

Probiotikus *Lactobacillus* törzsek szelektálása proteáz enzim aktivitásra

Készítette: Lieber Dorottya

Biomérnök, nappali BSc

Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Belső konzulensek: Szécsi Anett mestertanár

Rezessyné Dr. Szabó Judit egyetemi magántanár

Tartalmi kivonat

Napjainkban kiemelt kutatási terület a bioaktív peptidek előállítása és alkalmazása. Hasznosításuk túlmutat a funkcionális élelmiszerek létrehozásán, mivel egyre inkább teret hódít gyógyászati felhasználásuk. 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 tejfehérje alapú peptidek, melyeket mikroorganizmusok állítanak elő mindennapi élelmiszereink összetevői. A *Lactobacillus* törzsek proteolitikus enzimeik segítségével bontják a tejfehérjéket és bioaktív peptideket hoznak létre. Az élelmiszerek biológiai értékének a növelése hozzájárul az egészség fenntartásához. Ezek az ismeretek inspiráltak, hogy szakdolgozatom kísérletei során a *Lactobacillus* törzsek proteáz aktivitását tanulmányozzam és mélyebb ismereteket szerezzek a proteáz enzim szintézisét befolyásoló környezeti feltételekről.

A proteolitikus aktivitás kimutatását agardiffúziós módszerrel Oladejo és munkatársai (2020) által leírtak alapján valósítottam meg. A vizsgált probiotikumok növekedtek, de aktivitást nem tudtam kimutatni. Ennek az ismeretében, csak tejport tartalmazó tápközeget alakítottam ki, ahol szükséges a tejfehérje bontása a sejtek növekedéshez. A tejporos közegben végzett kísérletek meghozták a várt eredményt, hiszen a tizenhét *Lactobacillus* törzsből csupán csak háromnál nem detektáltam 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 függ, ezért pontos képet szerettem volna kapni, hogy melyek azok a feltételek, ahol hatékonyan működik a proteolízis. Így glükózt és tejport 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 proteáz aktivitást a légköri körülmények között 30 °C-on glükóz mentes, tejport tartalmazó tápközegben mértem, amely 18 U/ml értéknek adódott. Ezután rekonstruált tejközegben vizsgáltam a proteáz aktivitást. A kiindulási közeg kémhatása pH=6,7 volt. 24 órás időtartamú fermentációt vezettem, melynek során a 6. és 24. órában vettem mintákat. A fermentáció során pH csökkenést nem tapasztaltam, de csekély mértékű proteáz aktivitást tudtam mérni. Eredményeim 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 esetenként tejport, élesztőkivonatot és/vagy peptont használtam. A biomassa 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 élesztőkivonat és a pepton kiegészítés alkalmazása, ugyanakkor fontos a tejpor mennyiségének optimálása, valamint a kedvező környezeti feltételek meghatározása. A szaporodási görbékből, valamint az exponenciális szaporodási fázisban meghatározott fajlagos szaporodási sebesség értékekből 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. 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 ígéretesek és alapot adnak a kutatómunka folytatásához. A *L. fermentum* HA 179-törzs további vizsgálatával, a proteáz enzim aktivitásának időbeli követésével lehetőségünk van megérteni az enzim szintézis dinamikáját. A folyamat optimálását követően kinyerhető a proteáz enzim és információkat kaphatunk az enzim aktivitásáról, valamint tulajdonságairól. Ez lehetővé teszi, hogy megértsük az enzim működését és feltárjuk az alkalmazási lehetőségeit. Ezáltal célirányosan használjuk fel a fehérjék lebontására, ami hasznos lehet számos ipari és biotechnológiai alkalmazási területen.