

SZAKDOLGOZAT

Lieber Dorottya

Lieber Dorottya

2024



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Budai Campus
Biomérnöki alapképzési szak**

Probiotikus *Lactobacillus* törzsek szelektálása proteáz enzim aktivitásra

Belső konzulensek:

Szécsi Anett mestertanár
Rezessyné Dr. Szabó Judit egyetemi magántanár

Belső konzulens tanszéke:

Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Készítette:

Lieber Dorottya

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	1
2	CÉLKITŰZÉS	3
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1	A tej	4
3.1.1	A tej összetétele és tejtermékek előállítása	4
3.1.2	Tejfehérjék	5
3.2	Tejsavbaktériumok	6
3.3	<i>Lactobacillus</i> nemzetség	8
3.3.1	<i>Lactobacillus</i> nemzetség taxonómiája	8
3.3.2	A <i>Lactobacillus</i> fajok előfordulása és felhasználása	9
3.3.3	A <i>Lactobacillus</i> fajok enzimei	9
3.4	Proteáz enzimek	12
3.4.1	A proteázok hatásmechanizmusuk alapján történő osztályokba sorolása	13
3.4.2	A <i>Lactobacillus</i> nemzetség proteázai és alkalmazási lehetőségei	15
3.5	Bioaktív peptidek	16
3.5.1	Bioaktív peptidek élettani hatásai	16
3.5.2	A bioaktív peptidek fehérjékből történő előállítási lehetőségei	18
3.5.3	<i>Lactobacillus</i> törzsek szerepe a tejfehérje eredetű bioaktív peptidek képzésében	18
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
4.1	Felhasznált törzsek	21
4.2	Felhasznált tápközegek	21
4.3	Alkalmazott módszerek	22
4.3.1	Proteolitikus aktivitás kimutatása agardiffúziós módszerrel	22
4.3.2	Proteáz aktivitás meghatározási módszer	22
4.3.3	A <i>Lactobacillus</i> törzsek szaporodási tulajdonságainak vizsgálata	24
4.3.4	pH mérés	24
4.3.5	Fajlagos szaporodás sebesség meghatározása	24
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	25
5.1	Proteolitikus aktivitás kimutatásának eredményei szilárd tápközegen	25
5.2	Proteáz aktivitás meghatározás eredményei szubmerz fermentációknál	27
5.2.1	Különböző környezeti feltételek hatásai a proteáz enzim szintézisére	27
5.2.2	Proteáz aktivitás meghatározás eredményei rekonstruált tejközegben	29
5.3	Tápközeg összetételek hatása a <i>L. fermentum</i> HA-179 törzs szaporodására	29
5.4	A kísérleti eredményekből levont következtetések	36
5.5	Javaslatok a kutatómunka további folytatására	36
6	Összefoglalás	38
7	Irodalomjegyzék	40
	Köszönetnyilvánítás	43
	Nyilatkozatok	44

1 BEVEZETÉS

Az emberiség évszázadok óta kutatja a hosszú élet titkát, a Kaukázusi népek életmódja és étrendje remek perspektívát kínál ezen „titok” felfedezéséhez. Az Abházok a mai Grúzia területén élő autonóm közösségek, akik hosszú életű népeiről híresek. A kaukázusi emberek életmódjának tanulmányozása során megállapítható, hogy egyik pozitív tényező az étrendjükre vezethető vissza, ugyanis a friss zöldségek és gyümölcsök fogyasztása mellett mindennapi italuk az erjesztett kecske-, tehén-, vagy birkatejből készülő matzoni. Az erjedési folyamatok során az enzimes reakciók vezetnek a tej összetételének változásához. Ezen italok elkészítésében a tejsavbaktériumok - főleg a *Lactobacillus*-ok - játszanak szerepet.

Természeti népekkel ellentétben a modern társadalomban elterjedtek a civilizációs betegségek, melynek gyökere a mozgásszegény életmódban és a helytelen táplálkozásban rejlik. Napjainkban egyre több figyelem irányul az élelmiszerek egészségre gyakorolt hatásaira, amely az élelmiszerkutatás egyik fontos területe, hiszen itt az élelmiszerek összetevői mellett az emberi szervezetre gyakorolt pozitív és negatív hatásai is kimutathatók.

A modern analitikai módszerek kulcsfontosságúak az élelmiszerek összetételének és tulajdonságainak meghatározásában, ezáltal lehetőségünk van az élelmiszerek biológiai hatásainak megértésére és az egészségügyi előnyök pontosabb meghatározására. Az orvostudomány és a táplálkozástudomány együttműködése azt a célt szolgálja, hogy megismerjük az élelmiszer összetevők együttes kölcsönhatásait, biológiai aktivitásukat, valamint az egészségre gyakorolt hatásait és azok következményeit.

Az élelmiszer alapanyagok számos olyan biológiailag aktív összetevőt tartalmaznak, amelyek kiemelkedő fontossággal bírnak az emberi szervezet számára. Ezek közé tartoznak az ásványi anyagok, a prebiotikumok és az antioxidánsok, amelyek kulcsszerepet játszanak az egészség megőrzésében és a betegségek megelőzésében. Az élelmiszerek megfelelő feldolgozása és tárolása létfontosságú ahhoz, hogy megőrizzék tápértéküket, és ne veszítsék el biológiai aktivitásukat. Az élelmiszerfeldolgozás feladata, nemcsak az ízek és textúrák kialakítása, hanem az aktív biológiai hatású összetevők megőrzése is. Ez vezetett a funkcionális élelmiszerek létrehozásához, amelyeket kifejezetten az egészséget támogató célokra fejlesztettek. A funkcionális élelmiszerek olyan élelmiszerek, amelyeket különböző vitaminokkal, ásványi anyagokkal, antioxidánsokkal vagy probiotikumok hozzáadásával dúsítanak. Ezen élelmiszerek nem csupán táplálóak, hanem olyan biológiai hatásokkal is rendelkezhetnek, amelyek elősegítik az egészséges állapot kialakítását és fenntartását.

Az élelmiszerek biológiailag aktív összetevőinek kutatása és hatásmechanizmusaik megértése fontos terület. Az egyik legaktuálisabb kutatási terület az úgynevezett bioaktív peptideinek vizsgálata, amelyek bizonyítottan pozitív hatást gyakorolnak az emberi szervezetre. A bioaktív peptidek olyan fehérje fragmensek, melyek biológiai aktivitással rendelkeznek. Az élelmiszerekben található peptidek egészségügyi előnyeik révén hozzájárulnak táplálékaink funkcionális tulajdonságaihoz. A tejsavbaktériumok fehérjebontó enzimrendszerük révén katalizálják a fehérjék lebontását. A proteolízis szerepet játszik a fehérje hidrolizátumok előállításában is, amelyek során bioaktív peptidek keletkezhetnek. A megfelelő enzimek alkalmazása és környezeti feltételek biztosítása lehetővé teszi a bioaktív peptidek hatékony és célzott előállítását, ami fontos a funkcionális élelmiszerek fejlesztése szempontjából. A bioaktív peptidek számos egészségmegőrző - antioxidáns, immunmoduláló, valamint vérnyomás- és gyulladáscsökkentő – tulajdonságokkal rendelkeznek. Az antioxidánsok segíthetnek a szervezetben csökkenteni a szabad gyökök káros hatásait, hozzájárulva az öregedési folyamatok lelassításához és a krónikus betegségek kockázatának csökkenéséhez. Az immunmoduláló peptidek erősíthetik az immunrendszert és segíthetnek a fertőzések elleni védekezésben.

A *Lactobacillus* fajok proteáz aktivitásának tanulmányozása lehetőséget kínál a különböző funkcionális élelmiszerek kifejlesztésére, amelyek bioaktív összetevőik révén pozitívan befolyásolják az egészséget.

Ezek az ismeretek inspiráltak arra, hogy szakdolgozatom kísérletei során probiotikus *Lactobacillus* törzsek proteáz aktivitását tanulmányozzam, valamint, hogy mélyebb ismereteket szerezzek a proteáz enzim szintézisét befolyásoló környezeti feltételekről.

2 CÉLKITŰZÉS

A tejfehérjék hidrolizátumai olyan funkcionális összetevőket tartalmazhatnak, amelyek pozitívan hatnak az egészségre. A bioaktív peptidnek számos egészségügyi előnyt tulajdonítanak, így nagy jelentőséggel bírnak az élelmiszeripari kutatások és fejlesztések területén. A bioaktív peptidek előállításában és kinyerésében részt vevő proteáz enzimeknek kulcsfontosságú szerepük van, ezért a proteolitikus aktivitással rendelkező mikroorganizmusok részletes tanulmányozása és az enzimes folyamatok optimálása elengedhetetlen feladat. A kutatómunkám célja olyan *Lactobacillus* törzsek szelektálása, melyek proteáz aktivitással rendelkeznek és enzimkészletük révén hozzájárulhatnak a bioaktív peptidek hatékony előállításához. Ennek érdekében a következő részfeladatokat terveztem megvalósítani:

1. Probiotikus *Lactobacillus* törzsek proteolitikus aktivitásának gyors screenelése agardiffúziós módszerrel. Az eredmények alapján egy ígéretes törzs kiválasztása részletes vizsgálat céljából.
2. Proteáz aktivitás meghatározásra alkalmas módszer adaptálása.
3. A kiválasztott törzs proteáz aktivitásának vizsgálata szubmerz fermentációk során különböző környezeti feltételek mellett.
4. A proteáz termelés szempontjából ígéretes *Lactobacillus* törzs különböző összetételű tápközegeken történő szaporodási tulajdonságainak vizsgálata a kapott biomassza hozamok alapján.
5. Összefüggés keresése a különböző tápközeg összetételek és a feltételezhető proteáz aktivitások között.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A tej

A tej az emlős élőlények tejmirigyeinek a váladéka, amely bonyolult összetételű folyadék és az utódok táplálására szolgál. A tej alapvető élelmiszer és a világon a legszélesebb körben forgalmazott termék. A kiegyensúlyozott étrend elengedhetetlen része, mivel számos értékes összetevőt tartalmaz: kalciumot, D-vitamint (dúsított formában), fehérjét, B-vitamint, A-vitamint, riboflavint, és foszfort. Egészségügyi előnyeit a benne található fehérjéknek tulajdonítják, melyek nemcsak a tápértékük, hanem biológiai tulajdonságaik miatt is nagyon fontosak.

3.1.1 A tej összetétele és tejtermékek előállítása

A tej 87%-ban vízből. 4%-ban lipidekből és 9%-ban vízben oldódó vegyületekből (fehérje, laktóz, ásványi anyagok és vitaminok) áll. A tehéntej kémiai összetételét az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat A tehéntej kémiai összetétele (Csapó *et al.*, 2014)

Összetevők	%
víz	87,5
tejcukor	4,6
zsírok	3,8
fehérjék	3,3
ásványi anyagok	0,8
zsírmentes szárazanyag	8,8
szárazanyag	12,5

Kolloidkémiai értelemben a tej polidiszperz emulzió. Diszperziós fázisában találhatóak a fehérjék, melyek vízzoldhatóságuk miatt könnyen szétválaszthatóak, kazeinre és tejsavó fehérjékre. A diszperziós közeg a víz, melyben oldott állapotban vannak az ásványi sók, a vitaminok és a tejcukor. Durva diszperz rendszerét a zsírfázis alkotja. (Csapó *et al.*, 2014)

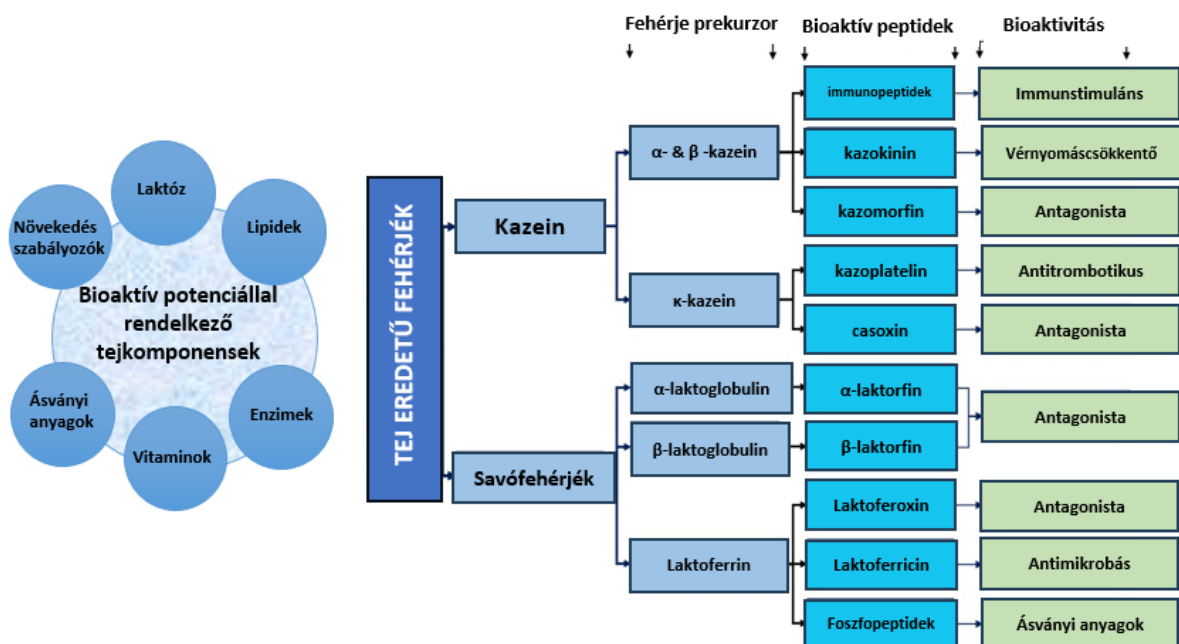
A tej és tejtermékek feldolgozása során a tejfehérjékben fizikai-kémiai változások következhetnek be. A pontos feldolgozási körülményektől függően a tejsavó és/vagy kazein módosulásai magukban foglalhatják a denaturációt, aggregációt, glikációt, oxidációt, térhálósodást, racemizációt és defoszforilációt.

A tejfeldolgozási technológia során homogenizálással csökkentik a tejszírgömbök méretét, így egyenletesen osztható el a tejszír a folyékony tejmátrixban. A pasztörözés célja a kórokozók elpusztítása és az endogén enzimek inaktiválása. A tej hőkezelése során a tejet 72 °C-ra felmelegítik és minimum 15 másodpercig hőn tartják (HTST). A legtöbb országban azonban az ultramagas hőmérsékleten való kezelést (UHT) alkalmazzák, amely során a tejet 135-150 °C-ra melegítik (2 s), így a termék aszeptikus körülmények közötti eltarthatósága tovább növelhető. Az erjesztett tejtermékeket tejsavbaktérium törzsekkel állítják elő. A tejsavbaktériumok tejsavat termelnek, amely csökkenti a pH-t és elősegíti az alvadást, ezenkívül a tejfehérjék is hidrolizálódnak, így tulajdonképpen a növekedésükhöz elengedhetetlenül szükséges aminosavakat és peptideket szabadítanak fel. (Auestad & Laymand, 2021)

3.1.2 Tejfehérjék

A fehérjéket általában húszféle aminosav építi fel, ami tartalmaz legalább egy amino-, és karboxilcsoportot. A fehérjék elsődleges szerkezetét az aminosavak kapcsolódási sorrendje határozza meg, a bennük létrejövő amidkötés, a peptidkötés. A kialakult lánc egyik végén amino- a másik oldalon karboxilcsoport található, ezt N-, és C- terminálisnak is nevezik. Másodlagos szerkezetük α -hélix és β -redők által létrehozott szerkezet, amelyet a peptidlánc gerinc részének atomjai közötti hidrogén hidak biztosítanak. Nemcsak a gerinc között, hanem az oldalláncok közötti kapcsolatok adják a harmadlagos szerkezetét a fehérjéknek. A feltekeredett polipeptid láncok összekapcsolódnak, ez a komplex adja a fehérjék negyedleges szerkezetét. (Szarka & Wunderlich, 2013)

A tehéntejben található fehérjék körülbelül 80%-át a kazein, a maradék 20%-át tejsavó fehérje teszi ki. A kazein, a latin *caseus* szóból származik, ami sajtot jelet. Foszfoproteinek családjába tartozó, hidrofób vegyület. A kazein frakcionálható alfa-S1, alfa S2 kazeinre, béta kazeinre, valamint kappa kazeinre. A tejsavófrakcióban található fehérjék közül a legtöbbet tanulmányozott az alfa-laktalbumin (α -Lac), a laktoferrin és a glikomakropeptid, melyek nagy része bioaktív tulajdonsággal rendelkezik. (Auestad & Layman., 2021) A bioaktív tulajdonsággal rendelkező tejkomponenseket az 1. ábra mutatja.



1. ábra: Bioaktív tulajdonsággal rendelkező tejkomponensek (Murtaza *et al.*, 2022 nyomán)

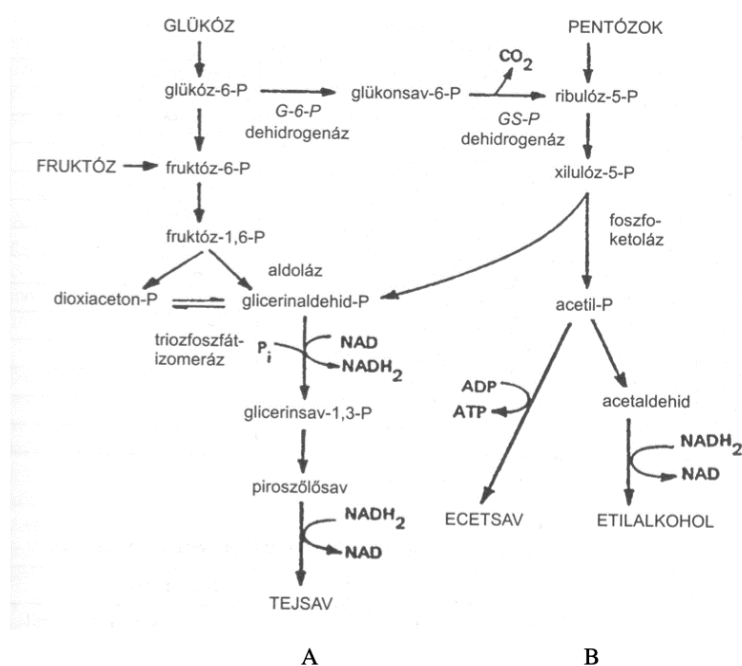
A bioaktivitással rendelkező peptidek hozzájárulnak az emésztőrendszer, szív- és érrendszer, immunrendszer és idegrendszer egészséges működéséhez.

3.2 Tejsavbaktériumok

Tejsavbaktériumok (Lactic Acid Bacteria, rövidítve: LAB) Gram-pozitív, nem spóra képző, pálca vagy kokkoid alakú, aerotoleráns vagy anaerob mikroorganizmusok. A LAB egy nagyon heterogén csoportja a baktériumoknak, amely számos nemzetséget foglal magába. Ezek közös tulajdonsága, hogy a cukrok lebontásakor tejsav keletkezik. A tehéntej tartalmazza az összes vitális tápanyagot a tejsavbaktériumok számára, így komplex tápközegnek tekinthető. A tejiparban a tejsavbaktériumokat starter kultúraként szándékosan adják a tejhez, így számos fermentált tejtermék előállítása válik lehetővé, ezáltal növelhető ezen élelmiszerek eltarthatósága, valamint elfogyasztásuk hozzájárulhat az emésztőrendszer egészséges működéséhez. A tejtermékek előállítása mellett kiemelt szerepük van különböző növényi alapú erjesztett élelmiszerek pl. savanyú káposzta és céklatermékek gyártásában is.

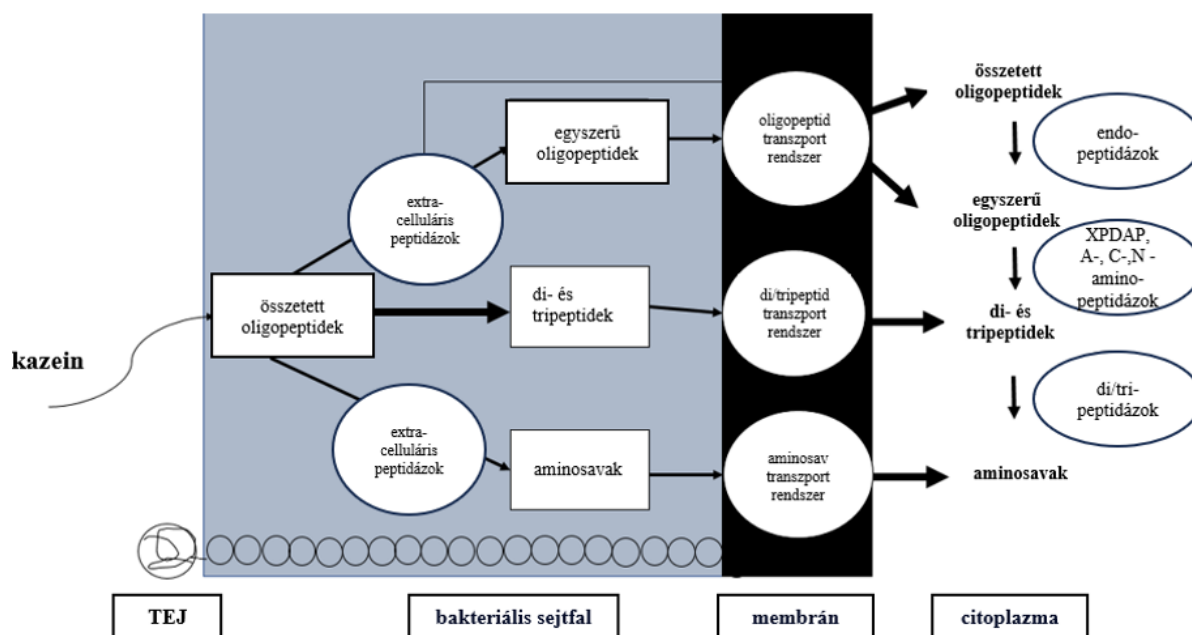
A tejsavbaktériumok energiatermelése a tejsavas erjedés útján valósul meg, azaz a szénhidrátokat oxigén hiányában tejsavvá bontják. A glikolízis során piroszőlősav ($C_3H_4O_3$) keletkezik, amely egy oxokarbonsav, úgy redukálódik, hogy az oxocsoport felvesz két hidrogén atomot, a kettős kötése felszakadása révén hidroxil csoport lesz belőle és ennek eredményeként létrejön a tejsav ($C_3H_6O_3$), azaz egy hidroxil-karbonsav. A tejsavbaktériumok esetében két

útvonalon történhet a szénhidrátok lebontása. Az egyik a homofermentatív útvonal amikor is a lebontás a glikolitikus úton valósul meg és a végtermék tejsav lesz. Heterofermentatív erjedés a pentóz foszfát úton történik. Ebben az esetben a sejtekből hiányoznak az aldoláz és a triózfoszfát-izomeráz enzimek, de ugyanakkor foszfoketoláz enzimmal rendelkeznek. Ez az erjedési mód gázképződéssel jár. A keletkezett végtermékek (etanol, ecetsav és tejsav) változóak lehetnek és különböző mennyiségben fordulhatnak elő. A tejsavbaktériumok glükóz lebontásának lehetséges anyagcsere útjait mutatja az 2. ábra. (Deák, 2006)



2.ábra: (A) homo, és (B) heterofermentatív erjedés folyamata (Deák, 2006)

Mivel a tejsavbaktériumok nem képesek az összes szükséges aminosavat szintetizálni növekedésükhöz, ezért a LAB-nak az erjedési folyamat során le kell bontani a tejfehérjéket peptidekké és aminosavakká, mivel csak a szabad aminosavakat és a kis molekulatömegű peptideket tudják tápanyagforrásként hasznosítani. A fermentáció során keletkező peptidek - amelyeket a baktériumok nem hasznosítanak - a fogyasztók különböző élettani funkcióit támogatják. A metabolizmusuk proteolitikus útvonalak segítségével történik, a fehérjében kötött aminosavak hasznosítását a proteáz és peptidáz enzimkomplex teszi lehetővé (3. ábra).



3.ábra: Kazein lebontása a tejben az aminosavak előállításához (Pritchard & Coolbear, 1993)

3.3 *Lactobacillus* nemzetség

3.3.1 *Lactobacillus* nemzetség taxonómiája

A *Lactobacillus* nemzetség a tejsavbaktériumok egyik kiemelkedő élettani és technológiai jelentőségű csoportja, amely több mint 261 fajt és 29 alfajt foglal magába, amelyek fenotípusuk, ökológiai és genotípusuk tekintetében rendkívül változatosak. A „*Lactobacillus*” általános kifejezés minden olyan organizmus megjelölésére, amelyet Lactobacillák közé soroltak 2020-ig.

Többfázisú megközelítés alapján javasolják a *Lactobacillus* nemzetség 25 nemzetségbe történő átsorolását, beleértve a módosított *Lactobacillus* nemzetséget, amely magában foglalja a gazdaszervezethez adaptálódott *Lactobacillus delbrueckii* és *Paralactobacillus* csoportot és 23 új nemzetséggé emlegetett szervezetet, amelyek a *Holzapfelia*, a *Amylolactobacillus*, a *Bombilactobacillus*, a *Companilactobacillus*, a *Lapidilactobacillus*, a *Agrilactobacillus*, a *Schleiferilactobacillus*, a *Loigolactobacillus*, a *Lacticaseibacillus*, a *Latilactobacillus*, a *Dellaglioia*, a *Liquorilactobacillus*, a *Ligilactobacillus*, a *Lactiplantibacillus*, a *Furfurilactobacillus*, a *Paucilactobacillus*, a *Limosilactobacillus*, a *Fructilactobacillus*, a *Acetilactobacillus*, a *Apilactobacillus*, a *Levilactobacillus*, a *Secundilactobacillus* és a *Lentilactobacillus* elnevezéseket tartalmazzák.

Javasolják továbbá a *Lactobacillaceae* család leírásának módosítását oly módon, hogy magába foglalja az összes nemzetséget, amely korábban a *Lactobacillaceae* és *Leuconostocaceae* családba tartozott. (Zheng *et al.*, 2020)

A dolgozatomban említett és felhasznált törzseket a feldolgozott szakirodalomban fellelhető elnevezésekkel használom.

3.3.2 A *Lactobacillus* fajok előfordulása és felhasználása

A *Lactobacillus*-ok feltételezhetően növényi anyagokról származnak, azonban a kulcsgének elvesztése és horizontális transzfer nagyban hozzájárult a különböző környezeti feltételekhez való alkalmazkodásukhoz. A *Lactobacillus* fajok megtalálhatók az emberi és az állati szervezetekben, előfordulnak a bőrtakarón, a nyálkahártyákon, az emésztő-szervrendszerben, és a nemiszervekben. Izolálhatók növények (zöldségek, gyümölcsök, gabonafélék) felületéről, valamint és fermentált élelmiszerekből is. (Maske *et al.*, 2021)

Fontos szerepük van a szervezet egészséges működésében. Azokat a *Lactobacillus* törzseket, amelyekről klinikai vizsgálatokkal bizonyították, hogy jótékony hatást gyakorolnak az egészség fenntartására és a betegségek megelőzésére probiotikumoknak nevezzük. Ennek céljából széleskörű kutatásokat végeznek a különböző probiotikumok élettani hatásának bizonyítására. A probiotikus termékek széles körben elérhetőek a kereskedelmi forgalomban, amelyek összetevői között szerepelnek *Lactobacillus* törzsek is. A probiotikus termékek között megtalálható számos élelmiszer (tej-, hústermékek, savanyúságok, gyümölcs- és zöldségitalok), étrendkiegészítők és gyógyszerek is. (Mustafa *et al.*, 2020)

3.3.3 A *Lactobacillus* fajok enzimei

A gazdaszervezethez adaptálódott és az emésztőrendszerben honos laktobacillusok képesek az összetett, rezisztens - a szervezet által nem lebontható molekulákat - anyagcseréjükhöz energiaforrásként hasznosítani és jótékony hatást fejtenek ki az emberi szervezetre nézve.

Ezért az emésztő *Lactobacillus* apparátus:

- javítja az élelmiszerek emészthetőségét és a tápanyagok biológiai hozzáférhetőségét
- csökkenti a felszívódási zavarokat és intolerancia mellékhatásait
- jelenlétének köszönhetően olyan funkcionális tulajdonságokkal rendelkező bioaktív molekulák szabadulnak fel, amelyekhez az emberi anyagcsere egyébként nem férne hozzá.

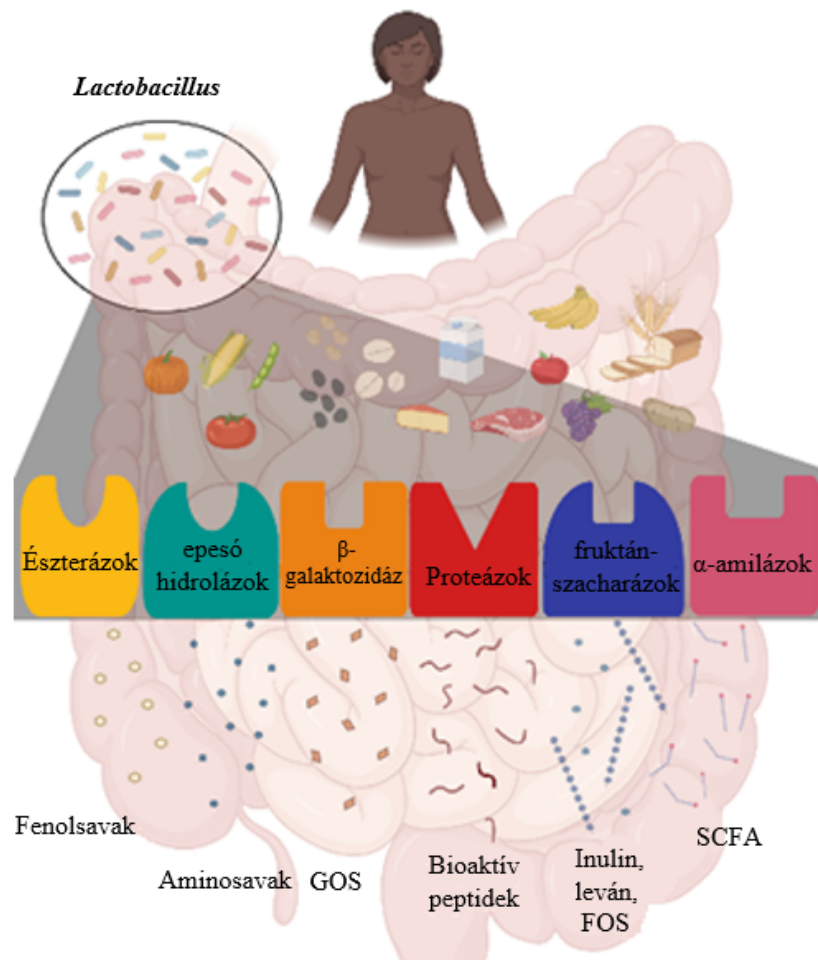
Az enzimaktivitással rendelkező laktobacillusok a szervezetbe kerülésük révén fokozzák az ásványi anyagok felszívódását és a bél homeosztázist, modulálják a bél mikrobiótát, csökkentik

a szisztémás gyulladást és enyhítik a metabolikus szindrómát. A *Lactobacillus* része az őshonos emberi mikrobiótának és széles körben elfogadott a biztonságos fogyasztásra és jelölt probiotikumként történő alkalmazásra (Maske *et al.*, 2021).

A *Lactobacillus* fajok vizsgálata során számos enzim jelenlétét kimutatták, mint például a galaktozidázok, a fruktanázok, az amilázok, az epesó hidrolázok, az észterázok, valamint a proteázok és a peptidázok (Maske *et al.*, 2021). Ezeknek az enzimeknek aktivitása összefüggésbe hozható az emésztő szervrendszerben lejátszódó biokémia folyamatokkal (4.ábra). A proteázokra a 3.4 Proteáz Enzimek fejezetben térek ki.

o β-galaktozidázok

A β-galaktozidáz enzimek - más néven laktázok - kiemelkedő jelentőséggel bírnak, mivel működésük során a tejben található fő szénhidrátot, a laktózt hidrolizálják annak monomerjeire. A laktóz elsődleges energiaforrás minden újszülött számára, mivel nélkülözhetetlen fejlődésükhöz. A β-galaktozidázok elősegítik a kalcium felszívódását, támogatják a bélmikrobióta aktivitását, így növelve a szervezet kórokozókkal szembeni védekezését és a széklet megfelelő anyagmennyiségét. A laktóz hidrolízis termékei - a glükóz és a galaktóz - a bélhámsejteken keresztül felszívódnak és véráramba szállítódnak. Az emberi szervezet születéskor genetikailag meghatározott mennyiségű β-galaktozidáz enzimmal rendelkezik, amely a környezeti tényezőknek hatására, illetve a kor előrehaladtával kimerülhet és felléphet egy enzimhiányos állapot, amelyet laktóz intoleranciának/érzékenységnak nevezünk. A tejcukor érzékenység az egyik leggyakoribb bélrendszeri felszívódási zavar, amely során a laktáz enzim csekély aktivitása miatt a szervezet a laktózt nem tudja lebontani. A laktóz a természetben poliszacharidokhoz, glikoproteinekhez és glikolipidekhez kötött formában fordul elő, szabad alfa és béta formában csak az emlősök tejében található. A laktóz a patkóbélből az éhbélbe jut, és ozmotikus hatás miatt hasmenést okoz. Tovább haladva a csípőbélben és a vastagbélben levő baktériumok okozzák a puffadást és a bélgörcsöket. (Buzas, 2015)



4.ábra: Az emésztőrendszerben honos laktobacillusok enzimei és az általuk kibocsátott bioaktív komponensek (Maske *et al.*, 2021 nyomán)

- *Amilázok*

Általában a tejsavbaktériumok nem rendelkeznek amilolitikus aktivitással, vagyis a keményítőt nem hidrolizálják, azonban néhány újabb irodalom beszámol amilolitikus aktivitással rendelkező *Lactobacillus* törzsekről, amelyeket amilolitikus tejsavbaktériumokként is emlegetnek. (Maske *et al.*, 2021)

- *Fruktánszacharázok, fruktoziltranszferázok*

A fruktoziltranszferáz enzimek egyaránt rendelkeznek leván és inuloszacharáz aktivitással, amelynek révén a szacharóz fruktóz molekulái polimerizálódnak. A fruktozidok esetében a lánc végén szacharóz található és ehhez β -(2, 6) vagy β -(2, 1) glikozidos kötésekkel kapcsolódnak a fruktóz molekulák. (Maske *et al.*, 2021)

○ Fitázok

A fitázok szubsztrátuma a fitát, más néven mioinozitol-hexakisfoszfát (InsP6), amely vegyület a foszfor fő tárolási formája a növényekben (gabonafélék és hüvelyesek). Ugyanakkor a fitát antinutritív vegyület, mert kelátokat képez az étrend által bevitt esszenciális ásványi anyagokkal (például vas, kalcium, magnézium és cink) és fehérjékkel az emberi emésztőrendszerben.

A fitázok defoszforilálják a fitinsavat, ezáltal javítják a táplálék biofelhasználhatóságát, emészthetőségét és szervesen kötött foszfort bocsátanak ki a bélben. Az extracelluláris fitáz növeli a különböző keláttartalmú kationok biológiai hozzáférhetőségét, mint például a vas és a kalcium. A *Lactobacillus* eredetű fitáz aktivitása általában alacsony más baktérium nemzetségekhez képest, mint pl. a *Bacillus* és a *Escherichia*. A laktobacillusok fitáz-pozitív törzsei fokozhatják a végtermékek antioxidáns aktivitását. Ennek az oka még mindig nem tisztázott. Magyarozatként szolgálhat a felhasznált szubsztrátumok szabad fenoltartalma pl. izoflavon a szójatejben. Az antioxidánsokban gazdag élelmiszerek rendkívül jótékony hatást gyakorolnak az emberi egészségre. (Maske *et al.*, 2021)

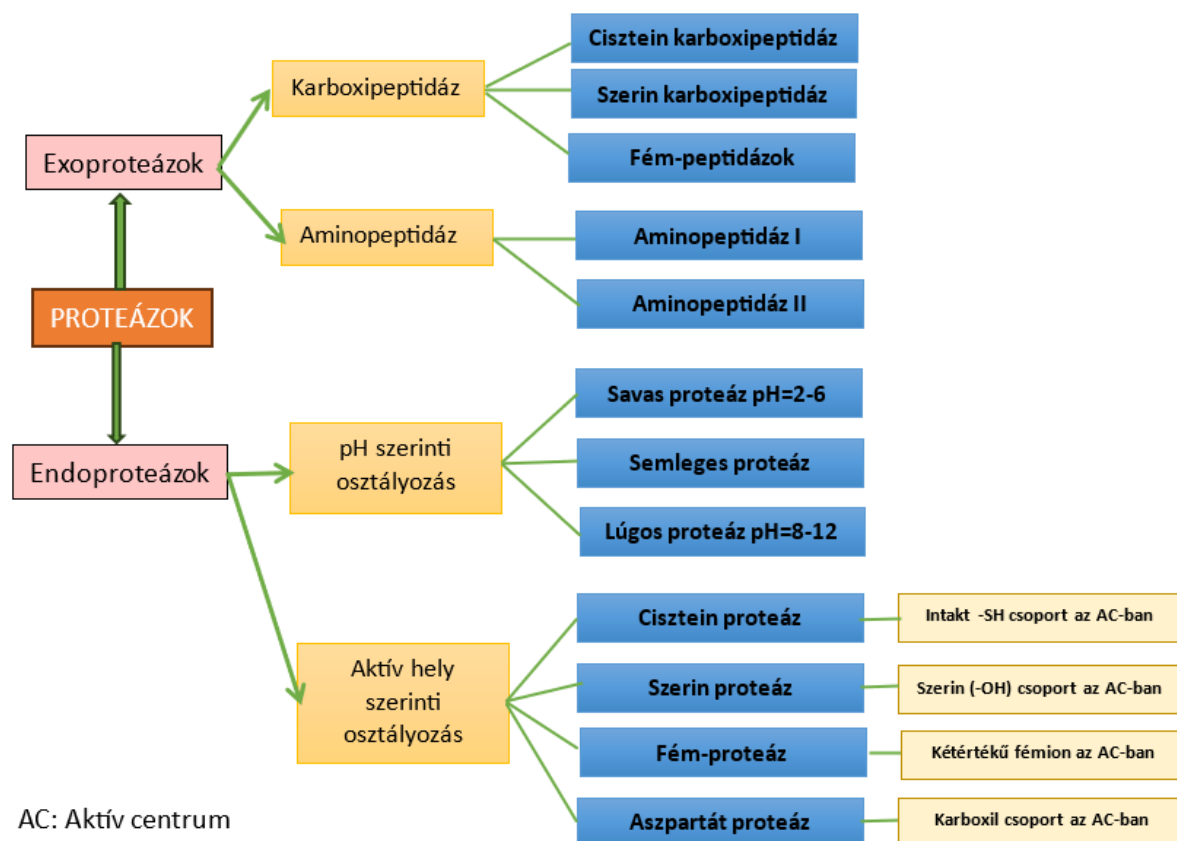
3.4 Proteáz enzimek

A proteázok olyan enzimek, amelyek a fehérjékben és a peptidekben lévő peptid kötésekét hidrolizálják. Az egyik legnagyobb kereskedelmileg és iparilag alkalmazott enzimszoprt. A proteázok megtalálhatók az állatokban és a növényekben egyaránt. Az emésztő enzimek inaktív proenzim formájában termelődnek, és a tápcsatornában válnak aktívvá, az aktiválódás proteolitikus hasítás eredménye. A gyomor sejteji termelik a pepszint pepszinogén formában, amely gasztrin hormon hatására ürül a gyomorba, valamint sósavat is termelnek, így a gyomor kémhatása savas lesz, alacsony pH következtében pedig létrejön az aktív pepszin. Az endogén proteázok két csoportra oszthatóak. Az első csoport az extracelluláris proteázok, melyek a kötőszövetek átrendezésében vagy a fehérvérsejtek sejtek közötti mozgásának segítésére szolgálnak. Másik csoport az intracelluláris proteázok, melyek két útvonalon bontják a fehérjéket, az egyik típus a lizoszómába került fehérjéket bontja, a másik típus pedig a proteoszóma komplexben bont. Az aminosavak ezután különféle átalakulásban vehetnek részt. (Ludány, 2011)

Ugyanakkor a proteázok legfőbb forrásának a mikroorganizmusokat tartják a biokémiai diverzitásuknak és a lehetséges genetikai manipulációjuknak, valamint a gazdasági és technikai előnyöknek köszönhetően (Mustafa *et al.*, 2020).

3.4.1 A proteázok hatásmechanizmusuk alapján történő osztályokba sorolása

A proteázok osztályozhatóak szerkezetük, összetevőik, katalizált reakcióik típusa, aktív helyük és kémiai tulajdonságaik alapján, ezt az osztályozást a 5. ábra mutatja.



5.ábra: Proteázok osztályozása (Ahangari *et al*, 2021 nyomán)

A katalitikus helyük alapján két csoportot különböztetünk meg. Az endopeptidázok az enzimek azon csoportját jelentik, amelyek a molekula belsejében lévő peptidkötéseket hidrolizálják, míg az exopeptidázok olyan proteázok, amelyek a láncvégi aminosavakat hasítják le. Az exopeptidázok esetében megkülönböztetjük a karboxipeptidázokat és az aminopeptidázokat. A karboxipeptidázok a polipeptid lánc szabad C-terminális végén, míg az aminopeptidázok a polipeptid szubsztrátum szabad N-terminális végén hasítanak.

Katalikus tulajdonságaik alapján a proteázokat három csoportba sorolhatjuk: aszpartil/karboxil proteázok, cisztein/tiol proteázok és metallo/szerin proteázok. A legtöbb vizsgált fajnál: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* fajoknál kimutatták az N-terminális aminosav felszabadulását dipeptidekből, tripeptidekből és polipeptidekből is. (Ahangari *et al*, 2021)

- A fémproteázok a legváltozatosabb alcsoportja az endopeptidázoknak és az aktivitásukhoz szükséges kétértékű fémion igényük szerint osztályozzák őket. A különböző metalloproteáz családhoz tartozó enzimek, mint a kollagenázok a magasabbrendű szervezetekből származnak, míg a termolizin baktérium eredetű (Lopez & Monnet, 2011)
- A szerin proteázok aktív centrumában egy szerin csoport található. A szerin proteázok túlnyomó többsége mikroorganizmusokban - baktériumokban, gombákban és vírusokban - fordul elő. Ez is bizonyítja a létfontosságú szerepüket a különböző mikroorganizmusok anyagcseréjében.
- A cisztein proteázok katalitikus aktivitása az aktív centrumban lévő cisztein és hisztidin molekulákhoz köthető. A cisztein proteázok optimális pH-ja a semleges tartományban van. Mind az eukarióta, mind a prokarióta szervezetek szintetizálnak cisztein proteázokat, melyek négy fő csoportba sorolhatóak: (I) papainszerű proteázok, (II) tripszinszerű proteázok, (III) glutaminsav proteázok és (IV) egyéb cisztein proteázok (Manohar *et al.*, 2018).

Az enzimek csoportosíthatóak az aktivitásuk optimális pH-ja szerint is:

- Az alkalikus proteázok lúgos (pH=8-12) tartományban aktívak, amelyeket alkalofil mikroorganizmusok szintetizálnak. Ezen mikroorganizmusok megtalálhatóak a talajban és a vízben is.
- A savas proteázok savas pH-án (3,8-5,6) aktívak és az optimális pH tartományuk 3 és 5 között található. Az aszparagin proteázokat általában savas proteázokként azonosítják. A mikroba eredetű aszparagin proteázokat két osztályra osztják: pepszinszerű és renninszerű enzimekre. Az *Aspergillus niger*, az *Aspergillus oryzae*, az *Aspergillus awamori*, a *Neurospora* és a *Rhizopus* törzsek a pepszinszerű enzimek fő termelői, míg a *Mucor miehei*, a *M. pusillus* és az *Endothia parasitica* fajok a renninszerű enzimeket szintetizálják (Kumar & Bahalla, 2005). A pepszin- és a renninszerű proteázokat főleg a sajtgyártásban és a fermentált tejtermékek előállításánál alkalmazzák.
- A semleges proteázok semleges vagy gyengén savas/lúgos pH értékeken aktívak és stabilak. A cisztein proteázok, a metalloproteázok és néhány szerin proteáz a neutrális proteázok családjába sorolhatóak. A semleges proteázok termelő törzsei a *Bacillus* nemzetségből kerülnek ki.

3.4.2 A *Lactobacillus* nemzetség proteázai és alkalmazási lehetőségei

A baktériumok proteolitikus rendszerei kulcsszerepet játszanak az anyagcserefolyamataikban, a virulenciában, a fehérjeforgalomban, a szabályozási folyamatokban, valamint a fehérjék érése során.

A tejsavbaktériumok (LAB) közül a *Lactobacillus* törzsek a növekedésükhöz szükséges legtöbb aminosavat nem tudják szintetizálni, vagyis auxotrófok.

A *Lactobacillus* törzsek proteolitikus rendszerének kialakulása a tej összetételével hozható összefüggésbe, mivel ez a tápközeg aminosavakban szegény, így a növekedés a proteázok jelenléte nélkül nem tartható fent. (Lopez & Monnet, 2011)

A *Lactobacillus*-ok proteolitikus enzimrendszere proteázokból áll, melyek a sejtfalhoz kötődnek, ezek a tejfehérjéket, többek között a kazeint peptidekké, majd az intracelluláris peptidázok által aminosavakra bontják. A sejtfalhoz kötött és az extracelluláris proteinázok fontosak a *Lactobacillus* számára, hogy a külső fehérjéket elérhetővé tegyék a növekedésükhöz. Az intracelluláris peptidázok pedig létfontosságúak a szabad aminosavak előállításához.

A tejsavbaktériumok proteolitikus rendszere a következő főbb részekből áll:

- egy vagy több sejtfal-proteázból, amelyek a tejfehérjéket 4-30 aminosavat tartalmazó peptidekké hidrolizálják
- peptid szállítási rendszerből, amely oligopeptidkötő fehérjét és két permeázt tartalmaz, valamint két ATPázt, ami energiát szolgáltat a rendszernek
- a lebontáshoz szükséges intracelluláris peptidázokból. (Hafeez *et al.*, 2014)

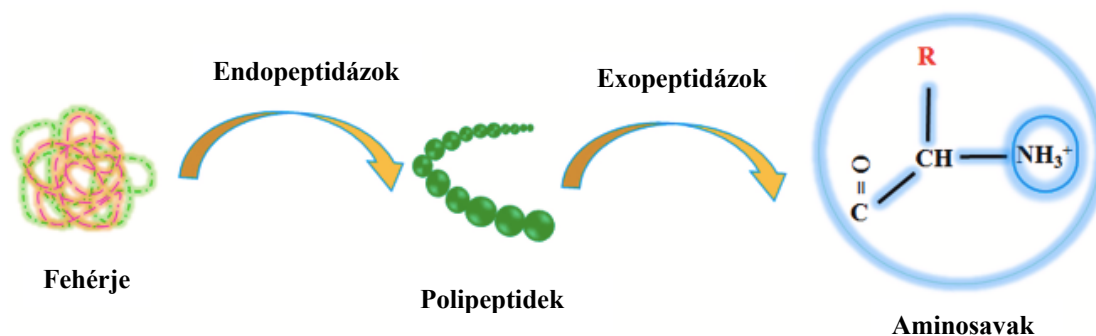
Az aminopeptidázok jelenlétét a legtöbb vizsgált *Lactobacillus* fajban, például *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus cellobiosus* és *Lactobacillus fermentum* fajban kimutatták. A karboxipeptidázok katalizálják a polipeptidekből a C-terminális aminosavak felszabadulását. A *L. casei*-ben kimutatták a karboxipeptidázok (peptidil aminosav hidrolázok, EC 3.4.12) jelenlétét, amelyek katalizálják a polipeptidekből a nem szubsztituált C-terminális végek szabaddá tételét.

A dipeptideket hidrolizáló dipeptidázokat (EC 3.4.13) kimutatták a *L. helveticus*, a *L. acidophilus*, a *L. lactis*, a *L. bulgaricus*, a *L. casei*, a *L. jugurti* és a *L. plantarum* fajokban.

A tripeptidáz (tripeptide aminopeptidase, EC 3.4.11.4) jelenlétéről csupán a *L. casei* és a *L. plantarum* esetében számoltak be.

A proteáz szinonimája a peptid hidroláznak és alkalmazható mind az exopeptidázokra, mind az endopeptidázokra, amíg proteinázt csak azon proteázok megnevezésére alkalmazzák, amelyek endopeptidáz aktivitással rendelkeznek. Endopeptidáz aktivitást mutattak ki a *L. casei* fajban, amelyet a későbbiekben aril-peptidil amidáz (EC 3.5.1) aktivitással is összefüggésbe hoztak. A *Lactobacillus* intra- és sejtfalhoz kötött proteinázait tanulmányozva számos prolinra specifikus exopeptidázt mutattak ki. A prolil aminopeptidáz (EC 3.4.11.5) az N terminális végről prolintartalmú vegyületet hasít le Pro-X formában (X bármilyen aminosavat jelenthet). Ez az enzim megtalálható a *L. bulgaricus*, a *L. helveticus*, a *L. casei*, és a *L. plantarum* fajokban is. (Khalid & Marth, 1990)

A proteázok által katalizált reakciók és a végtermékként keletkező aminosavakat a 6. ábra mutatja.



6. ábra: A proteázok által katalizált reakciók és a végtermékként keletkező aminosavak (Ahangari *et al.*, 2021)

3.5 Bioaktív peptidek

A bioaktív peptidek az aminosavláncok azon fehérjefragmensei, melyek szabályozzák az élettani folyamatokat, valamint inaktív formában a fehérje láncban rögzítettek. (Davodii *et al.*, 2016). A fehérjék élelmiszerekből is izolálhatóak, és kereskedelmi forgalomban lévő peptidázokkal hidrolizálhatóak, melyek nagy mennyiségű bioaktív peptideket képesek felszabadítani. Az előállított peptidek tovább hidrolizálhatóak a gasztroenterális emésztés során, ezeknek a peptideknek fel kell szívódnuk a bélgáton keresztül, majd el kell jutniuk a véráramba, hogy kifejtsék hatásukat. (Toldrá, *et al.*, 2018)

3.5.1 Bioaktív peptidek élettani hatásai

A bioaktív peptidek bevitele pozitívan hat az emésztőrendszerre, az idegrendszerre, az endokrin rendszerre, az immunrendszerre és a szív és érrendszerre, így nagyban hozzájárulnak az

egészség megőrzéséhez. Jelenleg a tejfehérjéket tekintik a bioaktív peptidek fő forrásának. Ezen peptidek megtalálhatóak számos fermentált tejtermékben, mint például a joghurt, a savanyú tej vagy a kefir. (Hafeez *et al.*, 2014)

A bioaktív peptidek jótékony hatásai (Dos Santos Aguilar & Sato, 2018):

- Antioxidáns hatás

A túlzott mennyiségű reaktív gyök sejtkárosodást okozhat, ami számos betegséget indít el. Az antioxidánsok olyan anyagok, amelyeket a reaktív anyagok eltávolítására és a káros folyamatok gátlására és/vagy csökkentésére használnak.

Az antioxidáns tulajdonságú peptidek hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, de feltételezhető, hogy a lipid-peroxidáció gátlóiként, a szabadgyökök megkötőjeként működhetnek, mint átmeneti fém kelátképzők vagy sejtvédő szerek. Az aminosavak, mint a hisztidin, a prolin, a tirozin és a triptofán antioxidáns hatással rendelkeznek főleg az N-terminális pozícióban. A hisztidin erős gyökfogó képessége az imidazol gyűrűnek köszönhető. Ezenkívül a hidrofób aminosavakat tartalmazó peptidek antioxidáns aktivitása elsősorban az elektrontöbblet miatt használható fel a szabad gyökök eltávolítására vagy a fémkationok csökkentésére.

- Vérnyomáscsökkentő aktivitás

A vérnyomás szabályozásának fő mechanizmusa az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE), amely katalizálja az angiotenzin I átalakulását angiotenzin II hormonná, amely serkenti az érszűkületet és növeli a vérnyomást. Az ACE-gátlók blokkolják ezt az átalakítást és általános kezelési lehetőségként szolgálnak a magas vérnyomásban szenvedő betegek számára (Auestad & Layman 2021).

- Antimikrobás hatás

Az antimikrobás hatású peptidek kis molekulák, amelyek antibakteriális, gombaölő, parazita ellenes és antivirális aktivitással rendelkeznek. Ezek a peptidek a sejtmembrán károsodását okozzák az elektrosztatikus erőknek köszönhetően az aminosavak pozitív és sejtfelszín negatív töltései között.

- A fehérje hidrolizátumok funkcionális tulajdonságai

A fehérjék funkcionális aktivitása kiemelt szerepet tölt be az élelmiszerek elkészítése, feldolgozása, tárolása és fogyasztása során. A fehérjék különböző funkcionális jellemzői hidrolízis után módosulhatnak, mint például a viszkozitás, diszpergálhatóság, oldhatóság, habzás, és emulgeálhatóság, amelyek kedvezően hatnak a különféle termékek tulajdonságára nézve.

3.5.2 A bioaktív peptidek fehérjékből történő előállítási lehetőségei

A bioaktív peptidek fehérjékből való előállítására többféle módszert dolgoztak ki:

- A mikrobiális fermentáció hatékony és gazdaságos módszer a peptidek előállítására, amelyet széles körben alkalmaznak a peptidek tejtermékekből történő kinyerésére. A *Lactobacillus* törzsek proteolitikus enzimrendszerük segítségével a kazein és tejsavófehérje hidrolízise során különböző bioaktív peptideket szabadítanak fel, mivel elsődleges forrásként a tejfehérjékből veszik fel az anyagcseréjükhez szükséges esszenciális aminosavakat. Általában a tejsavbaktériumok fermentációja természetes és ellenőrzött körülmények között történik, ami javítja az élelmiszerek technológiai és táplálkozási tulajdonságait, és végső soron kialakítja az élelmiszerek textúráját és ízét.
- Enzimes hidrolízis
A bioaktív peptidek előállítása megvalósulhat előzetesen kinyert és tisztított fehérjék enzimés hidrolízise révén. Ezen enzimek lehetnek állati, növényi vagy mikroba eredetűek. Az enzimés hidrolízis hatékonyságának eredménye leginkább két tényezőtől függ: a kiindulási fehérje (szubsztrátum) elsődleges szerkezetétől és az alkalmazott enzim specificitásától. Az enzimés hidrolízisnek bizonyos hiányosságai is vannak, mint például a tiszta bioaktív peptidek előállításának magasabb költsége és a kazein koagulációja, ezért alkalmazás előtt figyelembe kell venni az enzimés hidrolízis körülményeinek megválasztását.
- Számos tanulmány kimutatta, hogy a tej feldolgozása során bizonyos előkezelési módszerek (ultrahangos, mikrohullámú és nagy hidrosztatikai nyomáson történő kezelés) növelhetik a bioaktív peptidek hozzáférhetőségét és kinyerését, azáltal, hogy fokozzák az enzimés módszerek hatékonyságát. (Murtaza *et al.*, 2022)

3.5.3 *Lactobacillus* törzsek szerepe a tejfehérje eredetű bioaktív peptidek képzésében

Az aktuális trend - a peptid kutatások területén - olyan peptidek előállítása, amelyek bioaktív és funkcionális tulajdonsággal rendelkeznek, valamint iparilag felhasználhatók (Dos Santos Aguilar & Sato 2018).

A *Lactobacillus helveticus* egy homofermentatív, termofil starter baktérium, amelyet tejtermékek előállításánál használnak. Részt vesz az aroma és az állomány kialakításában, valamint a végtermék egészségügyi hatásait is javítja. Számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amely megkülönbözteti az általánosan alkalmazott starterkultúrától, beleértve a galaktóz metabolizmust, a jelentős erjesztési képességet és az erőteljes proteolitikus aktivitást.

A *L. helveticus* fajjal erjesztett termékekben lévő bioaktív komponensek antimikrobás, antioxidáns, vérnyomáscsökkentő, rákellenes, emésztést elősegítő, pszichobiotikus és immunstimuláló hatással rendelkeznek (Chelladhuraia *et al.*, 2023).

A *Lactobacillus helveticus* törzsek és nyers proteáz kivonataik a tejfehérjéből az angiotenzin konvertáló enzim gátló, antioxidáns és immunmoduláló peptidek képződéséhez vezetett.

A *L. helveticus* 1188 törzs nyers proteáz kivonata által képzett peptidek szignifikánsan nagyobb antioxidáns kapacitást mutattak, mint a többi törzsből származó peptidek. Ezek a peptidek differenciáltan stimulálták a humán perifériás vér mononukleáris sejtjeit, amelyek a legnagyobb interleukin-10 termelést indukálják, míg a *L. helveticus* 474 törzs proteáz kivonata jelentős interferon- γ indukciót eredményező peptideket képez. Ezek a törzsek potenciálisan felhasználhatóak különböző funkcionális fermentált élelmiszertermékek fejlesztéséhez. (Elfahri *et al.*, 2014)

A tejfehérje kicsapását, illetve emésztését, a gyomor által termelt rennin enzim segíti. A tejiparban a tej alvadását segítik a tejoltók, melyek fehérjebontó enzimeket tartalmaznak. A rennin vagy a kimozin az oltóban található proteáz, melyet kérődzők oltógyomra állít elő. Ezen enzimek elősegítik, hogy a tej mindaddig a gyomorban maradjon amíg a bontás végbemegy. Tejoltó hatására a kazein kicsapódik, így a tej megalszik, kemény túró és savót kapunk. Ez a tejoltó drága, ezért gazdaságosabb, különböző forrásból származó oltópótlókra van szükség.

Egyes mikroorganizmusok képesek olyan proteázt termelni, melyek hasonló tulajdonsággal rendelkeznek, mint a rennin. A renninszerű proteáz (Rennin-Like Protease-RLP), másik nevén tejalvasztó enzim (Milk Clotting Enzyme-MCE) helyettesítőként is alkalmazható (Putranto & Suhartono, 2020). Bakasamból izolált *Lactobacillus plantarum* segítségével nagy fajlagos aktivitású extracelluláris renninszerű proteáz állítható elő.

A tripszin (EC 3.4.21.4) a legfontosabb szerin proteázok közé tartozik. Ez az enzim számos gerinces emésztőrendszerében megtalálható, amelyet a hasnyálmirigy állít elő, a nyombélbe választódik ki és a fehérjét az emésztési folyamat során peptidekké hidrolizálja. Más élettani funkciókban is fontos szerepet játszik, mint például a jelátvitelben és az immunválaszban. A tripszint számos egyéb célra is használják, beleértve az élelmiszer-feldolgozást, a gyógyszereket, a diagnosztikai és biokémiai vizsgálatokat.

A tripszin különösen nagy figyelmet kapott a dipeptidil-peptidáz-inhibitorok azonosításában a természetes fehérjeforrások hidrolízisén keresztül.

A tripszinnel azonos funkciókat ellátó proteáz enzimek a tripszinszerű (trypsin-like – TLP) proteázok. A TLP egyik lehetséges forrásának tekintik a tejsavbaktériumokat. A mikrobák e csoportja GRAS státusszal rendelkezik, ami azt jelenti, hogy biztonságosan használható

élelmiszerek előállításánál. Néhány tanulmány beszámol a *L. plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896 probiotikus törzs TLP termeléséről.

Kétségtelenül a tejfehérjék hidrolízise különböző peptidek létrejöttéhez vezet. A tejfehérjékből előállított új bioaktív peptidek megismerése és azok hatásainak feltárása egyre bővülő ismeretanyaghoz vezet. Ez kiinduló pontja lehet új funkcionális élelmiszerek fejlesztésének, amelyek hozzájárulnak bizonyos betegségek kialakulásának megakadályozásához és kezeléséhez, úgy, mint a magas vérnyomás, a kettes típusú cukorbetegség, az elhízás és a tágabb értelemben vett metabolikus szindrómák. (Hafeez *et al.*, 2014)

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált törzsek

Kísérleteimben tizenhét probiotikus *Lactobacillus* törzset használtam, amelyet a 2. táblázatban mutatok be.

2.táblázat: Felhasznált törzsek

Fajnév		Törzs jelölése
2020 előtti megnevezés	2020 utáni besorolása (Zheng <i>et al.</i> , 2020)	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	150*
		La 05*
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	HA 112**
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactocaseibacillus casei</i>	01*
<i>Lactobacillus crispatus</i>		HRC01***
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	HA-179**
		LF08***
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lafti L10**
		R-52**
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	299v*
		HA-119**
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	HA-188**
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CG ATCC 53103***
		HA-111**
		Rosell-11**
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	CRL 1328**

Beszerezési helyek: *Christian Hansen **Lallemand Health Solutions ***Probiotal S.p.A.

4.2 Felhasznált tápközegek

MRS (de Man, Rogosa és Sharpe) tápleves

A törzsek felszaporításához és fenntartásához MRS táplevest használtam. Összetételét a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: MRS összetétele

Összetevők	Mennyiség
Tryptone	10 g
Húskivonat	8 g
Élesztő kivonat	4 g
Glükóz	20 g
Nátrium-acetát	5 g
Triammónium-citrát	2 g
MgSO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MnSO ₄	0,05 g
Tween 80	1 g
Desztillált víz <i>ad</i>	1000 ml

Módosított Bushnell Haas (BHM) és a tejporos tápagarok összetételei

A proteolitikus aktivitás jelenlétének kimutatására BHM (4. táblázat) és tejporos (5. táblázat) tápagart alkalmaztam.

4. táblázat: A BHM és tápagar összetétele

Összetevők	Mennyiségek
glükóz	5 g
kazein	1 g
élesztőkivonat	3 g
pepton	5 g
agar-agar	20 g
desztillált víz <i>ad</i>	1000 ml

Sterilezés 121°C-on 20 percig

5. táblázat: Tejporos tápagar összetétele

Összetevők	Mennyiségek
tejpor	10 g
agar-agar	13 g
desztillált víz <i>ad</i>	1000 ml

Sterilezés 121°C-on 20 percig

4.3 Alkalmazott módszerek

4.3.1 Proteolitikus aktivitás kimutatása agardiffúziós módszerrel

A felolvasztott tápagart steril körülmények között Petri csészébe öntöttem, és a megszilárdulását követően 8 mm átmérőjű lyukakat fúrtam a lemezekbe, majd 50 µl előzetesen felszaporított folyadéktenyészetet pipettáztam a lyukakba. Ezt követően a Petri csészéket 37 °C- on, 24 órán keresztül inkubáltam. A proteolitikus aktivitást a telepek körül megjelenő feltisztulási zónák jelezték.

4.3.2 Proteáz aktivitás meghatározási módszer

Az enzimaktivitás mérést Jellouli és munkatársai (2009) által leírtak szerint valósítottam meg. A meghatározáshoz szubsztrátumként 1 (m/v) %-os kazein oldatot használtam, melyet Na-foszfát pufferben (pH 5,8) oldottam fel. Az aktivitás mérése során a 6. táblázatban szereplő mennyiségeket (a minta kivételével) kémcsövekbe mértem, majd a kémcsöveket 5 percre, 55°C-ra előmelegített vízfürdőbe helyeztem. Az előinkubálást követően a reakciót 2 ml sejtmentes felülúszó (enzim) hozzáadásával indítottam, majd 5 perces reakcióidő elteltével az

enzimes reakció leállítására az elegyhez 2 ml 20 %-os triklór-ecetsavat (TCA) adtam. Ezt követően a mintákat 15 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd a csapadék elválasztása végett lecentrifugáltam (10000 rpm, 15 perc). Ezután a műszervakra nullázott spektrofotométerrel 280 nm-en megmértem a reakcióelegyek abszorbanciáját.

A kalibráció felállításához 1,1 mM L-tirozin törzsoldatot használtam. A törzsoldat hígítását desztillált vízzel végeztem, majd 280 nm-en mértem a sorozat abszorbanciáját (7. ábra). A kalibrációt három ismétléssel határoztam meg.

Egy egységnyi az az enzim mennyiség, amely 1 µg tirozint szabadít fel 1 perc alatt a mérés körülményei között.

6. táblázat: Reakcióelegy összetétele

	Szubsztrátum	Enzim	Desztillált víz	TCA
Műszervak			4 ml	2 ml
Szubsztrátvak	2 ml		2 ml	2 ml
Minta	2 ml	2 ml		2 ml
Mintavak		2 ml	2 ml	2 ml

Az enzimaktivitás kiszámításához a következő képletet használtam:

$$\text{Aktivitás (U/ml)} = \frac{(\text{minta \textit{átlag}} - \text{enzimvak} - \text{szubsztrátvak}) * V_r * h}{V_m * t * \text{meredekség}}$$

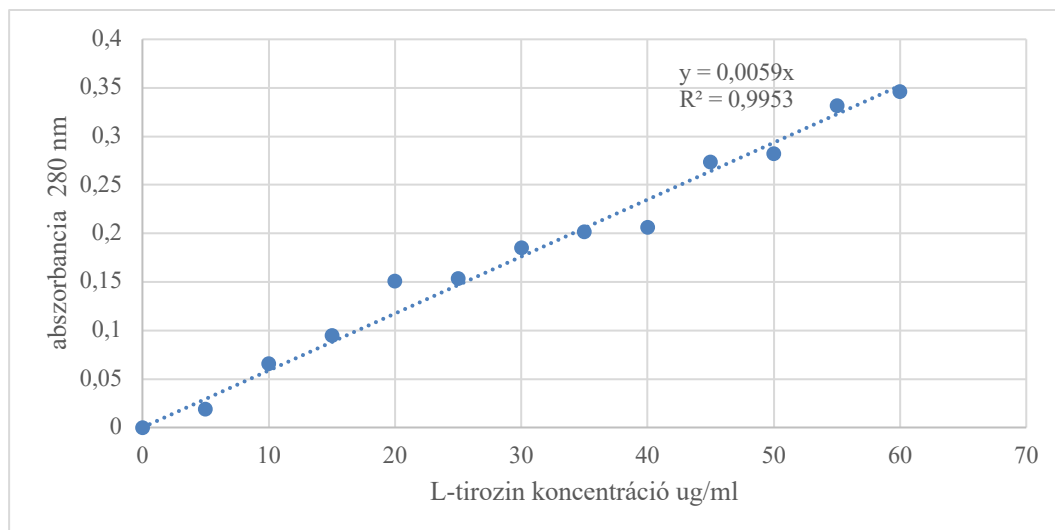
V_r : a reakcióelegy térfogata (ml)

h : hígítás

t : reakció időtartama (perc)

meredekség: a felszabadított termék (L-tirozin) kalibrációs egyenesének meredeksége

V_m : a minta (enzimoldat) térfogata (ml)



7.ábra: L-tirozin kalibrációs egyenese

4.3.3 A *Lactobacillus* törzsek szaporodási tulajdonságainak vizsgálata

A tenyésztést meghatározott tápközeg összetételeket alkalmazva termosztálható Multiskan Sky 1.00.58 készülékben valósítottam meg. A vizsgált *Lactobacillus* törzs szaporítását 96 lyukú plate lemezekon vizsgáltam. Az meghatározott összetételű tápoldatokból 200-200 µl-t mikropate lemezre pipettáztam, majd a tápoldatokat 1%-nyi 24 órás inokulum tenyészzettel beoltottam. A sejtek szaporítását 37 °C-on 24 órás időtartamig végeztem és 15 percenként 600 nm történő optikai denzitás méréssel követtem. A kapott eredményeket SkanIt Software RE 6.1.1.7 szoftver segítségével dolgoztam fel.

4.3.4 pH mérés

A mérést Mettler Toledo pH mérővel végeztem, melyet pH= 4 és pH=9 puffer oldatokkal naponta kalibráltam.

4.3.5 Fajlagos szaporodás sebesség meghatározása

A fajlagos szaporodási sebesség (μ) értékeit a logaritmizált OD értékek által meghatározott szaporodási görbék exponenciális szakaszára a legkisebb négyzetek módszerével illesztett egyenesek meredeksége adja. A szaporodási görbe exponenciális szakaszára vonatkozó generációs idő (t_{gen}) a fajlagos szaporodási sebesség ismeretében a $t_{gen} = \ln 2 / \mu$ összefüggés alkalmazásával kiszámítható.

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

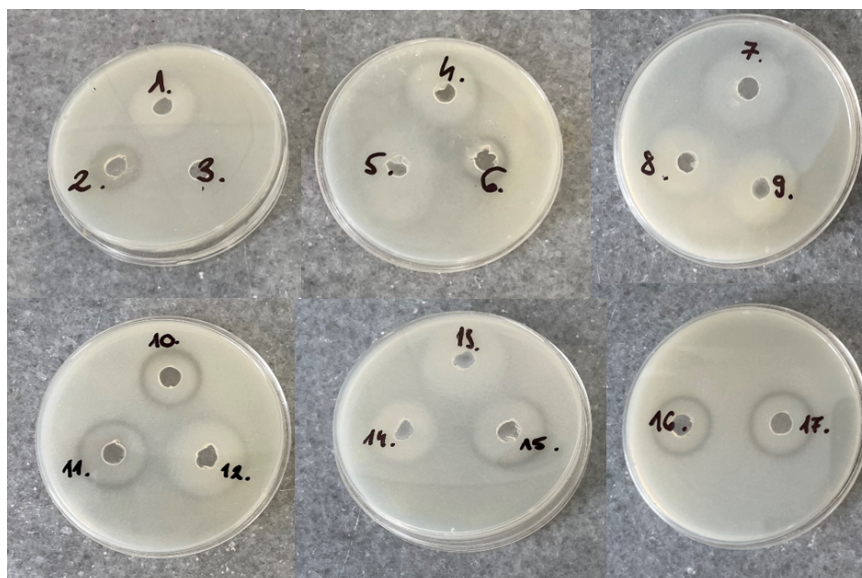
5.1 Proteolitikus aktivitás kimutatásának eredményei szilárd tápközegen

A proteolitikus aktivitás kimutatását agar diffúziós módszerrel vizsgáltam. Először Oladejo és munkatársai (2020) által közölt eljárást követtem. Ebben az esetben a vizsgált probiotikumok jelentős növekedést mutattak, ugyanakkor nem tapasztaltam kimutatható kazein bontást, amely jelezte volna a proteolitikus aktivitás jelenlétét. Ennek magyarázatát abban látom, hogy az alkalmazott BHM tápközeg - a kazein mellett - gazdag szerves nitrogén-tartalmú összetevőkben (élesztőkivonat, pepton), amelyek könnyen felvehető nitrogénforrást biztosítanak a növekedéshez. Ezen tapasztalat arra indított, hogy olyan környezetet hozzak létre, ahol a törzsek növekedéséhez szükséges a tejfehérje bontás. Ezért a következő kísérletben csupán tejport tartalmazó agaron vizsgáltam a *Lactobacillus* törzsek aktivitását. A kapott eredményeket a 7. táblázat összegeztem és a 8. ábrán szemléltetem.

7. táblázat: *Lactobacillus* törzsek növekedési és proteolitikus aktivitásra utaló feltisztulási zónái

Sor-szám	Törzs	Feltisztulási gyűrű szélessége [cm]	Növekedési zóna átmérője [cm]
1	<i>Lactobacillus brevis</i> HA 112	0,2	2,05
2	<i>Lactobacillus fermentum</i> HA-179	1,1	-
3	<i>Lactobacillus helveticus</i> Lafti L10	-	-
4	<i>Lactobacillus helveticus</i> R-52	0,2	2,10
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> HA-119	0,2	2,10
6	<i>Lactobacillus reuteri</i> HA-188	0,1	1,05
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HA-111	0,2	2,05
8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Rosell-11	-	1,70
9	<i>Lactobacillus salivarius</i> HA-118	-	1,80
10	<i>Lactobacillus crispatus</i> HRC01	0,2	1,40
11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	0,2	1,65
12	<i>Lactobacillus salivarius</i> CRL 1328	0,1	1,90
13	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF08	0,1	2,60
14	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	0,1	1,65
15	<i>Lactobacillus casei</i> 01	0,2	1,65
16	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-05	0,1	1,50
17	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 150	0,1	1,30

A táblázatban szereplő értékek két párhuzamos vizsgálatból származó mérések átlagai



8. ábra: A *Lactobacillus* törzsek növekedési zónáinak és a körülvevő feltisztulási gyűrűk szemléltetése tejporos agaron

A vizsgálatokba bevont *Lactobacillus* törzsek faj szerinti megoszlása a következő volt: három *L. rhamnosus* törzs, két-két *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. salivarius* és *L. acidophilus* törzs, valamint egy-egy *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. casei* és *L. crispatus* törzs. Az *L. rhamnosus* törzsek aktivitása között jelentős különbséget tapasztaltam, a Rosell-11 és a GG jelzésű törzsek hasonló növekedést mutattak, ugyanakkor a Rosell-11 törzsnél feltisztulási gyűrűt nem tapasztaltam. A HA-111 és a GG törzsek esetében azonos méretű feltisztulási gyűrűket detektáltam, de a HA-111 törzs jobb szaporodó képességgel rendelkezett. A két *L. fermentum* törzs szaporodó képessége ellentmondásosan alakult, míg az LF08 törzs az összes vizsgált törzs közül a legnagyobb növekedést mutatta és a kialakult telepet feltisztulási gyűrű vette körül, addig a HA-179 jelzésű törzsnél növekedési zóna nem jelent meg, de a legnagyobb feltisztulási zónát itt tapasztaltam. A két *L. helveticus* törzs szaporodó képességében is jelentős eltérés mutatkozott. A Lafti L10 törzs a tejporos tápközegen nem szaporodott, ami arra utal, hogy e tápközeg nem biztosított elegendő tápanyagot a törzs számára. Ezzel szemben az R-52 törzs jó szaporodó képességgel és proteolitikus aktivitással rendelkezett. A két *L. plantarum* törzs hasonló aktivitást mutatott, ugyanakkor a HA-119 törzs jobb szaporodó képességgel rendelkezett. A két *L. salivarius* törzs hasonló méretű telepeket hozott létre. A két *L. acidophilus* törzs hasonló tulajdonságokat mutatott, amely azzal magyarázható, hogy mindkét törzset fermentált tejtermékekben használják starterkultúráként.

A vizsgált *Lactobacillus* törzsek aktivitásában tapasztalt jelentős különbségek azok eltérő tápanyagigényeivel és előéletükkel magyarázható. A további kísérletekhez a lassan szaporodó, de jó proteolitikus aktivitást mutató *Lactobacillus fermentum* HA-179 törzset választottam.

5.2 Proteáz aktivitás meghatározás eredményei szubmerz fermentációknál

A proteáz aktivitás meghatározásához a 4.3.2. pontban ismertetett és Jellouli és munkatársai (2009) által közölt módszer adaptáltam és alkalmaztam.

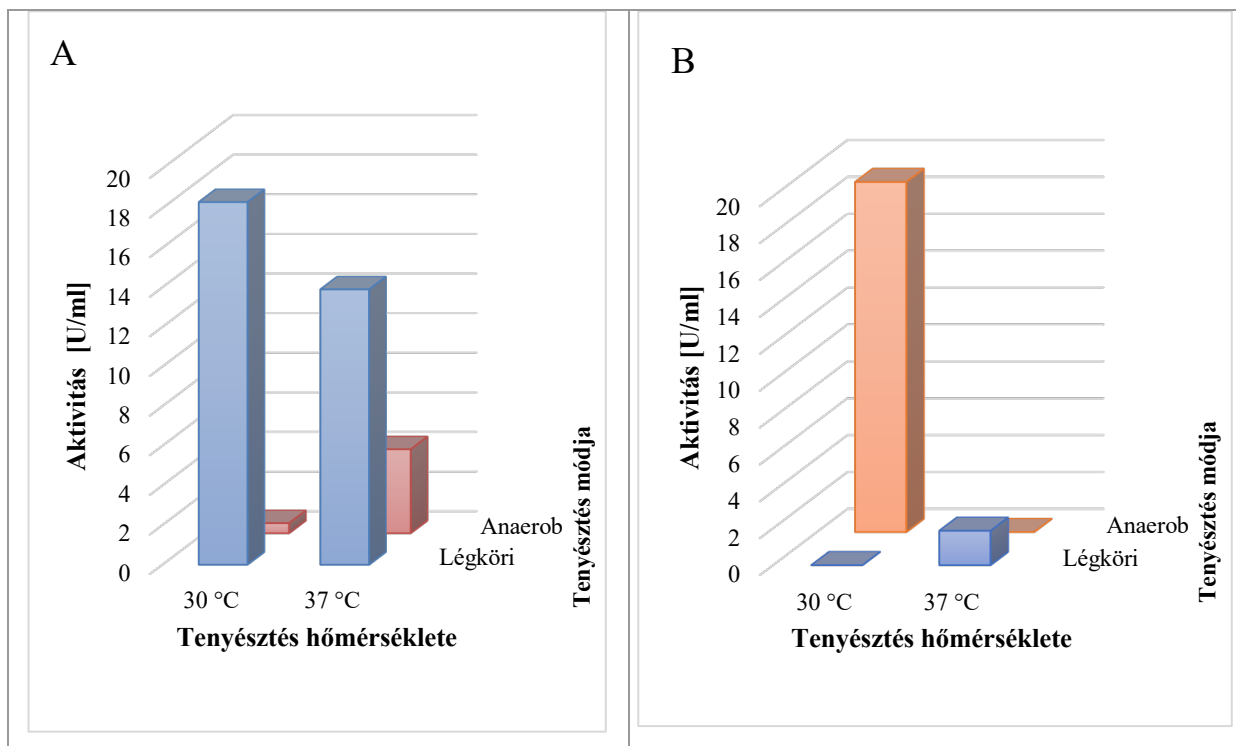
5.2.1 Különböző környezeti feltételek hatásai a proteáz enzim szintézisére

A környezeti feltételek hatását vizsgáltam a *L. fermentum* HA-179 törzs proteáz termelésére nézve, beleértve a tápközeg összetételét. Ehhez a 8. táblázatban bemutatott tápközegeket terveztem.

8. táblázat: A *L. fermentum* HA-179 törzs proteáz aktivitásának kimutatására alkalmazott tápközegek

Jelölés	Glükóz	Tejpor
Glükóz	5 g	-
Kazein	1 g	1 g
Tejpor	1 g	5 g
Élesztőkivonat	3 g	3 g
Pepton	5 g	5 g
Desztillált víz	1000 ml	

A proteáz enzim indukálására mindkét vizsgált tápleves kazeint tartalmazott, valamint azonos mennyiségben tartalmaztak élesztőkivonatot és peptont. A tejporos tápközeg 0,5 % tejport tartalmazott a fent említett összetevők mellett, míg a glükózos tápközegben 0,5 % glükóz mellett 0,1% tejpor volt jelen. A fermentációkat MRS táplevesben felszaporított inokulum 1 tf %-nyi mennyiségével indítottam. A 24 órás fermentációkat 30 és 37 °C-on, légköri nyomáson, valamint anaerob környezetben vezettem. A kapott eredményeket 9. ábra szemlélteti.



9. ábra: Proteáz aktivitás 24 órás fermentációban különböző környezeti feltételek mellett
A: tejporos tápleves B: glükózos tápleves

A 9. ábrán látható eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a tenyésztési körülmények jelentős hatással vannak a törzs enzimaktivitásának alakulására, ugyanis a glükózos tápközegben 30°C-on végzett aerob tenyésztés, illetve a 37°C-on végzett anaerob tenyésztés esetén sem tapasztaltam aktivitást, viszont 30°C-on anaerob körülmények között jelentős mértékű proteáz aktivitást (19 U/ml) sikerült elérni.

A glükóz mentes, növelt tejpor tartalmú tejporos tápközegben eltérő mértékben ugyan, de minden esetben sikerült enzimaktivitást kimutatni. A legnagyobb mértékű aktivitást aerob körülmények között, 30°C-on (18 U/ml) és 37°C-on (14 U/ml) végzett tenyésztés során sikerült elérni. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy meghatározó lehet az enzimaktivitások szempontjából, hogy a baktérium sejtek mely szaporodási fázisban vannak. Továbbá az is megállapítható, hogy a tejporos tápközeg alkalmazása esetében felesleges anaerob körülmények biztosítása. Sajnos ezeket az eredményeket ismételt kísérletek során, ahol az enzimszintézis időbeni változását kívántam feltárni nem sikerült megerősíteni. Ennek feltehetően az volt az oka, hogy a fehérjében és peptidekben gazdag tápközegben problémát okozhatott az aktivitás 280 nm-en való meghatározása.

Sun és munkatársai (2020) *Lactobacillus fermentum* R6 törzs proteáz termelését MRS tápközegben vizsgálva hasonló nagyságrendű aktivitást értek el, amely 37°C-on a fermentáció 48. órájában 26,4 U/ml volt. A szerzők is kiemelték a környezeti feltételek optimálásának

fontosságát a megfelelő proteáz szintézis biztosításához. Ezek közül a tenyésztési hőmérsékletet és az indulási pH érték szerepét hangsúlyozták.

Ennek figyelembevételével két utat jelöltem ki a kutatómunka továbbfejlesztésére:

- Modell kísérletek végzése rekonstruált tejközegben, mivel a távlati cél a tejfehérjékből származó bioaktív peptidek előállítása.
- Tápközeg kísérleteket tervezése, ahol glükóz mellett a fehérje eredetű összetevők koncentrációját kívántam csökkenteni annak kimutatására, hogy ez milyen hatással van a törzs szaporodó képességére.

5.2.2 Proteáz aktivitás meghatározás eredményei rekonstruált tejközegben

Irodalmi adatok alapján 12,5 %-os szárazanyag-tartalmú közeget készítettem soványtejporból, amelyet sterilizést és 37°C-ra történő lehűtést követően közvetlenül oltottam be starterkultúrából. A kiindulási tejközeg kémhatása pH=6,7 volt. 24 órás időtartamú fermentációt vezettem, melynek során a 6. és 24. órában vettem mintákat. A kísérleti eredményeket a 9. táblázatban összegzem.

9. táblázat: A *L. fermentum* HA-179 törzs metabolikus aktivitása rekonstruált tejben

Fermentációs idő [óra]	pH	Proteáz aktivitás [U/ml]
0	6,7	n.a*
6	6,7	4,58
24	6,7	6,44

A fermentáció során pH csökkenést nem tapasztaltam. Ez alátámasztani látszik a gyors szkrínelés során kapott eredményt, ahol is a törzs esetében szaporodást nem tapasztaltam, de proteáz aktivitást ki tudtam mutatni. Esetlegesen a fermentációs időt megnövelve a proteáz aktivitás tovább emelkedhetett volna. Megjegyezném, hogy ezek az aktivitások elmaradnak a tápanyagban gazdag közegekben elért eredményektől. A továbbiakban olyan tápközeg összetétel kialakításra törekedtem, amely elegendő tápanyagot szolgáltat a törzs szaporodásához, valamint kedvező lehet proteáz szintézisre nézve is.

5.3 Tápközeg összetételek hatása a *L. fermentum* HA-179 törzs szaporodására

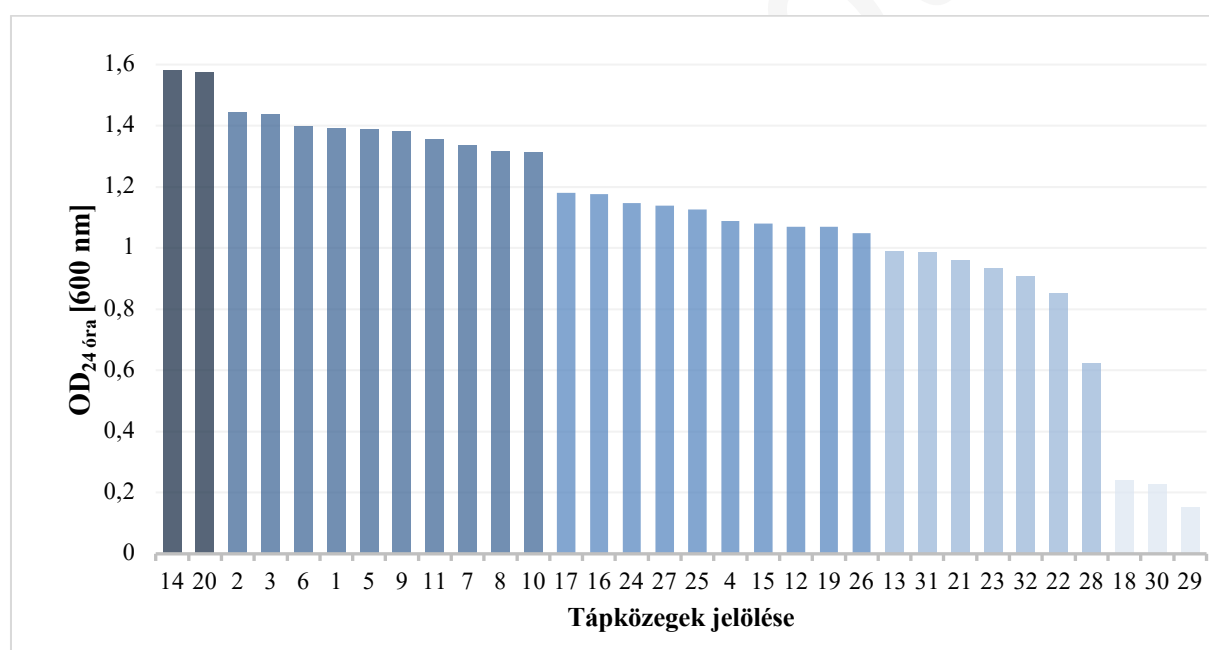
A kialakítandó tápközegeknél a proteáz enzim szintézisének indukálásához minden esetben kazeint alkalmaztam. Jelentősen csökkentettem a glükóz mennyiségét és részletes vizsgálat tárgyává tettem az élesztőkivonat és pepton csökkentésének hatását a szaporodásra. Választ

kerestem arra, hogy melyik az az összetétel, ahol törzsek még zavartalanul növekednek, de nincs feleslegben jelen sem az élesztőkivonat, sem a pepton. A kísérleti összeállításomban szerepeltek tejjel gazdagított tápközegek és olyanok is, amelyekben nem volt tejpor.

A szaporítási kísérletek megvalósításához a 10. táblázatban bemutatott tápközeg összetételeket alkalmaztam.

Egyes tápközegekben a szaporodást két párhuzamosban vizsgáltam és eredményként ezek átlagait tüntettem fel, valamint a tápoldatok sterilizálásának ellenőrzésére beoltás nélküli kontroll vizsgálatok is történtek.

Az eredmények áttekinthető szemléltetése miatt a 24 órás OD értékeket csökkenő sorrendben ábrázoltam és ennek megfelelően igyekeztem a tápkomponensek hatásait értékelni. Ezeket az adatokat szemléltetem a 10. ábrán. A fermentáció 24 órájában detektált biomassza értékeket ($OD_{24\text{ óra}}$) csoportokba sorolva kívántam értékelni.



10. ábra: Biomassza hozamok alakulása 24 órás fermentációt követően különböző összetételű tápközegekben

10. táblázat: *L. fermentum* HA-179 törzs szaporodás vizsgálatának kísérleti terve és a tenyésztés 24. órájában meghatározott optikai denzitás (OD) értékek

Tápkomponens	Glükóz	Kazein	Tejpor	Élesztő-kivonat	Pepton	OD _{24 óra} [600 nm]
Tápközegek jelölése	Koncentráció [g/l]					
1	5	1	1	3	5	1,391
2	5	1	0	1,5	2,5	1,444
3	4	1	0	1,5	2,5	1,438
4	2,5	1	0	1,5	2,5	1,088
5	2,5	1	0	1	2,5	1,389
6	2,5	1	0	0,5	2,5	1,397
7	2,5	1	0	0	2,5	1,334
8	2,5	1	0	1,5	2	1,316
9	2,5	1	0	1	2	1,381
10	2,5	1	0	0,5	2	1,314
11	2,5	1	0	0	2	1,357
12	2,5	1	0	1,5	1	1,069
13	2,5	1	0	1	1	0,989
14	2,5	1	0	0,5	1	1,582
15	2,5	1	0	0	1	1,080
16	2,5	1	0	1,5	0,5	1,176
17	2,5	1	0	1	0,5	1,181
18	2,5	1	0	0,5	0,5	0,240
19	2,5	1	0	0	0,5	1,069
20	2,5	1	0	1,5	0	1,574
21	2,5	1	0	1	0	0,960
22	2,5	1	0	0,5	0	0,852
23	2,5	1	0	0	0	0,934
24	2,5	1	1	1,5	0	1,148
25	2,5	1	1	1	0	1,126
26	2,5	1	1	0,5	0	1,048
27	2,5	1	1	0	0	1,139
28	2,5	1	0,5	1,5	0	0,624
29	2,5	1	0,5	1	0	0,151
30	2,5	1	0,5	0,5	0	0,228
31	2,5	1	0,5	0	0	0,986
32	2,5	1	5	0,5	0,5	0,909

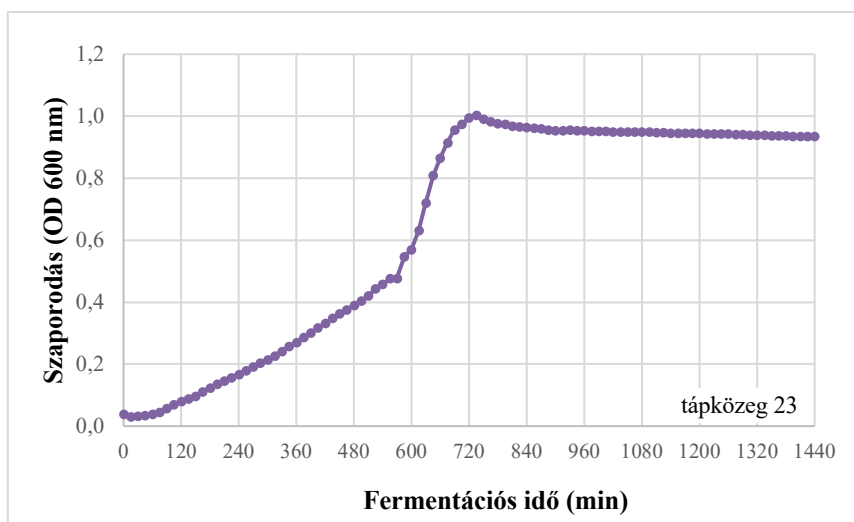
A kapott adatok alapján öt csoportot különítettem el. Az első csoportba soroltam azokat a tápközegeket (14, 20), amelyek esetében a végső OD érték megközelítette az 1,6 értéket. A második csoportba találhatóak azok a tápközegek (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 és 11), amelynél a végső OD értékek 1,45 és 1,3 között alakultak. A harmadik csoportot azon tápközegek képezik

(4, 12, 15, 16, 17, 19, 24, 25, 26 és 27), ahol a végső optikai denzitások 1,15 és 1,00 közötti értékek voltak. A negyedik csoportban vannak azok a tápközegek (13, 21, 22, 23, 28, 31, 32), ahol fermentáció végén mért OD értékek 1,00 alattiak voltak, de meghaladták a 0,5 értéket. Az ötödik csoportba lévő tápközegek (18, 29, 30) esetében minimális szaporodás volt tapasztalható. Az első csoportba sorolt tápközegek összetételüket tekintve megegyeztek, mindkét tápközeg, 0,25 % glükózt, valamint együttesen 0,15 % pepton és az élesztőkivonatot tartalmazott. A második csoportban lévő tápközegek összetételénél azt tapasztaltam, hogy függetlenül az alkalmazott glükóz mennyiségétől a pepton és az élesztőkivonat együttes mennyisége általában jelentősen meghaladta a 0,2 %-os értéket. Csupán a 11-es tápközegnél volt ez az érték 0,2 %. A harmadik csoport tápközegeinél látható, hogy minden esetben az alkalmazott glükóz mennyisége 0,25 % volt és a fehérje eredetű komponensek (tejpor, élesztőkivonat, pepton) mennyisége összeségében 0,4 és 0,05 %-os tartományban volt. Azon tápközegek, ahol a pepton kiváltására 0,1 %-ban tejporthat alkalmaztam is ebben a csoportban találhatóak. Figyelemre méltó, hogy a glükóz mellett csupán kazeint és tejporthat tartalmazó tápközegben (27) az elért OD_{600nm} érték 1,14 volt. A negyedik csoportban szereplő tápközegekben 0,25 %-ban volt jelen a glükóz, és egyéb komponensek tekintetében jelentősen különböztek, a biomassa hozamok szinte azonos szinten mozogtak, kivéve a 28. tápközeg, amelyben 0,05% tejpor mellett 0,15% élesztőkivonat volt jelen. Ebben az esetben végső OD érték: 0,624 volt.

A kapott eredmények alapján egyértelmű, hogy a tápközegek minőségi és mennyiségi összetétele meghatározó a törzs szaporodására nézve.

A további kísérletek tervezése szempontjából fontos eredménynek értékelem, hogy a glükóz mellett csupán kazeint tartalmazó tápközegben (23) hasonlóan jó eredményeket tapasztaltam, mint azon tápközegekben, ahol a kazein mellett 0,1%-ban élesztőkivonat és pepton is szerepelt, illetve ahol 0,1%-ban élesztőkivonatot adtam a tápközeghez. Ezt a tápközeg összetételt ígéretesnek tartom a proteolitikus aktivitás vizsgálata szempontjából. A 31. tápközeg összetételénél fény derült arra, hogy biomassa hozamok tekintetében felesleges az élesztőkivonat és a pepton kiegészítés. Megfigyelhető azonban, hogy a tejpor mennyiségének jelentős megnövelése (32. tápközeg) fokozta a biomassa mennyiségét összevetve az ötödik csoportban szereplő tápközeg (18) hozamával. Szintén az ötödik csoportban szereplő 29. és 30. tápközegekben - ahol a kazein mellett 0,05%-ban tejpor is jelen volt - az élesztőkivonat kiegészítés csökkentette a biomassa hozamot. Ezt támasztja alá a 28. tápközegen kapott eredmény is.

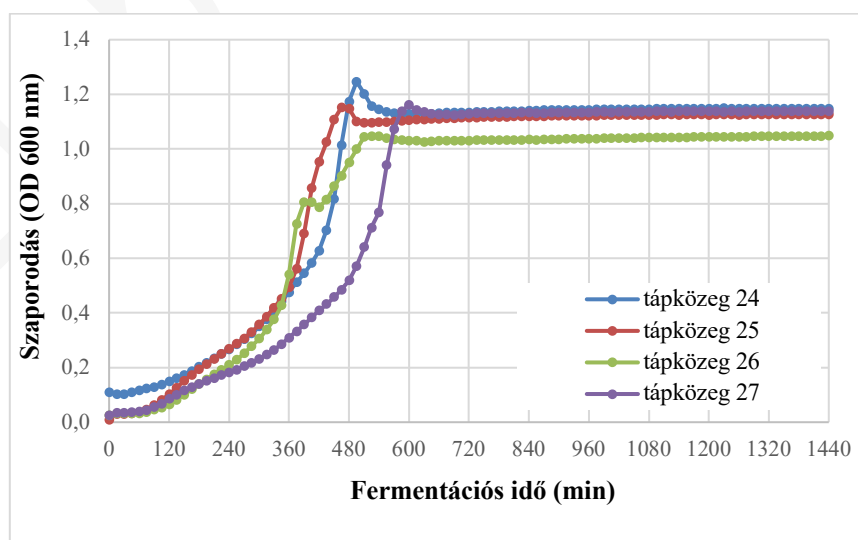
A proteolitikus aktivitás indukálása szempontjából ígéretes tápközegek esetében a szaporodási görbék alakulását részletes vizsgálat tárgyává tettem. Ezen vizsgálatokban szereplő tápközegek 0,25% glükózt és 0,1%-ban kazeint tartalmaztak, továbbá kiegészültek különböző mennyiségű sovány tejporral, élesztőkivonattal és peptonnal is.



11. ábra: HA-179 törzs szaporodási görbéje 0,25 % glükóz és 0,1 % kazein tartalmú tápközegben

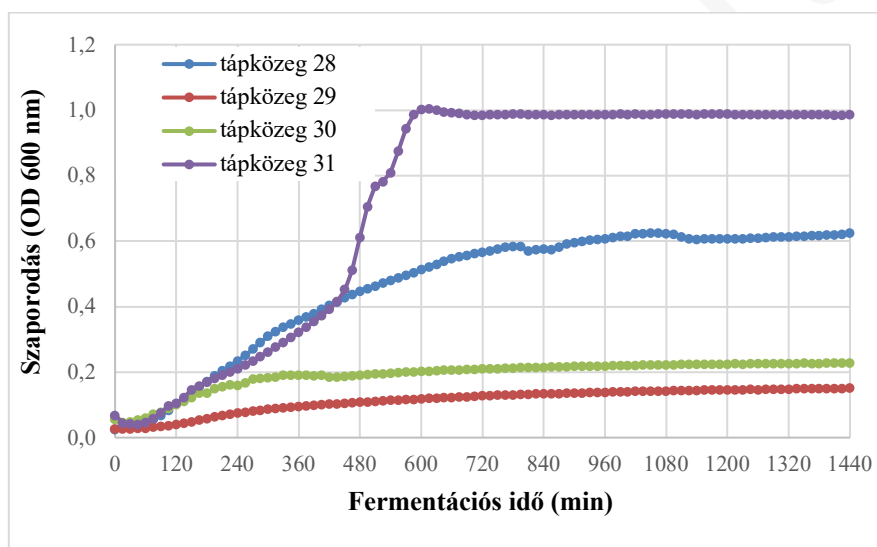
A vizsgált törzs az adott körülmények között viszonylag rövid lag szakaszt követően gyorsuló szaporodási szakaszba lépett és 570. percben érte el az exponenciális növekedési fázist.

A következőben azokban a közegekben kapott szaporodási görbéket kívánom szemléltetni, amelyek 0,25 % glükózt, 0,1 % kazeint és 0,1 % tejport tartalmaztak további kiegészítés nélkül, illetve különböző mennyiségű élesztőkivonattal kiegészülve (12. ábra).



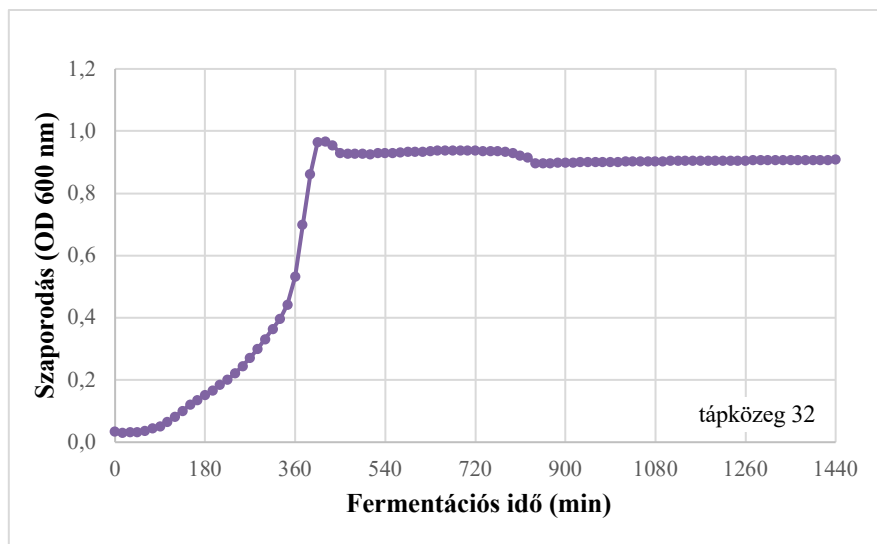
12. ábra: A *L. fermentum* HA-179 törzs szaporodási görbéje 0,1 % tejport tartalmazó tápközegekben

A tejpor mellett 0,15% élesztőkivonatot tartalmazó tápközegekben a törzs 405 percet követően, a 0,1 % élesztőkivonatot tartalmazó tápközegekben 360 percet követően, 0,05 % élesztőkivonatot tartalmazó tápközegekben 340 percet követően lépett az exponenciális szaporodási fázisba. Ebben az esetben egy diauxiás növekedésre utaló képlet is látható a görbén, ami a növekedési szubsztrátum váltásra utalhat. Az élesztőkivonatot nem tartalmazó tápközegek esetében a törzs növekedése az 510. percet követően érte el az exponenciális szaporodási fázist. Összeségében megállapítható, hogy az élesztőkivonatot kiegészítés lerövidíti azt az időtartamot, amíg a sejtek az exponenciális szaporodási fázisba lépnek. Ugyanakkor, ha proteolízis folyamatát kívánjuk követni, akkor kedvezőbb az elhúzódó gyorsuló szaporodási fázis, ahol az intenzív enzimszintézis történik.



13. ábra A *L. fermentum* HA-179 törzs szaporodási görbéje 0,05 % tejporthatartalmazó tápközegekben

A 13. ábrán szemléltetett eredményekből arra következtettem, hogy amikor 1% kazein mellett 0,05%-ban volt jelen tejpor és különböző koncentrációban élesztőkivonatot kiegészítés jelentősen gátolta a szaporodást (tápközegek 28, 29 és 30). A legjobb szaporodást a kazeint és tejpor kiegészítést tartalmazó tápközegek (31) biztosította.



14. ábra A *L. fermentum* HA-179 törzs szaporodási görbéje 0,5 % tejport tartalmazó tápközegben 0,05-0,05% élesztőkivonat és pepton jelenlétében

A tejpor mennyiségének jelentős megnövelése csökkenti azt az időtartamot, amíg a sejtek elérik az exponenciális szaporodási fázist (14. ábra) Ebben az esetben a sejtek 345 percet követően léptek az exponenciális szaporodási fázisba. Ez a kísérlet nem ad információt arról, hogy hogyan alakultak volna az értékek élesztőkivonat és pepton kiegészítés nélkül.

További információ szerzés céljából a kazein és a tejpor tartalmú tápközegekben történő szaporításoknál az exponenciális fázisban meghatároztam a fajlagos szaporodási sebességeket és az ebből származtatható generációs időket. A kapott eredményeket a 11. táblázatban összegeztem.

11. táblázat A *L. fermentum* HA-179 törzs fajlagos szaporodási sebesség és generációs idő értékei kazein és tejpor tartalmú tápközegeken

Komponens Tápközeg	Glükóz (%)	Kazein (%)	Tejpor (%)	Élesztőkivonat (%)	Pepton (%)
23	0,25	0,01	-	-	-
	$\mu=0,264 \text{ h}^{-1}$		$t_{\text{gen}}=2,6 \text{ h}$		
24	0,25	0,1	0,1	0,15	-
	$\mu=0,384 \text{ h}^{-1}$		$t_{\text{gen}}=1,8 \text{ h}$		
25	0,25	0,1	0,1	0,1	-
	$\mu=0,594 \text{ h}^{-1}$		$t_{\text{gen}}=1,2 \text{ h}$		
26	0,25	0,1	0,1	0,05	-
	$\mu=0,594 \text{ h}^{-1}$		$t_{\text{gen}}=1,2 \text{ h}$		
27	0,25	0,1	0,1	-	-
	$\mu=0,264 \text{ h}^{-1}$		$t_{\text{gen}}=2,6 \text{ h}$		
31	0,25	0,1	0,05	-	-
	$\mu=0,27 \text{ h}^{-1}$		$t_{\text{gen}}=2,6 \text{ h}$		
32	0,25	0,1	0,5	0,05	0,05
	$\mu=0,57 \text{ h}^{-1}$		$t_{\text{gen}}=1,2 \text{ h}$		

Az exponenciális szaporodási fázisban meghatározott kinetikai adatokból látható, hogy a tápközegekhez az élesztőkivonat hozzáadása nemcsak a lag és a gyorsuló szaporodási szakasz hosszát rövidíti le, hanem a fajlagos szaporodási sebességet is növeli. Ezáltal a generációs idő is csökken. A tejpor mennyiségének jelentős megemelésével növelhető a fajlagos szaporodási sebesség és ezáltal csökkenthető a generációs idő is.

5.4 A kísérleti eredményekből levont következtetések

A tejporos tápközeg lehetővé teszi a *Lactobacillus* törzsek számára, hogy a tejfehérjéket hasznosítsák tápanyagként és ezáltal aktiválják a fehérjék bontásához szükséges proteolitikus enzimeket. Így a tejporthoz tartozó tápágon sikeresen kimutatható a törzsek növekedése és az aktivitásra utaló feltisztulási zónák. Agardiffúziós módszerrel végzett screenelés során megállapítottam, hogy a tizenhét probiotikus *Lactobacillus* törzs közül - három törzs kivételével - különböző mértékben mind mutatott proteolízist. Érdekesnek találtam, hogy a törzsek eltérő szaporodást mutattak és proteolitikus aktivitással rendelkeztek ugyanabban a környezetben. Ezek az eltérések a génexpresszióban vagy a mikroorganizmus anyagcsere képességében keresendők. Legnagyobb proteolitikus aktivitást a *Lactobacillus fermentum* HA-179 törzse mutatta, így ezt választottam a további kísérletekhez.

A kísérletek során sikeresen adaptáltam és alkalmaztam a kiválasztott proteáz aktivitás meghatározási módszert. A szubmerz fermentációk során a *Lactobacillus fermentum* HA-179 törzs proteáz szintézisét - különböző környezeti feltételek mellett - sikerült kimutatnom. Tekintettel arra, hogy az aktivitás értékek jelentős eltérést mutattak, a következő lépésben szaporodási vizsgálatokat terveztem. A különböző összetételű tápközegeken megvalósított szaporodási kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontam le, hogy abban az esetben, ha a törzs proteáz termelését kívánom vizsgálni felesleges az élesztőkivonat, illetve a pepton kiegészítés alkalmazása. Ugyanakkor fontosnak ítélem a tejpor mennyiségének optimalizálását a tápközegben. Emellett a környezeti feltételeknek meghatározása és optimalizálása is kulcsfontosságú a hatékony proteáz termelés megvalósítás céljából.

5.5 Javaslatok a kutatómunka további folytatására

- Elért eredményeim alapján fontosnak tartom a *Lactobacillus fermentum* HA-179 törzs további vizsgálatát, a tápközeg optimalizálását követően pedig a proteáz aktivitás időbeli változásának követését.

- Sikeres optimálási kísérleteket követően lehetővé válik a proteáz enzim kinyerése és a nyers proteáz enzimmészítmény jellemzése, valamint fehérjebontásra való alkalmazása.
- Kísérleti eredményeimet összevetve az irodalmi adatokkal, ahol a *Lactobacillus helveticus* fajt jó proteáz termelőként írják le javasolnám a *L. helveticus* R-52 törzs behatóbb tanulmányozását is. Ezt alátámasztja az én kísérletem is, ahol a törzs a screenelés során jelentős aktivitást és jó szaporodó képességet mutatott.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban kiemelt kutatási terület a bioaktív peptidek előállítása és alkalmazása. A bioaktív peptidek hasznosítása túlmutat a funkcionális élelmiszerek létrehozásán, mivel egyre inkább teret hódít gyógyászati felhasználásuk is. A megfelelő enzimek alkalmazása és a környezeti feltételek biztosítása lehetővé teszi a bioaktív peptidek hatékony és célzott előállítását. A bioaktív peptidek számos egészségmegőrző - antioxidáns, immunmoduláló, vérnyomás- és gyulladáscsökkentő- tulajdonsággal rendelkeznek. A bioaktív peptidek olyan fehérje fragmensek, melyek biológiai aktivitással bírnak, ezáltal pozitívan befolyásolhatják az egészséget. A tejfehérje alapú peptidek - melyeket mikroorganizmusok állítanak elő - a mindennapi élelmiszereink összetevői. A *Lactobacillus* törzsek proteolitikus enzimrendszerük segítségével képesek proteáz enzimeket előállítani, melyek a tejfehérjéket bontják és tejfehérje alapú peptideket termelnek. Az élelmiszerek biológiai értékének növelése elősegíti az egészség fenntartását. Ezek az ismeretek inspiráltak arra, hogy szakdolgozatom kísérlete során a *Lactobacillus* törzsek proteáz aktivitását tanulmányozzam, valamint mélyebb ismereteket szerezzek a proteáz enzim szintézisét befolyásoló környezeti feltételekről.

Céлом proteolitikus aktivitással rendelkező *Lactobacillus* törzsek szelektálása volt. Először proteolitikus aktivitás kimutatását terveztem megvalósítani, Oladejo és munkatársai (2020) által leírtak alapján agardiffúziós módszerrel. A vizsgált probiotikumok növekedtek, de aktivitást nem tudtam kimutatni, ennek az az oka, hogy BHM táptalaj élesztőkivonatot és peptont is tartalmazott, melyek segítik növekedést, de kevésbé támogatják a proteáz szintézist. Ennek az ismeretében, csak tejporthoz tartozó tápközeget alakítottam ki, ahol szükséges a tejfehérje bontás a sejtek növekedéséhez. A tejporos közegben végzett kísérletek meghozták a várt eredményt, hiszen a tizenhét *Lactobacillus* törzsből csupán csak háromnál nem tapasztaltam aktivitást, a többinél feltisztulási zónát és növekedést is tapasztaltam. Megállapítottam, hogy a törzsek között is jelentős eltérések vannak, szaporodásukban és a proteolitikus aktivitásukban is, ezeknek az eltéréseknek az okai a génexpresszióban és a mikroorganizmusok anyagcseréjében keresendő. Az is bebizonyosodott, hogy a tejpor a proteolitikus aktivitás kimutatására jó választás, hiszen a tejfehérje kitűnő tápanyagot jelent a *Lactobacillus* törzsek számára.

További vizsgálataimhoz a jó proteolitikus aktivitást mutató, de lassú szaporodású *Lactobacillus fermentum* HA-179 törzset választottam.

Ezt követően különböző környezeti feltételek mellett szubmerz fermentációk során kívántam a proteáz aktivitást meghatározni. A HA-179 törzs proteáz termelése sok tényezőtől függhet,

ezért pontos képet szerettem volna kapni arról, hogy melyek azok a feltételek, ahol hatékonyan működik a proteolízis. Így glükózt és tejpport tartalmazó tápközegekben is végeztem vizsgálatokat, 30 és 37 °C-on, légköri és anaerob környezetben egyaránt. Növelt tejpor tartalmú tápközegben eltérő mértékben, de minden esetben sikerült enzimaktivitást kimutatnom. Legjobb eredményt a légköri körülmények között 30 °C-on glükóz mentes, tejpport tartalmazó tápközegben értem el. Ebben az esetben 18 U/ml proteáz aktivitást tapasztaltam. Ezután sovány tejpport tartalmazó tápközegben vizsgáltam a proteáz aktivitást. A kiindulási tejközeg kémhatása pH=6,7 volt. 24 órás időtartamú fermentációt vezettem, melynek során 6 órás és 24 órás körben vettem mintákat. A fermentáció során pH csökkenést nem tapasztaltam, de csekély mértékű proteáz aktivitást ki tudtam mutatni. Az eredmények arra utalnak, hogy meghatározó lehet az enzimaktivitások szempontjából, hogy a baktérium sejtek mely szaporodási fázisban vannak. Az ellentmondásos eredmények feloldására a HA-179 törzs szaporodási tulajdonságait különböző összetételű tápközegeken vizsgáltam. Mindegyik tápközeg tartalmazott glükózt, a proteáz enzim indukálására 0,1%-ban kazeint és kiegészítésként tartalmazhattak tejpport, élesztő kivonatot és/vagy peptont. A biomassza hozamokból és a szaporodási görbékből megállapítottam, hogy a tápközeg összetételek jelentős hatást gyakorolnak a törzs szaporodási tulajdonságaira. Eredményeimből azt a következtetést vontam le, hogy ha a törzs proteáz termelését kívánom vizsgálni akkor felesleges az élesztő kivonat és a pepton kiegészítés alkalmazása, ugyanakkor fontos a tejpor mennyiségének optimalizálása, valamint a kedvező környezeti feltételek meghatározása. A szaporodási görbékből, valamint az exponenciális szaporodási fázisban meghatározott fajlagos szaporodási sebesség értékekből látható, hogy a tápközegekhez az élesztő kivonat hozzáadása nemcsak a lag és a gyorsuló szaporodási szakasz hosszát rövidíti le, hanem a fajlagos szaporodási sebességet is növeli. Továbbá megállapítható az is, hogy a tejpor mennyiségének jelentős megemelésével növelhető a fajlagos szaporodási sebesség és ezáltal csökkenthető a generációs idő is.

Elért kezdeti eredményeim ígéretes alapot jelentenek a kutatómunka folytatásához, a törzs proteáz enzim aktivitásának időbeli követésével lehetőségünk van megérteni az enzim szintézis dinamikáját. A folyamat optimalizálását követően kinyerhető a proteáz enzim és információkat nyerhetünk az enzim aktivitásáról, valamint tulajdonságairól. Ez lehetővé teszi, hogy megértsük az enzim működését és alkalmazási lehetőségeit, hogy célirányosan használjuk fel a fehérjék lebontására, ami hasznos lehet számos ipari és biotechnológiai alkalmazási területen.

7 IRODALOMJEGYZÉK

Ahangari, H., Yazdani, P., Ebrahimi, V., Soofiyan, S.R., Azargun, R., Tarhriz, V. and Eyvazi, S. (2021). An Updated review on production of food derived bioactive peptides; focus on the psychrotrophic bacterial proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, p.102051. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102051>.

Auestad, N. and Layman, D.K. (2021). Dairy bioactive proteins and peptides: a narrative review. *Nutrition Reviews*, 79(Supplement_2), pp.36–47. doi:<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab097>.

Buzas Gy. M. (2015): A laktóztoleranciáról: Múlt és jelen – I. rész. *Orvosi Hetilap*, 156 (38). pp. 1532-1539. doi:<https://doi.org/10.1556/650.2015.30261>

Deák T., (2006). Élelmiszer-mikrobiológia. Budapest. Mezőgazda Kiadó.

Chelladhuraia, K., Ayyasha, M., Turnerc, M.S., Kamal-Eldin, A. (2023) *Lactobacillus helveticus*: Health effects, current applications, and future trends in dairy fermentation. *Trends in Food Science & Technology* 136: 159–168. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.013>

Csapó J., Fenyvessy J., Csanádi J., Csapó-Kiss Zs. (2014). Tejipari Technológia. Tej és a tejtermék a táplálkozásban. Kolozsvár. Scientia Kiadó.

Davodii S.H., Shahbazi R., Esmaili S., Sohrabvandi S., Mortazavian A., Jazayeri S., Taslimi A. (2016). Health-Related Aspects of Milk Proteins. *PubMed* 15(3),573-591.

Dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253–262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>

Elfahri, K.R., Donkor, O.N. and Vasiljevic, T. (2014). Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, 38(1), pp.37–46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.010>.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L. and Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, pp.71–80. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.002>.

Jellouli K., Bougatef A., Manni L., Agrebi R., Siala R., Younes I. Nasri M. (2009). Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36:939-948. doi:<http://doi.org/10.1007/s10295-009-0572-5>

Khalid, N.M. and Marth, E.H. (1990). *Lactobacilli* — Their Enzymes and Role in Ripening and Spoilage of Cheese: A Review. *Journal of Dairy Science*, 73(10), pp.2669–2684. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(90\)78952-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(90)78952-7).

Kumar, D. and Bhalla, T.C. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), pp.726–736. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0094-7>.

Lopez-Kleine, L., and Monnet, V. (2011). Lactic acid bacterial proteolytic systems. Academic Press, Cambridge. pp.49-55. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00257-0>

Ludány A. (2011) A fehérjekutatás modern módszertana. Budapest. Medicina Könyvkiadó Zrt.

Manohar, R., Kutumbarao, N.H.V., Krishna Nagampalli, R.S., Velmurugan, D. and Gunasekaran, K. (2018). Structural insights and binding of a natural ligand, succinic acid with serine and cysteine proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [online] 495(1), pp.679–685. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.033>.

Maske, B.L., de Melo Pereira, G.V., da S. Vale, A., de Carvalho Neto, D.P., Karp, S.G., Viesser, J.A., De Dea Lindner, J., Pagnoncelli, M.G., Soccol, V.T. and Soccol, C.R. (2021). A review on enzyme-producing *Lactobacilli* associated with the human digestive process: From metabolism to application. *Enzyme and Microbial Technology*, 149, p.109836. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109836>.

Murtaza, M.A., Irfan, S., Hafiz, I., Ranjha, M.M.A.N., Rahaman, A., Murtaza, M.S., Ibrahim, S.A. and Siddiqui, S.A. (2022). Conventional and Novel Technologies in the Production of Dairy Bioactive Peptides. *Frontiers in Nutrition*, 9. doi:<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.780151>.

Mustafa, M.H., Soleimanian-Zad, S. and Sheikh-Zeinoddin, M. (2019). Characterization of a trypsin-like protease 1 produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896 from skimmed milk based medium. *LWT*, p.108818. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108818>.

Oladejo, T.C., Olaniyi, O.O., Ayodeji, A.O., aikinyele, B.J. (2020) Protease produced by *Lactobacillus brevis* enhanced nutritinal values of African yam beans and demonstrated improvement in the growth and blood indicases of albino rats. *Heliyon*, 6(10), e05123. doi:<http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e.05123>

Pritchard, G.G. and Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), pp.179–206. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00018.x>.

Putranto, W., S., Maggy Suhartono, T., Kusumaningrum, H., D., Giriwono, P., E., Apon Zaenal Mustopa, A., Z. (2020): A novel rennin like protease from *Lactobacillus plantarum* 1.13 isolated from Indonesian fermented meat (Bakasam). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 29 101818 <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101818>

Sun F., Hu Y., Yin X., Kong B., Qin L. (2020) Production, purification and biochemical characterization of the microbial protease produced by *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages. *Process Biochemistry*, p. 37-45. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.029>.

Szarka A., Wunderlich L. (2013). A biokémia alapjai. Typotex Kiadó. Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem.

Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M-Concepción. and Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, pp.395–404.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. and Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), pp.2782–2858. doi:<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni konzulenseimnek **Dr. Rezessyné Szabó Judit** egyetemi magántanárnak és **Szécsi Anett** mestertanárnak, akik állandó segítséget és iránymutatást nyújtottak számomra. Köszönöm a laboratóriumi munkám során kapott segítséget, hogy mindig türelemmel és kedvesen segítették a munkámat. Köszönöm a rendszeres konzultációkat, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk tanácsért és segítségért, nélkülük nem készülhetett volna el a szakdolgozatom.

Külön köszönöm a Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék dolgozóinak a segítséget, hogy kéréseimmel feléjük is bizalommal fordulhattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Nguyen Duc Quang** egyetemi tanárnak, hogy szakdolgozatomat a vezetése alatt álló Tanszéken készíthettem el.

NYILATKOZAT

a zárdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Lieber Dorottya
A Hallgató Neptun kódja: LZFK85
A dolgozat címe: Probiotikus *Lactobacillus* törzsek szelektálása proteáz enzim aktivitásra
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítotam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2024 év 04 hó 11. nap


Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Lieber Dorottya (hallgató Neptun azonosítója: LZFK85) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / **nem javaslom**.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: 2024. 04. 11.



belső konzulens

Lieber