



Élelmiszertudományi Kar

XX. Jubileumi Országos MÉTE TDK Konferencia

*„A tudományos emberfő mennyisége a nemzet igazi hatalma“
Széchenyi István*

KONFERENCIA KIADVÁNY



**1118 Budapest, Villányi út 29-43.
2014. május 13.**

**BIOKONVERZIÓK MEGVALÓSÍTÁSA *BIFIDOBACTERIUM* EREDETŰ
ENZIMKOMPLEX FELHASZNÁLÁSÁVAL**

***IMPLEMENTATION OF BIOCONVERSIONS USING AN ENZYME COMPLEX FROM
BIFIDOBACTERIUM***

PENCZ NOÉMI KINGA

MSc. I. évfolyam (pekiki91@gmail.com)

BCE, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszzipari Tanszék, Budapest

Témavezetők: **Styevkó Gabriella**, egyetemi tanársegéd
Rezessyné dr. Szabó Judit, egyetemi docens

Összefoglalás

Bifidobacterium longum A4.8 eredetű enzimpreparátumot állítottam elő raffinóz szubsztrátumon. Az enzimkomplex α -gálaktozidáz (2,73 U/mg fehérje) aktivitása mellett rendelkezik α -glükózidáz (maltózon 0,58 U/mg fehérje), β -galaktozidáz (0,3 U/mg fehérje) és β -fruktozidáz (0,07 U/mg fehérje) aktivitással. A preparátum alkalmazásával sikeresen megvalósítottam oligoszacharidok szintézisét, melyet 25 és 40 g/100ml szubsztrátum koncentrációk alkalmazásával értem el. Melibióz szubsztrátumon a galaktozil transzfer révén 1,62 g/100ml triszacharidot kaptam maximálisan. Maltózon történő biokonverzió során maximálisan 2,64 g/100ml DP₃ oligoszacharid szintetizálódott. Szacharóz szubsztrátumon vélhetően több enzim együttes működése ment végbe, ahol triszacharidok (DP₃), és tetraszacharidok (DP₄) jelentek meg valamint egy a szacharóztól eltérő kémiai szerkezetű diszacharidot (DP₂) is detektáltam. Ezek maximális értékei: DP₄: 2,45 g/100ml, DP₃: 1,3 g/100ml, DP₂: 2,56 g/100ml. Turanóz alkalmazásával 1,56 g/100ml triszacharid hozamot értem el.

1. Bevezetés

A bifidobaktériumok az emberi és állati bélrendszerben honos jótékony mikroorganizmusok, amelyek hozzájárulnak a bélrendszer mikrobiális egyensúlyának fenntartásához. Azokat a vegyületeket (frukto-oligoszacharidok, galakto-oligoszacharidok, szója oligoszacharidok, laktulóz, inulin), amelyek elősegítik a bifidobaktériumok szaporodását és aktivitását, bifidogén faktoroknak nevezzük (ITSARANUWAT *et al.*, 2003). E baktériumok növekedését azon táplálék összetevők biztosítják, amelyek emésztetlen formában jutnak el a vastagbélbe. Ezeket hidroláz enzimük segítségével lebontva hasznosítják, melyek bizonyos környezeti feltételek esetén transzfer reakciót is katalizálhatnak, és ilyen módon oligoszacharidok is szintetizálhatóak (VAN LAERE *et al.*, 1999).

Kutatómunkám során egy *Bifidobacterium* törzs raffinóz triszacharidon való tömegtenyésztésével intracelluláris α -galaktozidáz aktivitással rendelkező nyers enzimpreparátumot állítottam elő és meghatároztam ennek kísérő hidrolitikus enzimaktivitásait is. Az enzimpreparátum segítségével, különböző szubsztrátumok felhasználásával, biokonverziókat valósítottam meg.

2. Anyagok és módszerek

Vizsgált mikroorganizmus: *Bifidobacterium longum* A4.8 (MAYER *et al.*, 2003)

Enzimpreparátum előállítása: A vizsgált törzset raffinóz szénforrást tartalmazó TPY tápközegeben, 37 °C-on, anaerob körülmények között, 24 óráig tenyésztettem Biostat B fermentorban. A sejteket centrifugálással történő leválasztásuk után French Press

nagynyomású homogenizátorral tártam fel az intracelluláris enzimfehérjék kinyerésére. Az így kinyert enzimpreparátumot liofilezett állapotban tároltam 4 °C-on.

Fehérjetartalom meghatározása: Bradford módszer (BRADFORD, 1976).

Hidroláz aktivitások meghatározása: A preparátum hidroláz aktivitását 15 mM koncentrációjú szubsztrátumokon vizsgáltam, 37 °C-on, pH=6,6 értéken 30 perces reakció idővel. Az aktivitás meghatározása a felszabaduló glükóz mennyisége alapján GOD-POD módszerrel történt.

Biokonverző megvalósítása: Különböző kémiai összetételű diszacharid szubsztrátumokon (melibióz, maltóz, trehalóz, turanóz, szacharóz, cellobióz) vizsgáltam a készítmény hidrolízis és transzfer aktivitását 37 °C-on, pH=7,0-en. A reakciót 0,5 mg preparátummal indítottam. Az enzimek működését pH váltással, illetve forralással állítottam le. A minták minőségi és mennyiségi szénhidrát összetételét VRK és HPLC módszerrel határoztam meg.

3. Eredmények és értékelésük

3.1 A készítmény hidroláz aktivitásai különböző szubsztrátumokon

A *Bifidobacterium longum* A4.8 törzzsel, raffinóz szubsztrátumon előállított intracelluláris enzimkomplex hidroláz aktivitásainak jellemzését 7 különböző szubsztrátumon értékeltem (1. táblázat).

1. táblázat: A *Bifidobacterium longum* A4.8 eredetű enzimpreparátum hidrolízis aktivitásai különböző szubsztrátumokon

Szubsztrátum	U/g preparátum	U/mg fehérje
melibióz (α -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glükopiranozid)	620,08	2,73
maltóz (α -D-glükopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glükopiranozid)	130,37	0,58
trehalóz (α -D-glükopiranozil-(1 $\rightarrow$ 1)- α -D-glükopiranozid)	98,42	0,44
turanóz (α -D-glükopiranozil-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-fruktofuranozid)	184,19	0,4
laktóz (β -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glükopiranozid)	68,72	0,30
szacharóz (β -D-fruktofuranozil-(2 $\rightarrow$ 1)- α -D-glükopiranozid)	16,17	0,07
cellobióz (β -D-glükopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glükopiranozid)	1,30	0,005

A várakozásnak megfelelően a legnagyobb hidroláz aktivitás értéket az alfa-galaktozidos kötést tartalmazó melibióz szubsztrátumon (2,73 U/mg fehérje) detektáltam. Megállapítható, hogy az enzimpreparátum tartalmazott alfa-glükozidáz aktivitást is, ezt bizonyítja, hogy az alfa-glükozidos kötések tartalmazó szubsztrátumokon kimutattam glükóz felszabadulást. Az alfa-glikozidos kötésű szénhidrátok közül a maltózon kaptam a legnagyobb aktivitás értéket, ezt követték a trehalóz és turanóz szubsztrátumokon elért eredmények, rendre 0,58 U/mg fehérje, 0,44 U/mg fehérje és 0,4 U/mg fehérje. A preparátum rendelkezett β -galaktozidáz aktivitással is (0,3 U/mg fehérje). Az enzimpreparátum szacharóz szubsztrátumon mutatott béta-fruktozidáz aktivitást, melynek értéke 0,07 U/mg fehérje.

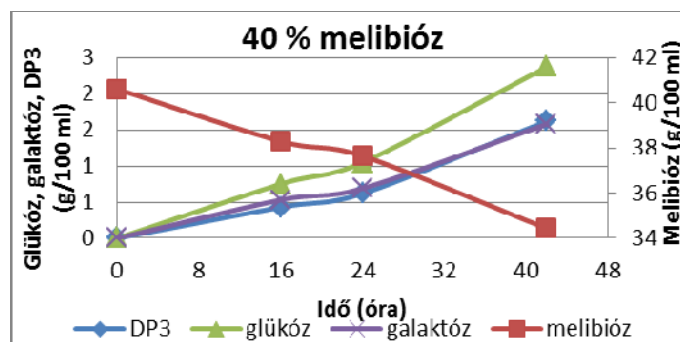
Vizsgálatom kitért az enzimpreparátum béta-glükozidáz aktivitására is, azonban a készítmény cellobióz szubsztrátumon elhanyagolható aktivitást mutatott. Tehát az enzimpreparátum egy multienzim rendszernek tekinthető, amely nagyobb affinitással rendelkezik az alfa-glikozidos kötések bontására.

Eredményeim hasonlóságot mutatnak Holt és munkatársai (2007) megfigyeléseivel, akik egy *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 törzset szaporítottak különböző szénhidrátokon. A kinyert enzimkomplexeket vizsgálták alfa-galaktozidáz és alfa-glükozidáz aktivitásra. Megállapították, hogy alfa-galaktozidázt minden vizsgált szénhidrát esetében termelt a baktérium, azonban alfa-glükozidázt csupán alfa-kötésű szubsztrátumokon.

3.2 Az oligoszacharid szintézis vizsgálata különböző szubsztrátumokon

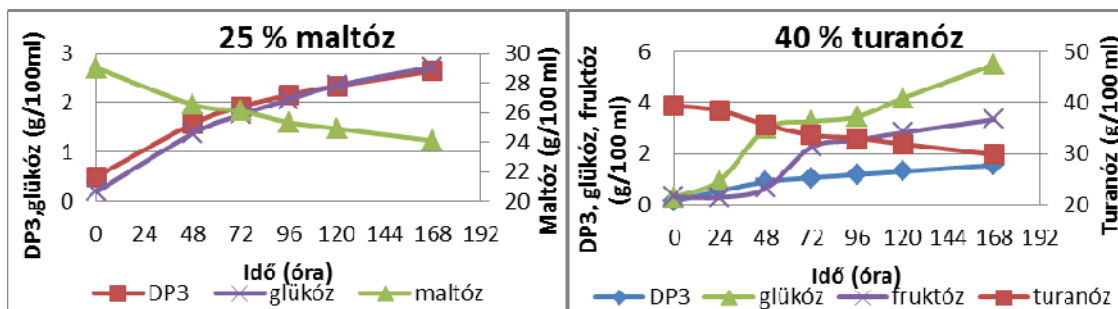
Egyes hidroláz enzimek bizonyos körülmények között transzfer aktivitást mutatnak (VAN LAERE *et al.*, 1999). Az enzimpreparátum hidrolitikus és transzfer aktivitását vizsgáltam 6 különböző kémiai szerkezetű diszacharidon (melibióz, maltóz, trehalóz, turanóz, szacharóz, cellobióz), a transzfer reakció elősegítésére nagy szubsztrátum koncentrációkat (25 és 40 w/v %) alkalmaztam. Számottevő transzfer reakciót csak a melibióz, maltóz, turanóz és szacharóz szubsztrátumokon detektáltam.

A készítmény melibióz szubsztrátumon mindkét alkalmazott szénhidrát koncentrációnál szintetizált triszacharidot (DP₃). A 40 %-os melibióz koncentráció bizonyult jobbnak, ebben az esetben 1,62 g/100 ml triszacharid hozamot értem el. Az egyes szénhidrátok mennyiségének alakulása az említett paraméterek mellett az **1. ábrán** látható. A glükóz és a galaktóz koncentrációjának változását elemezve következtethetünk arra, hogy melibióz szubsztrátumon galaktóz transzfert katalizált az enzimpreparátum. Hasonló eredményeket kaptak Broek és munkatársai (1999), akik *Bifidobacterium adolescentis* eredetű tisztított alfa-galaktozidáz enzim hidrolízis és transzferáz aktivitását vizsgálták melibióz és sztachióz szubsztrátumokon. Mindkét szubsztrátum esetében bizonyították, hogy a vizsgált alfa-galaktozidáz enzim felhasználható α -galakto-oligoszacharidok előállítására.



1. ábra: A szénhidrát összetétel változása 40 %-os melibióz szubsztrátumon megvalósított biokonverzióánál

A készítmény glükozil transzfer reakciót is katalizált. Ezt bizonyítja, hogy maltóz szubsztrátumon glükóz mellett triszacharid tartalom növekedést is detektáltam. Az alkalmazott két maltóz koncentráció között nem volt jelentős eltérés a triszacharid képzés tekintetében, a legnagyobb DP₃ hozam 2,64 g/100 ml volt 25 %-os maltóz koncentrációnál, a biokonverzió 168. órájában (**2. ábra**).

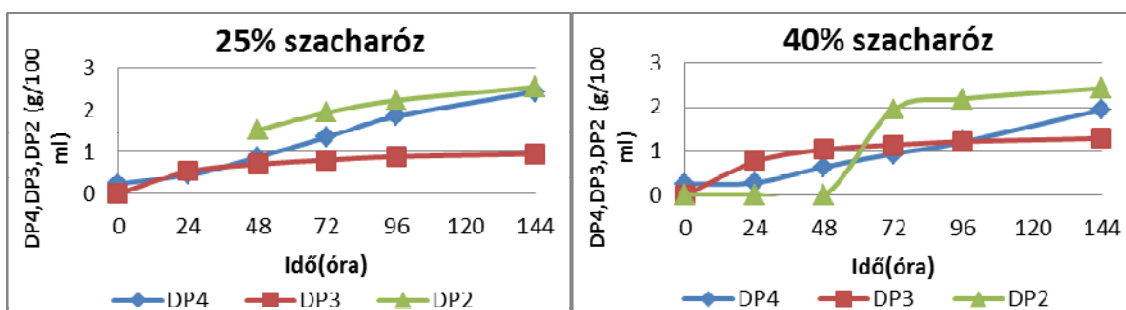


2. ábra: A szénhidrát összetétel változása 25 %-os maltóz szubsztrátumon megvalósított biokonverzióánál

3. ábra: A szénhidrát összetétel változása 40 %-os turanóz szubsztrátumon megvalósított biokonverzióánál

Turanóz szubsztrátum esetében sem volt jelentős eltérés a két koncentráció között a triszacharid szintézis szempontjából. A legnagyobb hozamot (1,56 g/100 ml) 40 %-os szubsztrátum koncentrációnál, a biokonverzió 168. órájában kaptam. A szénhidrát összetétel változását vizsgálva a **3. ábrán** jól látható, hogy a hidrolízis termékek közül a glükóz koncentrációja nagyobb az adott körülmények között, így feltételezhetően turanóz szubsztrátumon fruktóz transzfert katalizál az enzimpreparátum.

Szacharóz szubsztrátumon a csekély hidroláz aktivitás ellenére mindkét szubsztrátum koncentráció alkalmazásával mutattam ki transzfer aktivitást, a reakció termékei polimerizáltsági fokukat tekintve DP₄, DP₃ és egy a szacharóztól eltérő kémiai szerkezetet mutató DP₂ szénhidrátok voltak (**4. ábra A,B**). A DP₄ oligoszacharid (2,45 g/100 ml, 144. óra) és a DP₂ (2,56 g/100 ml, 144. óra) képződése tekintetében a 25%-os szubsztrátum koncentráció, a DP₃ esetében pedig a 40%-os szubsztrátum koncentráció (1,3 g/100 ml, 144. óra) bizonyult a legjobbnak. Az diszacharid keletkezéséből azt feltételezem, hogy szacharóz szubsztrátum esetén több enzim együttes működése ment végbe.



4. ábra: A transzfertermék mennyiségének alakulása 25 g/100ml (A) és 40 g/100 ml (B) szacharóz szubsztrátumon

Kim és munkatársai (2003) a *Bifidobacterium longum* szacharóz-foszforiláz génjét klónozták és expresszálták *E. coli* baktériumba, majd jellemezték az enzimet. Megállapították, hogy ez az enzim képes glükozil-transzfer reakciót katalizálni szacharózon. Esetemben is lehetséges szacharóz-foszforiláz jelenléte a preparátumban.

4. Következtetések, javaslatok

Az előállított enzimpreparátum alkalmas a hidrolízis mellett transzfer termékek előállítására is. A bifidobaktériumok hidroláz enzimeinek e tulajdonságának kihasználásával

lehetőség nyílik oligoszacharidok enzimés előállítására. Távlati célok között szerepelhet a kapott transzfer termékek szerkezetének meghatározása és prebiotikumként történő alkalmazhatóságának értékelése.

*

Kutatómunkámat a TÁMOP-4.2.1/B-09/1-KMR-2010-0005, a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023 és NTP-TDK-13-072 projektek támogatják.

5. Irodalomjegyzék

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Holt, S. M., Teresi, J. M., Côté, G. L. 2007. Influence of alternansucrase-derived oligosaccharides and other carbohydrates on α -galactosidase and α -glucosidase activity in *Bifidobacterium adolescentis*. *Letters in Applied Microbiology*. 46:73-79.
- Itsaranuwat, P., Hal-Haddad, K. S., Robinson, R. K. 2003. The potential therapeutic benefits of consuming ‘healthpromoting’ fermented dairy products: a brief update. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 56. No. 4. pp. 203-210.
- [Kim](#), M., [Kwon](#), T., [Lee](#), H. J., [Kim](#), K. H., [Chung](#), D. K., [Ji](#), G. E., [Byeon](#), E-S., [Lee](#), J-H. 2003. Cloning and expression of sucrose phosphorylase gene from *Bifidobacterium longum* in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology Letters*. 25: 1211-1217.
- 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.
- Van den Broek, L.A.M., Ton, J., Verdoes, J.C., Van Laere, K.M.J., Voragen, A.G.J., Beldman, G. 1999. Synthesis of α -galacto-oligosaccharides by a cloned α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnology Letters* 21: 441–445.
- 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.