



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.**

Szerkesztők

Dr. Fodor Marietta és Dr. Nguyen Duc Quang

ISBN 978-963-503-581-6

A kiadvány MTMT-azonosítója: 2584737

Kiadta: **BCE Élelmiszertudományi Kar**

cím: 1118 Budapest Villányi út 29-43.

a kapcsolattartó személy neve: **Dr. Dalmadi István**

tel.: +36 1 482-6060, fax: +36 1 482-6321

e-mail: istvan.dalmadi@uni-corvinus.hu

honlapjának URL-je: food.uni-corvinus.hu

**PECTINEX ULTRA ENZIMKÉSZÍTMÉNY RÖGZÍTÉSE ÉS A RÖGZÍTETT
ENZIM VIZSGÁLATA**

***IMMOBILISATION OF PECTINEX ULTRA ENZYME PREPARATION AND
ANALYSIS OF THE IMMOBILIZED ENZYME***

TA PHUONG LINH

(II.évfolyam, tplinh92@gmail.com)

Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszer tudományi Kar, Sör- és Szeszipari Tanszék, Budapest

Konzulensek: **Nguyen Duc Vuong** PhD hallgató

Styevkó Gabriella egyetemi tanársegéd

Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi docens

Összefoglalás

A Pectinex ultra enzimkészítmény kovalens kötással történő rögzítését végeztem kitozán hordozóhoz. Az enzimkészítmény összfehérje tartalmának 40,5 %-a rögzült. A rögzített preparátum transzferáz aktivitást mutatott laktóz, laktulóz, maltóz és szacharóz szubsztrátumokon. VRK módszerrel kimutattam, hogy laktózon triszacharidok, laktulózon tri- illetve tetraszacharidok szintetizálhatók a galaktozil-transzferáz aktivitásnak köszönhetően. Kutatómunkám során megállapítottam a rögzített preparátum β -galaktozidáz aktivitásának pH illetve hőmérséklet optimumát, mely 60°C illetve pH 5,5 volt. Laktulózon történő biokonverzióval, 15 g/100ml szubsztrátum koncentráció mellett, 0,4 g/ml rögzített enzim, 60 °C és pH 5,0 paraméterek alkalmazásával 4,22 g/100ml DP₃ illetve 0,55 g/100ml DP₄ oligoszacharid terméket sikerült előállítani.

1. Bevezetés

Az utóbbi időkben az oligoszacharidokkal kapcsolatosan számos kutatást hajtottak végre. Többek között tanulmányozták az élettani jelentőségüket, különböző mikroorganizmusokkal, főként a tejsavbaktériumokkal és bifidobaktériumokkal való kapcsolatukat, valamint az előállítási lehetőségüket. Az oligoszacharidok előállítása iránti nagy igény annak köszönhető, hogy számos bizonyított jótékony élettani hatással bírnak, amely közül az egyik legfontosabb a bélbetegségek elleni védelemben való szerepük. Hatásuk abban nyilvánul meg, hogy serkentik a vastagbélben élő probiotikus baktériumok (főként *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok) növekedését és aktivitását, ezáltal a vastagbél számára védelmet biztosítanak egyes belpatógének ellen (Losada&Olleros, 2001). Az oligoszacharidok előállítása két féle módon valósítható meg, kémiai illetve enzimes úton. Az enzimes előállítás számos előnnyel rendelkezik a kémiaiával szemben. Egyik fontos előnye, hogy az enzimes előállításnál lehetőség van rögzítésre, melynek köszönhetően stabilabbá, ellenállóvá válhat az enzim, valamint folytonosíthatóvá tehető az oligoszacharidok szintézise. Ilyen technológia alkalmazásával költséghatékonyabb az előállításuk (Perugino *et al.*, 2004). Ma már számos oligoszacharid előállítása iparilag megvalósított, azonban vannak olyan oligoszacharidok, amelyek előállításáról illetve élettani hatásukról még kevés tanulmány jelent meg. Ilyen oligoszacharid pl. a laktulózból szintetizált laktulóz oligoszacharidok. A laktulóz egy fruktóz és egy galaktóz egységből álló diszacharid, amelyet a laktóz izomerizációjával állítanak elő (Amine *et al.*, 2000; Aider& Halleux, 2007). A laktulózzal már bebizonyították, hogy különösen jó növekedési faktort jelent a probiotikus baktériumok számára. Emellett leírták a székrekedés és a májeredetű agyvelő-bántalom elleni gyógyító hatását is (Crittenden&Playne, 1996). Cardelle-Corbas és munkatársai (2008) kimutatták, hogy a Pectinexben található β -galaktozidáz enzim, galaktozil-transzferáz aktivitása révén képes oligoszacharidot szintetizálni ezen a szubsztrátumon. A TDK kutatómunkámban célul

tűztem ki a Pectinex ultra enzimek készítmény kovalens rögzítését valamint a rögzített fehérjepreparátum vizsgálatát, különös tekintettel a β -galaktozidáz aktivitásra illetve a laktulóz alapú oligoszacharid előállításra.

2. Anyagok és módszerek

Alkalmazott enzimek készítmény: Pectinex Ultra SP-L (Sigma-aldrich)

Enzimek rögzítése: Kovalens rögzítés Nguyen és munkatársai (2011) által leírtak alapján.

Hidrolízis aktivitás meghatározása: A rögzített és szabad enzim hidrolízis aktivitásainak meghatározása 60 °C-on és pH 5,0-n (McIlvaine pufferrel), illetve 15 mM p-nitrofenil tartalmú szintetikus szubsztátumokon történt. Hidroláz aktivitás megállapítása a felszabaduló p-nitrofenol mennyisége alapján történt. A pH hatását pH 4,5-7,0, a hőmérséklet hatását 50-80 °C tartományban vizsgáltam.

Biokonverzió: az oligoszacharidok szintézisét pH 5,0-n, 60°C-n, 1 ml térfogatban, 15 g/100ml szubsztátum koncentráció esetében vizsgáltam. A reakció indítását 0,4 g/ml rögzített enzimek készítménnyel végeztem el. A mintavételek során forralással állítottam le a reakciót.

Fehérjetartalom meghatározás: Bradford módszer (Bradford, 1976)

Szénhidrátok mennyiségi és minőségi meghatározása: HPLC és VRK technika

3. Eredmények és értékelésük

3.1. Az enzim rögzítése és hatékonyságának meghatározása

Kutatómunkám során aktivált kitozán hordozóra (5g) először glutaraldehiddel karokat (ligandumot) alakítottam ki, majd rögzítettem az enzimek készítményt (2,2 ml-t, 64,8 mg fehérje) Nguyen és munkatársai által leírt módszer alapján (2011). Vizsgáltam a rögzítés hatékonyságát mind a fehérjetartalom mind a hidroláz aktivitások szerint. Eredményeimet az 1. táblázatban mutatom be. Három-féle hidroláz aktivitást vizsgáltam a rögzítési hatékonyság szempontjából, az α -glükózidáz, a β -galaktozidáz, illetve az α -galaktozidáz. Látható, hogy a kapott aktivitásokat tekintve az α -glükózidáznál 0,53%-os, a β -galaktozidáznál 0,54 %-os, illetve az α -galaktozidáznál 2,76 %-os rögzítési hatékonyságot értem el, míg a fehérjetartalom alapján 40,5%-ban sikerült rögzíteni a készítményt.

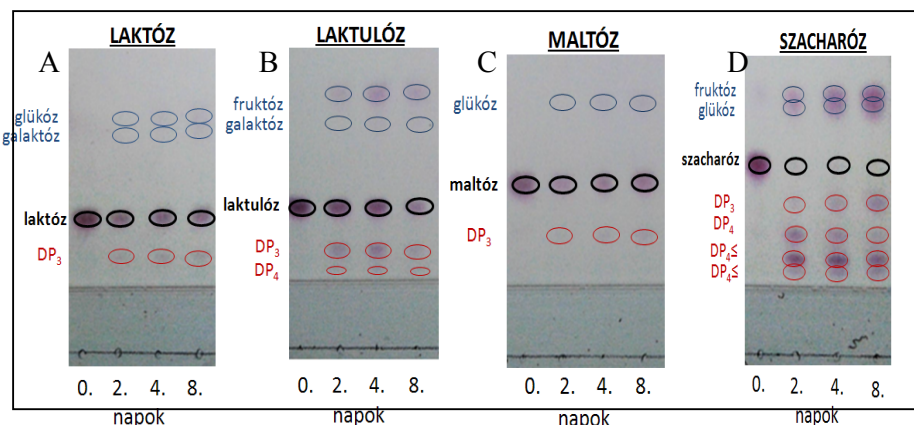
1. táblázat: Különböző aktivitások valamint a fehérjetartalom szerint kapott rögzítési hatékonyságok

	α -glükózidáz (U)	β -galaktozidáz (U)	α -galaktozidáz (U)	fehérje (mg)
Szabad enzimek készítmény	76,42	2084	2041	64,8
Rögzített enzimek készítmény	2,1	11,24	10,84	26,27
Rögzítési hatékonyság (%)	0,53	0,54	2,76	40,5

A Pectinex ultra enzimek készítményben található enzimeket és azok rögzíthetőségét más kutatók is vizsgálták. Tanriseven és Aslan (2005, 2007) Eupergit C (aktív epoxi-csoportokkal rendelkező akril-gyöngy) hordozóra kovalens kötással rögzítették a preparátum fruktozil-transzferáz illetve β -galaktozidáz enzimét. A fruktozil-transzferáz esetében optimalizálták az enzim-hordozó arányt, mellyel 96 %-os rögzítési hatékonyságot sikerült elérniük, a β -galaktozidáz enzim esetében pedig 100%-os hatékonyságot értek el. Ghazi és munkatársai (2005) fruktozil-transzferáz enzimét Sepabeads EC-EP3 (aktív epoxi-csoporttal rendelkező) adszorbensre rögzítették, mellyel 25,9 U/g aktivitást értek el. Magyar kutatók is (Csanádi&Sisak, 2008) tanulmányozták a preparátumot, és fruktozil-transzferáz enzimét rögzítették Amberlit IRA 900 anioncserélő gyantára, az általuk előállított enzimpreparátum 15,6 U/g fruktozil-transzferáz aktivitással rendelkezett.

3.2. A rögzített enzimek készítmény oligoszacharid szintetizáló képessége különböző szubsztátumokon

TDK munkámban kíváncsi voltam arra is, hogy a rögzített készítmény milyen szubsztrátumokon képes oligoszacharidot előállítani. Korábbi tanszéki tanulmányok azt mutatták, hogy a preparátum képes oligoszacharidot szintetizálni számos mono és diszacharidon. Ezek tükrében a következő szénhidrátok esetében vizsgáltam az rögzített enzimkészítmény glikoziltranszferáz aktivitásait: glükóz, galaktóz, laktóz, laktulóz, maltóz, palatinóz, szacharóz, turanóz és mellibióz. Az oligoszacharid képződést VRK módszerrel követtem nyomon a biokonverzió során.



1. ábra: A rögzített enzimkészítménnyel történő oligoszacharid szintézis különböző szubsztrátumokon

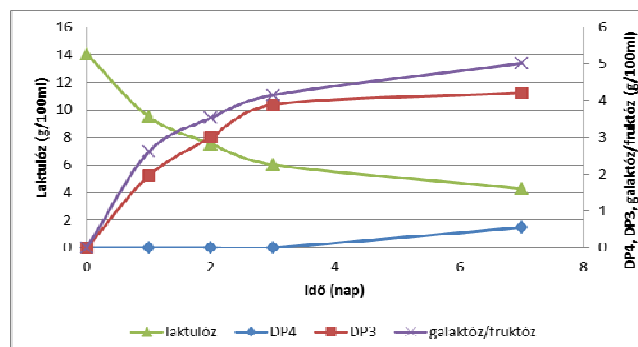
Megerősítettem, hogy a rögzített Pectinex ultra tartalmaz β -galaktozidáz enzimet. Ezt bizonyítja, hogy mind laktóz mind laktulóz esetében történt oligoszacharid szintézis (1.A, 1.B ábra). A laktóz esetében 1 transzfer termék (triszacharid), míg laktulóz esetében 2-féle (tri- és tetraszachrid) transzfer termék keletkezett. A 1.C ábra jól mutatja, hogy rögzített készítmény rendelkezik α -glükozidáz illetve glükozil-transzferáz aktivitással is, ugyanis a maltóz szubsztrátumon a biokonverzió során glükózt illetve glüko-oligoszacharidot (DP_3) detektáltam. Elmondható, hogy a szacharóz is szubsztrátuma az immobilizátumnak (1.D). Ebben az esetben a VRK módszerrel négy féle oligoszacharidot sikerült kimutatnom.

3.3. A pH és a hőmérséklet hatása a rögzített β -galaktozidáz enzimre

A VRK vizsgálatok eredményei alapján érdemesnek tartottam a β -galaktozidáz enzim további vizsgálatát. Meghatároztam a rögzített enzim hidroláz aktivitásának pH illetve hőmérséklet optimumát, összevetve a szabad enzim optimaival. Megállapítottam, hogy az optimális pH mind a szabad mind a rögzített enzim esetén is 5,5 volt, az optimális hőmérséklet esetében azonban eltérést tapasztaltam. A szabad enzimnek 65 °C, míg a rögzített enzimnek 60 °C volt az optima. Eredményeim megegyeznek Aslan és Tanriseven (2007) eredményeivel, akik Eupergit C hordozóra kovalens kötással rögzítették a β -galaktozidáz enzimet. Ők pH 4,0–5,0 és 55–60 °C tartományban határozták meg a rögzített enzim optimális körülményeit az ő esetükben ez megegyezett a szabad enzim esetén meghatározott optimummal.

3.4. Laktulózon történő biokonverzió vizsgálata rögzített enzim alkalmazásával

Biokonverziót indítottam a rögzített β -galaktozidáz enzimmal a laktulóz szubsztrátumon. A képződött termék(ek) analizésére HPLC technikát alkalmaztam. A biokonverziót két féle módon vizsgáltam, mind rázatott mind rázatás nélküli inkubálással. A rázatás kedvezően befolyásolta az oligoszacharid képződését. A rázatás nélküli esetben a 8. napon 3,97 g/100ml triszacharid (DP_3) illetve 0,42g/100ml tetraszacharid (DP_4) termék keletkezett. A rázatás esetén azonban már a 7. napon 4,22 g/100ml DP_3 illetve 0,55 g/100ml DP_4 oligoszacharid terméket sikerült elérnem (2. ábra).



2. ábra: Szénhidrát összetétel változása 15 g/100ml koncentrációjú laktulóz szubsztrátumon rázatás esetén

4. Következtetés

A TDK kutatómunkám során sikerült olyan rögzített enzimkészítményt létrehozni a kereskedelmi Pectinex ultrából, amely felhasználásával laktulóz alapú oligoszacharidok állíthatók elő. E készítménnyel akár 4 % DP₃ és 0,8 % DP₄ is elérhető 15% szubsztrátum koncentráció alkalmazásával a biokonverzió során. Távlati céljaim között szerepel a biokonverzió optimalizálása a laktulóz alapú oligoszacharid előállításának fokozására, valamint a rögzítési technika léptéknövelése, bioreaktor tervezése és folytonos technológia kidolgozása.

*

Kutatómunkámat a TÁMOP-4.2.1/B-09/1-KMR-2010-0005 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023, valamint TECH_09-A3-2009-0194 és NTP-TDK-13-072 projektek támogatják.

5. Felhasznált irodalom

- Aider, Mohammed, and Damien de Halleux (2007): Isomerization of lactose and lactulose production: review. Trends in food science & technology 18 (7): 356-364.
- Aslan Y., Tanriseven A (2007): Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 45:73-77
- Amine A., Moscone D., Bernardo, R. A., Marconi E., Palleschi G. (2000): A new enzymatic spectrophotometric assay for the determination of lactulose in milk. Analytica Chimica Acta. 406 (2): 217-224.
- 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.
- Cardelle-Cobas, A., Martínez-Villaluenga, C., Villamiel, M., Olano, A., & Corzo, N. (2008): Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. Journal of agricultural and food chemistry 56 (9): 3328-3333.
- Crittenden R. G., Playne M. J. (1996): Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science & Technology 7 : 353-361
- Csanádi ZS. & Sisak Cs. (2008): Production of short chain fructooligosaccharides. Hungarian Journal of Industrial Chemistry 36 (1-2): 23-26.
- Ghazi, I., Segura, D., Gómez, A., Fernández-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Royas-Cervantes M. L., Plou F.J., Ballesteros, A. (2005) : Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 35(1): 19-27.
- Losada M.A., Olleros T. (2001): Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. Nutrition Research 22:71-84
- Nguyen D. Q., Rezessy Sz. J., C. B., Hoschke Á. (2011): Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. Process Biochemistry 46: 298-303.
- Perugino G., Trincone A., Rossi M., Moracci M. (2004): Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. Trends in Biotechnology 22:31-37
- Tanriseven, A., & Aslan, Y. (2005): Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. Enzyme and microbial technology 36(4): 550-554.