.



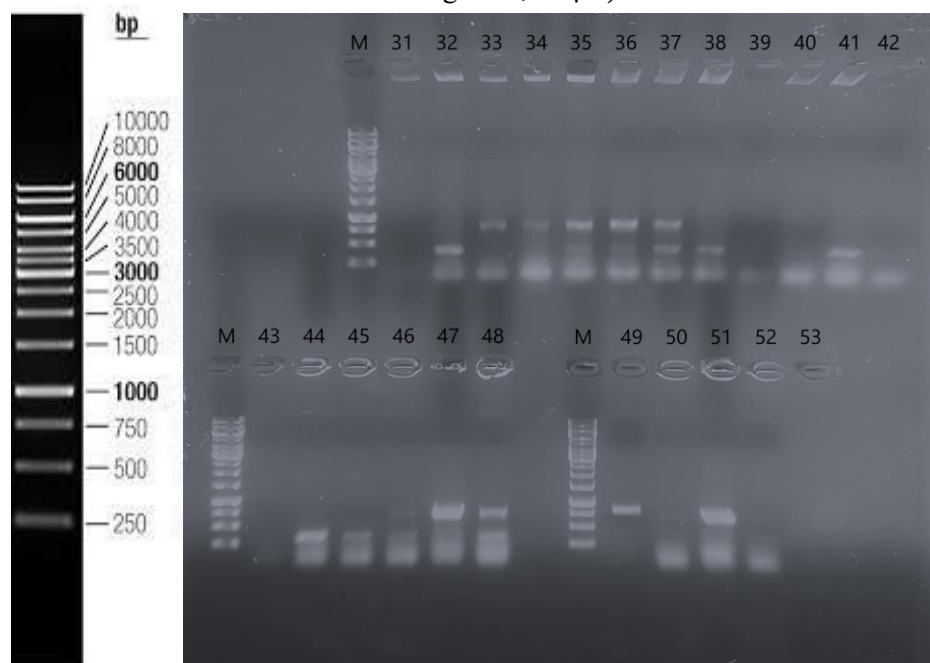
5. ábra: A ligálás ellenőrzésének eredményeként kinőtt baktériumtelepek

A célgén meglétének igazolásához a baktériumtelepekre kolónia PCR-t végeztünk. A kolónia PCR eredményeként pozitívnak bizonyuló telepekből folytattuk a későbbiekben a vizsgálatokat. A kolónia PCR eredményét elektroforézissel ellenőriztük 1 %-os agaróz gélen. A gélfuttatás eredménye látható a 6. ábrán illetve a 7. ábrán. A baktériumtelpekből amelyekből a minták származtak szubmerz baktériumkultúrákat neveltünk, majd plazmidizolálással és a plazmidizolálás ellenőrzésével végeztünk megerősítő vizsgálatot. A megerősítő vizsgálatok eredményeképpen 5 plazmidot választottunk ki amelyek tartalmazták a NK enzim génjét és alkalmasak voltak a transzformálásra. A gélképeken detektálható sávok méretének azonosítása alapján a 12, 18, 30, 47 és 51-es minta felelt meg a NK gén méretének (842 bp).



6. ábra: A kolónia PCR ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

(M: molekulásúly marker- (Thermo Scientific), 5 µL; 1: *B. subtilis*-ből származó PCR termék, 5 µL; 12: 1:3 arányú ligálási termék *B. subtilis* SZC102B-ből származó NK génnel, 10 µL; 18: 1:5 arányú ligálási termék *B. subtilis* SZC102B-ből származó NK génnel, 10 µL; 30: 1:1 arányú ligálási termék *B. subtilis* SZX102-ből származó NK génnel, 10 µL)



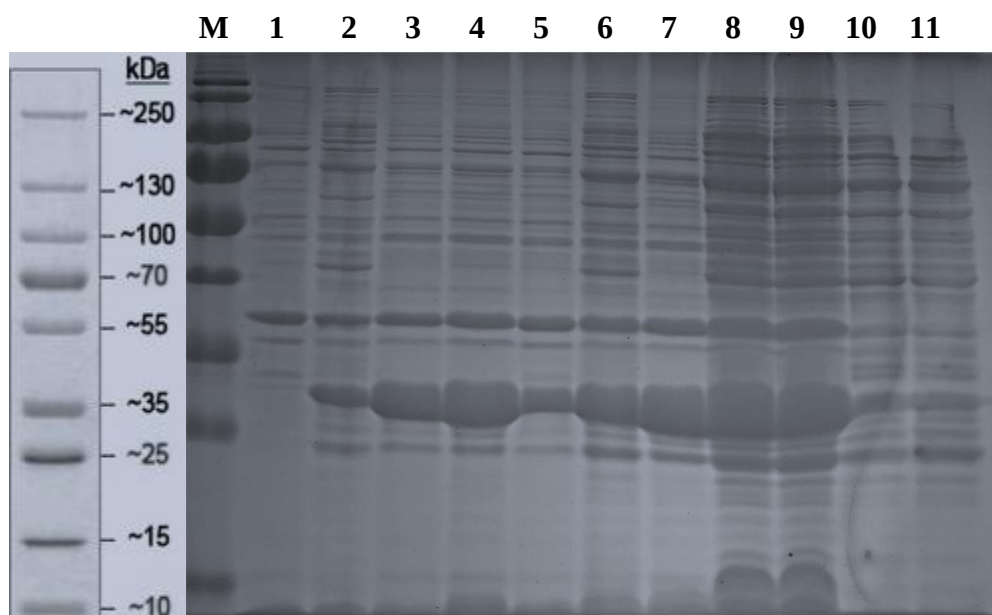
7. ábra: A kolónia PCR ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

(M: molekulásúly marker-GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) 5 µL; 47: 1:3 arányú ligálási termék *B. subtilis* SZX102-ből származó NK génnel 10 µL; 49: *B. subtilis*-ből származó PCR termék 5 µL; 51: 1:3 arányú ligálási termék *B. subtilis* SZC102B-ből származó NK génnel 10 µL)

4.5. A különböző expressziós körülmények hatékonyságának összehasonlítása

Kutatásunk során NK enzim bioszintézisét hagyományos fehérjetermelési és autoindukciós eljárással is vizsgáltuk. A hagyományos fehérjetermelés során LB tápoldatot használtunk a fermentáció során, az indukcióhoz 0,1 mM és 1 mM IPTG-t alkalmazva. A fehérjetermelés végén a folyamat sikerességét 12 %-os akrilamid gélen, SDS PAGE-el ellenőriztük.

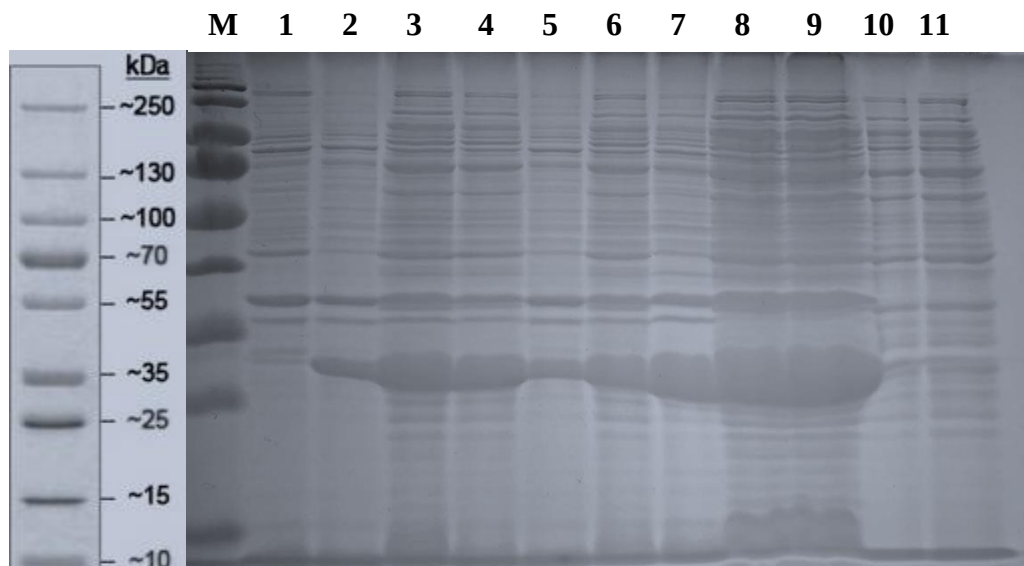
Kísérleteinkben a fermentáció során IPTG-vel történő indukciót (0,1 mM és 1 mM) alkalmaztunk *E. coli* BL21 (DE3) Star, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta sejtvonalatokat felhasználva. A fermentációt LB tápoldatban végeztük. Az indukció során mintát vettünk az indukció előtt illetve az indukciót követő 1., 3. és 5. órában. A célfehérje termelődését SDS-PAGE-el ellenőriztük. Az eredmények alapján melyek a 9., 10. és 11. ábrán láthatóak elmondható, hogy az *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta (9. ábra) sejtvonala esetében a NK enzim méretével (27,7 kDa) megegyező sávot kaptunk, melyek igazolják a fehérjetermelés sikerességét, ugyanakkor a gélképeken a feltárási utáni pellet láthatóak, ezért az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az enzim termelődése zárványtestekben történt.



9. ábra: Az *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta sejtvonalaiban termelt NK enzim SDS-PAGE ellenőrzése

(M: molekulahúly marker Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) 5 µL;
1: Indukálás előtti minta; 2: indukálás után 1 órával-1 mM IPTG; 3: indukálás után 3 órával-1 mM IPTG; 4: indukálás után 5 órával-1 mM IPTG; 5: indukálás után 1 órával-0,1 mM IPTG; 6: indukálás után 3 órával-0,1 mM IPTG; 7: indukálás után 5 órával-0,1 mM IPTG; 8: Összes fehérje a feltárási után-1 mM IPTG; 9: Összes fehérje a feltárási után-0,1 mM IPTG; 10: Felülúszó a feltárási után-1 mM IPTG; 11: Felülúszó a feltárási után-1 mM IPTG)

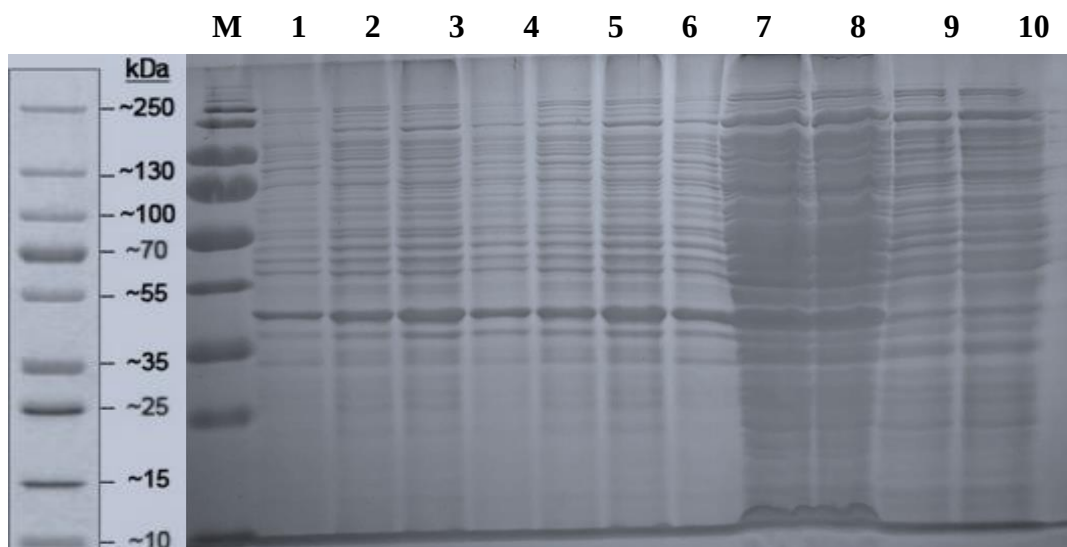
Az ábrán megfigyelhető, hogy az indukciótól eltelt idő növekedésével megegyezően növekedett az termelődött enzim mennyisége is. Elmondható, hogy az alkalmazott IPTG koncentrációk nem befolyásolták szignifikánsan a termelődött enzim mennyiséget. Az *E. coli* BL21 (DE3) Star (10. ábra) sejtvonal esetében az előző sejtvonalhoz közel azonos eredményeket figyelhettünk meg.



10. ábra: Az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalban termelt NK enzim SDS-PAGE ellenőrzése

(M: molekulásúly marker Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) 5 μ L; 1: Indukálás előtti minta; 2: indukálás után 1 órával-1 mM IPTG; 3: indukálás után 3 órával-1 mM IPTG; 4: indukálás után 5 órával-1 mM IPTG; 5: indukálás után 1 órával-0,1 mM IPTG; 6: indukálás után 3 órával-0,1 mM IPTG; 7: indukálás után 5 órával-0,1 mM IPTG; 8: Összes fehérje a feltárás után-1 mM IPTG; 9: Összes fehérje a feltárás után-0,1 mM IPTG; 10: Felülúszó a feltárás után-1 mM IPTG; 11: Felülúszó a feltárás után-1 mM IPTG)

Az *E. coli* BL21 (DE3) sejtvonala esetében a fehérjetermelés nem valósult meg (11. ábra).



11. ábra: Az NK termelés *E. coli* BL21 (DE3) sejtvonalaiban

(M: molekulatömeg marker Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) 5 µL;
1: Indukálás előtti minta; 2: indukálás után 1 órával-1 mM IPTG; 3: indukálás után 3 órával-1 mM IPTG; 4: indukálás után 5 órával-1 mM IPTG; 5: indukálás után 1 órával-0,1 mM IPTG; 6: indukálás után 3 órával-0,1 mM IPTG; 7: indukálás után 5 órával-0,1 mM IPTG; 8: Összes fehérje a feltárás után-1 mM IPTG; 9: Összes fehérje a feltárás után-0,1 mM IPTG; 10: Felülcsúszó a feltárás után-1 mM IPTG; 11: Felülcsúszó a feltárás után-1 mM IPTG)

5. Diskusszió

Kutatásunk során a *Bacillus subtilis* baktériumtörzsből származó nattokináz enzim rekombináns módon történő előállítását végeztük *Escherichia coli* expressziós rendszerben. A kutatás folyamatát három részre osztottuk: a rekombináns konstrukció tervezése, klónozás és az enzim bioszintézise.

Az egyes folyamatok eredményeit tekintve sikeresen megterveztük a rekombináns konstrukciót és a génizoláláshoz szükséges oligonukleotidokat.

B. subtilis törzsekből sikeresen izoláltuk a genomiális DNS-t, amelyből a tervezett oligonukleotidok segítségével amplifikáltuk a NK gént.

A rekombináns konstrukció *in vitro* létrehozása a pET20b vektor és a NK enzim génjének ligálásával valósult meg, melyet *E. coli* NEB 10 klónozó sejtvonalba való transzformáció követett. A ligálási reakció során 5 megfelelő konstrukciót kaptunk, amelyekben a *B. subtilis* SZC102B és *B. subtilis* SZX102 törzsekből származó NK gén található meg.

A NK enzim bioszintézisét három expressziós sejtvonalba vizsgáltuk: *E. coli* BL21 (DE3) Star, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. Eredményeink alapján a NK enzim zárványtestekben szintetizálódott az *E. coli* BL21 (DE3) Star és *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta sejtvonalak esetében. Az alkalmazott IPTG koncentrációk nem mutattak szignifikáns eltérést a fehérjetermelés hatékonyságát tekintve.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetnyilvánítással tartozom a kutatási munkám elvégzésében és a dolgozatom elkészítésében nyújtott önzetlen segítségért témavezetőimnek, Dr. Albert Csillának és Dr. Salamon Pálnak. Köszönettel tartozom a Sapientia EMTE Csíkszeredai Kar Biomérnöki Tanszék oktatóinak és munkatársainak, akik a dolgozat elkészítésében és a kutatásban segítséget nyújtottak, valamint a Balassi Bálint- Klebelsberg Kuno Tehetséggondozó ösztöndíjprogramnak a támogatásért.

6. Irodalom

- Blommel, Paul G., Katie J. Becker, Petar Duvnjak, és Brian G. Fox. 2008. „Enhanced Bacterial Protein Expression During Auto-Induction Obtained by Alteration of Lac Repressor Dosage and Medium Composition”. *Biotechnology Progress* 23 (3): 585–98. <https://doi.org/10.1021/bp070011x>.
- Cai, Dongbo, Chengjun Zhu, és Shouwen Chen. 2017. „Microbial Production of Nattokinase: Current Progress, Challenge and Prospect”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33 (5): 84. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2253-2>.
- Chhetri, Gaurav, Parismita Kalita, és Timir Tripathi. 2015. „An Efficient Protocol to Enhance Recombinant Protein Expression Using Ethanol in *Escherichia Coli*”. *MethodsX* 2: 385–91. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>.
- Cronan, John E. 2005. „*Escherichia Coli* as an Experimental Organism”. In *ELS*, szerkesztette John Wiley & Sons, Ltd, 1. kiad. Wiley. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002026>.
- Faust, Georg, Alexandra Stand, és Dirk Weuster-Botz. 2015. „IPTG Can Replace Lactose in Auto-Induction Media to Enhance Protein Expression in Batch-Cultured *Escherichia Coli*”. *Engineering in Life Sciences* 15 (8): 824–29. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500011>.
- Gavrilescu, Maria, és Yusuf Chisti. 2005. „Biotechnology—a Sustainable Alternative for Chemical Industry”. *Biotechnology Advances* 23 (7–8): 471–99. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.03.004>.
- Jo, Bilgi, Suthakaran Pichaimuthu, és Sankaranarayanan Srimeenakshi. 2015. „An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*”. *Journal of Cell Science & Therapy* 06. <https://doi.org/10.4172/2157-7013.1000221>.
- Kamiya, Seitaro, Masayori Hagimori, Masayoshi Ogasawara, és Masayuki Arakawa. 2010. „In Vivo Evaluation Method of the Effect of Nattokinase on Carrageenan-Induced Tail Thrombosis in a Rat Model”. *Acta Haematologica* 124 (4): 218–24. <https://doi.org/10.1159/000321518>.
- Li, Zhaopeng, Wolfgang Kessler, Joop van den Heuvel, és Ursula Rinas. 2011. „Simple Defined Autoinduction Medium for High-Level Recombinant Protein Production Using T7-Based *Escherichia Coli* Expression Systems”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (4): 1203–13. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3407-z>.
- McDonald, K.A. 2011. „Heterologous Protein Expression”. In *Comprehensive Biotechnology*, 441–49. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00114-8>.
- Naidoo, N. 2011. „Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum”. In *Comprehensive Biotechnology*, 217–27. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00029-5>.
- Ni, He, Peng-Cheng Guo, Wei-Ling Jiang, Xiao-Min Fan, Xiang-Yu Luo, és Hai-Hang Li. 2016. „Expression of Nattokinase in *Escherichia Coli* and Renaturation of Its Inclusion Body”. *Journal of Biotechnology* 231 (augusztus): 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.034>.
- Peng, Shuaiying, Zhongmei Chu, Jianfeng Lu, Dongxiao Li, Yonghong Wang, Shengli Yang, és Yi Zhang. 2016. „Co-Expression of Chaperones from *P. Furiosus* Enhanced the Soluble Expression of the Recombinant Hyperthermophilic α -Amylase in *E. Coli*”. *Cell Stress and Chaperones* 21 (3): 477–84. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0675-7>.
- Rezaei, Leila, Seyed Abbas Shojaosadati, Leila Farahmand, és Shima Moradi-Kalbolandi. 2020. „Enhancement of Extracellular Bispecific Anti-MUC1 Nanobody Expression in *E. Coli* BL21 (DE3) by Optimization of Temperature and Carbon Sources through an Autoinduction Condition”. *Engineering in Life Sciences* 20 (8): 338–49. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900158>.

- Rischer, Heiko, Géza R Szilvay, és Kirsi-Marja Oksman-Caldentey. 2020. „Cellular Agriculture — Industrial Biotechnology for Food and Materials”. *Current Opinion in Biotechnology* 61 (február): 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.003>.
- Sahdev, Sudhir, Sunil K. Khattar, és Kulvinder Singh Saini. 2007. „Production of Active Eukaryotic Proteins through Bacterial Expression Systems: A Review of the Existing Biotechnology Strategies”. *Molecular and Cellular Biochemistry* 307 (1–2): 249–64. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>.
- Slouka, Christoph, Julian Kopp, Daniel Strohmer, Julian Kager, Oliver Spadiut, és Christoph Herwig. 2019. „Monitoring and Control Strategies for Inclusion Body Production in E. Coli Based on Glycerol Consumption”. *Journal of Biotechnology* 296 (április): 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.014>.
- Studier, F. William. 2005. „Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures”. *Protein Expression and Purification* 41 (1): 207–34. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, és H. Muraki. 1987. „A Novel Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto; a Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet”. *Experientia* 43 (10): 1110–11. <https://doi.org/10.1007/BF01956052>.
- Tarafdar, Ayon, Ranjna Sirohi, Vivek Kumar Gaur, Sunil Kumar, Poonam Sharma, Sunita Varjani, Hari Om Pandey, és mtsai. 2021. „Engineering Interventions in Enzyme Production: Lab to Industrial Scale”. *Bioresource Technology* 326 (április): 124771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124771>.
- Weng, Yunqi, Jian Yao, Sawyer Sparks, és Kevin Wang. 2017. „Nattokinase: An Oral Antithrombotic Agent for the Prevention of Cardiovascular Disease”. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (3): 523. <https://doi.org/10.3390/ijms18030523>.
- Zhou, Xueqin, Liangzhong Liu, és Xurui Zeng. 2021. „Research Progress on the Utilisation of Embedding Technology and Suitable Delivery Systems for Improving the Bioavailability of Nattokinase: A Review”. *Food Structure* 30 (október): 100219. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100219>.

Függelék

1. függelék: A dolgozatban alkalmazott rövidítések magyarázata

Rövidítés	Magyarázat
DNS	dezoxiribonukleinsav
NK	nattokináz
IPTG	izopropil β -D-1 tiogalaktozid
LB	Luria Bertani
TAE	Tris-Acetát-EDTA
SDS	nátrium- dodecilszulfát
PAGE	poliakrilamid- gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
RNS	ribonukleinsav