

# SZAKDOLGOZAT

Szabó Bálint Imre Szakdolgozat

Szabó Bálint Imre

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet  
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

**Probiotikus *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs  
intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének  
optimalása**

Szabó Bálint Imre

Budapest

2023

**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**  
**Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet**

**Szak neve: BSc Biomérnöki**

**Modul neve: Alkalmazott biotechnológia**

**Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék**

**Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék**

Hallgató: Szabó Bálint Imre

A szakedolgozat címe: Probiotikus *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének optimalálása

Konzulens: Dr. Bujna Erika

Konzulens: Dr. Nguyen Duc Quang

Beadás dátuma: 2023. május 3.

szakedolgozat készítés helyének vezetője  
Dr. Nguyen Duc Quang

konzulensek  
Dr. Bujna Erika, Dr. Nguyen Duc Quang

modul szerinti tanszék vezetője  
Dr. Nguyen Duc Quang

## Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	1
2. CÉLKITŰZÉS .....	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	4
3.1. Bélmikrobióta .....	4
3.2. Probiotikumok.....	4
3.2.1. Története, meghatározása .....	4
3.2.2. Követelmények.....	5
3.3. Tejsavbaktériumok.....	6
3.3.1. Jellemzőik .....	6
3.3.2. Alkalmazásuk és kedvező hatásaik .....	7
3.4. Prebiotikumok .....	8
3.5. $\beta$ -Galaktozidáz enzim.....	9
3.5.1. Hatásmechanizmusuk.....	9
3.5.2. $\beta$ -Galaktozidáz hatásai és ipari alkalmazása .....	12
3.6. Probiotikumok és prebiotikumok bioaktivitása, szervezetre gyakorolt hatása.....	13
3.6.1. Immunmoduláció .....	13
3.6.2. Elhízás és cukorbetegségre gyakorolt hatás .....	16
3.6.3. Laktóztolerancia .....	18
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	20
4.1. Alkalmazott törzs .....	20
4.2. Alkalmazott tápközegek.....	20
4.3. Alkalmazott puffer és reagensek.....	21
4.4. Enzim aktivitás méréséhez szükséges reakcióelegyek.....	22
4.5. Alkalmazott módszerek .....	22
4.5.1. <i>Lactobacillus fermentum</i> törzs fenntartása .....	22
4.5.2. <i>Lactobacillus fermentum</i> törzs enzimfermentációja .....	22
4.5.3. Sejtfeltárás.....	22
4.5.4. $\beta$ -Galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározása .....	23
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....	25
5.1. Szerves nitrogén források hatása a laktáz aktivitásra .....	25
5.2. Az inokulum tápközeg hatása a $\beta$ -galaktozidáz termelésre .....	28
5.3. Szervetlen nitrogén források hatása a $\beta$ -galaktozidáz termelésre .....	29
5.4. A különböző szénforrást tartalmazó inokulum tápközegek hatása az enzim aktivitásra.....	32

5.5. A $\beta$ -galaktozidáz enzim stabilitásának vizsgálata .....	34
6. ÖSSZEFOGLALÁS .....	35
7. IRODALOMJEGYZÉK .....	37

Szabó Bálint Imre Szakdolgozat

## 1. BEVEZETÉS

A mai világban egyre nagyobb hangsúlyt fektetünk az egészséges életre, a legfrissebb trendek igyekeznek felhívni a figyelmet a tudatos étkezésre az egészségünk megőrzése, valamint az immunrendszerünk erősítése érdekében. Napjainkban a funkcionális élelmiszerek iránt megnőtt a kereslet, melyek valamilyen hozzáadott értéket képviselnek és kedvező hatással vannak a szervezetünkre. Összetevői természetes alapanyagok és nem tartalmaznak tartósítószeret. Az aktív élő probiotikumokat, valamint prebiotikumokat tartalmazó élelmiszerek is ebbe a csoportba tartoznak.

A bél mikrobiom összetétele biodiverzitása és egészsége hatással van a tápanyag-, anyagcsere- és energiafelhasználásra. Egyes kutatások a mikrobióta egészségi állapotát a fogyással és az elhízással kapcsolják össze, az utóbbi olyan népegészségügyi problémák indikátora, mint a szív és érrendszeri megbetegedések, valamint a cukorbetegség, melyek a vezető halálozási okok közé tartoznak (Lee et al., 2019; Parvez et al., 2006). Pro- és prebiotikumok megváltoztatják a hormon, neurotranszmitterek eloszlását, melyek a pszichikai állapotra és a gyulladásos faktorokra vannak hatással. A probiotikumok szerves savakat termelnek, melyek savas pH-t eredményezve visszaszorítják a mikrobiom káros baktériumainak szaporodását. Hasonló hatást vált ki a kórokozókval való küzdelem a receptorkötőhelyekért és a növekedési faktorként felhasznált tápanyagokért. Fogyasztásuk serkenti a mikrobiális egyensúly helyreállítását a gazdaszervezet gyomor-bél traktusában és hozzájárul az immunrendszer megfelelő működéséhez (Dahiya & Nigam, 2022; Parvez et al., 2006).

A fermentációs iparban, élelmiszerekben, orvosi kezelésekben, takarmányozásban széles körben alkalmazzák a *Lactobacillus*-okat könnyű hozzáférhetőségük, kedvező árak és bizonyított biztonságosságuknak köszönhetően, melyet az elismert GRAS és QPS státuszuk tükröz (Dahiya and Nigam, 2022).

Az élelmiszerekhez megfelelően szabályozott körülmények között hozzáadva, a probiotikumok hozzájárulnak a termék ízének és állagának javításához, valamint a kedvező aromák megjelenéséhez. Ezen kedvező hatások a  $\beta$ -galaktozidáz termelésüknek is köszönhetőek, mely enzim hidrolitikus tulajdonságával lebontja a tejcukrot, illetve megakadályozza annak kikristályosodását, így a laktózérzékenységben szenvedők számára is elérhetővé válnak ezen termékek.

A  $\beta$ -galaktozidáz enzim által katalizált folyamat a galakto-oligoszacharidok szintézise is, melyek prebiotikus tulajdonsággal élelmiszer összetevőkként szelektíven támogatják a

probiotikumok szaporodását és aktivitását a vastagbélben, ezzel jótékony hatást gyakorolva a gazdaszervezet számára.

A probiotikus *Lactobacillus* és az általuk termelt  $\beta$ -galaktozidáz enzim széleskörű alkalmazási lehetőségei ösztönöztek az enzim termelés vizsgálatára és a technológia optimalására.

Szabó Bálint Imre Szakdolgozat

## 2. CÉLKITŰZÉS

Probiotikumokat és prebiotikumot tartalmazó funkcionális élelmiszerek fogyasztásával serkenthető a mikrobiális egyensúly helyreállítása a gazdaszervezet gyomor-bél traktusában és hozzájárulnak az immunrendszer megfelelő működéséhez. A probiotikumok felveszik a versenyt a kórokozókkal azáltal, hogy modulálják a bél mikrobiótáját. A prebiotikumok szelektíven serkentik a jótékony bélbaktériumok, például a *Lactobacillus*-ok és a *Bifidobacterium*-ok növekedését, fokozzák a tejsav, valamint a rövid láncú zsírsavak termelését.  $\beta$ -galaktozidáz enzimük felhasználható a tej laktóz tartalmának lebontására, a laktóz intolerancia okozta problémák és kellemetlenségek leküzdésére. A  $\beta$ -galaktozidázok transzglykozilációs aktivitását a galakto-oligoszacharidok ipari szintézisében is alkalmazhatják, amelyek az emberi tej oligoszacharidjaihoz hasonlóan prebiotikumként szolgálnak.

A szakdolgozatom célja, a probiotikus *Lactobacillus fermentum* laboratóriumi fermentációja során a  $\beta$ -galaktozidáz enzim termeléshez legkedvezőbb körülmények biztosítása.

Kutatási céljaim megvalósításához a következő kísérleteket terveztem:

- Szénforrás hatásának vizsgálata a  $\beta$ -galaktozidáz termelésre
- Szervetlen és szerves nitrogén források hatása a  $\beta$ -galaktozidáz termelésre
- Inokulum szénforrás tartalmának hatása az enzimtermelésre
- Enzim stabilitásának vizsgálata

A kísérleteket a MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszékének laboratóriumaiban végeztem.



### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. Bélmikrobióta

A bélmikrobióta összetétele nem statikus, több mikrobiális törzsből áll és az olyan tényezők, mint az életkor, a genetika, a környezet és az étrend is befolyásolja. Kora gyermekkorban, különösen az első három évben a bélben megtelepedett mikrobák összetétele és funkciója folyamatosan változik, amíg egy viszonylag stabil mikrobaközösség létre nem jön (Han et al., 2021). Bonyolult ökoszisztémát alkot, amely több billió őshonos és még patogén mikroorganizmust is magában foglal. A testünkben található összes egyedi génnek csak 1%-a emberi eredetű, a fennmaradó 99% pedig a bél és a szájüreg mikrobiójához tartozik. Ezért az emberi mikrobiom a második genomunknak tekinthető (El-Sayed et al., 2021).

Létfontosságú szerepet játszik az egészség megőrzésében és a gazdaszervezet fertőzésre adott immunológiai válaszában. Összetételét és működését számos tényező befolyásolja, mint például a kiegyensúlyozatlan táplálkozás, az alultápláltság, a környezeti tényezők, a higiéniai szokások, az immunhiányos egészségi állapot és az antibiotikumok rövid vagy hosszú távú alkalmazása is (Dahiya és Nigam, 2022). Az antibiotikum megváltoztatja a gyomorban lévő baktériumok sokaságát és számát, megzavarva a bélmikrobióta ökoszisztémáját, enyhe és súlyos hasmenést is okozhatnak. A bélmikrobiótát alakító további tényezők közé tartozik a testmozgás, amely a szisztémás gyulladás csökkenésével és a bélmikrobióta összetételének megváltozásával jár együtt, az alvásvesztés, amely a *Firmicutes* baktériumok sejtszám növekedésével függött össze, és a stressz, amely növeli a bél permeabilitását és a gyulladással kapcsolatos citokinok mennyiségét (Lee et al., 2020).

#### 3.2. Probiotikumok

##### 3.2.1. Története, meghatározása

Az 1900-as évek elején Metchnikoff orosz kutató a kimagasló élettartammal rendelkező bolgár parasztok étkezési szokásait figyelte meg, akik gyakran fermentált élelmiszert, mint joghurtot fogyasztottak. Tapasztalatai alapján megfogalmazta, hogy a *Lactobacillus*-ok képesek ellensúlyozni a gyomor-bélrendszer kórokozó baktériumait, melyek elszaporodása különböző betegségekkel és az öregedéssel hozható összefüggésbe, valamint megállapította: „A tejsavbaktériumok minden bizonnyal megakadályozzák más mikrobák szaporodását, de nem képesek elpusztítani azokat (Elie Metchnikoff, 1908; Gasbarrini et al., 2016).

Ebben az időben Tissier bifidobaktériumok beadását javasolta a hasmenésben szenvedő csecsemők számára, ugyanis bélflórájuk az egészséges alanyoknál azokból jóval kevesebbet tartalmazott. Állítása szerint a *Bifidobacterium*-ok képesek elnyomni a megbetegedést okozó baktériumokat.

Az előző munkásságok bár feltételezik a baktériumok probiotikus hatását, először azonban a kifejezést 1954-ben Werner Kollath használja, mint aktív összetevők melyek esszenciálisak az élet egészséges fejlődéséhez. A probiotikum „pro bios” kifejezés görög eredetű, jelentése „életért”, amely megkülönbözteti őket az antibiotikumoktól, amelyek jelentése az „élet ellen”(Guarner et al., 2005). Ezután ez a kifejezés több szakcikkben is megjelenik, és számos törekvés indul annak konkretizálására, behatárolására és pontosítására. A legmeghatározóbbak Lilly és Stillwell, Sperti, Parker, Fuller, Havennar és Salmeinen nevéhez kapcsolódnak (Schrezenmeir és De Vrese, 2001). Az emberek biztonsága érdekében 2001-ben és 2002-ben a FAO és WHO szakértői munkacsoportból álló konzultációt hívott össze, ahol lényegében egy útmutatót hoznak létre a probiotikumok értékeléséhez: hivatalosan meghatározták, hogy a probiotikumok „élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben adagolva jelentős egészségügyi előnyökkel járnak a gazdaszervezet számára”. Ez a definíció a tudósok körében is a leginkább elfogadott és használt, emellett 2014-ben a Probiotikumok és Prebiotikumok Nemzetközi Tudományos Szövetsége (ISAPP) is jóváhagyta és javaslatot tett annak pontosítására (Net et al., 2014).

### **3.2.2. Követelmények**

A probiotikus mikroorganizmusok életképessége kulcsfontosságú tényező, mely hatással van a tárolási idő lejárataig szükséges mikroba mennyiségre. Emellett a probiotikumoknak robusztusnak és stabilnak kell lenniük, hogy az elfogyasztást követően túléljék az emésztőrendszer viszontagságait, mint pl. a gyomorsav alacsony pH-ját, az epesók és a különböző emésztőenzimek hatásait, majd kellő mennyiségben eljussanak a bélbe, ahol képesek legyenek megtelepedni, illetve anyagcserefolyamataik során termelődő hasznos metabolitok jótékony hatásait kifejteni (Bezkorovainy, 2001).

A funkcionális adag  $1 \cdot 10^9$  telepképző egység/adag, melyek összhangban állnak kanadai és az olasz szabályozási megközelítésekkel (WHO, 2001-2002) melyek alkalmazásának több éves tapasztalata és hagyománya van az élelmiszerekben és étrendkiegészítőkben. Az EFSA által jóváhagyott, jól jellemzett törzsek fogadhatók el probiotikumként, amelyek előnyösek a gazdaszervezet jóléte szempontjából. Probiotikus törzsek ne működjenek az antibiotikum

rezisztencia gének potenciális forrásaként, genetikai stabilitás jellemezze, amelyet pl az evolúciós genomiális átrendeződések gyakoriságából állapítanak meg. A törzs jótékony hatásának igazolásához figyelni kell az Időbeli kapcsolatokat, dózusra adott válaszokat, ismétlődő megállapítások jelentőségét, az alternatív magyarázatok megfontolását, ezekhez jól megtervezett randomizált kontrollált vizsgálatok RCT és kiváló minőségű metaanalízisek szükségesek, amennyiben új törzset azonosítanak (Hill et al., 2014; WHO, 2001-2002).

### 3.3. Tejsavbaktériumok

A *Lactobacillus*-okat az emberi bélrendszer domináns mikroorganizmusaiaként tartják számon (Walter, 2008) és emellett a legelterjedtebb probiotikus törzsek közé tartoznak. Hatással vannak a gazdaszervezet biokémiájára, fiziológiai állapotára, immunológiájára és a bélfertőzésekkel szembeni rezisztenciájára. A tejsavbaktériumok (Lactic Acid Bacteria) nevüket az általuk katalizált folyamatban képződő tejsavról kapták, tehát a szénhidrát-anyagcseréjük egyetlen vagy fő végtermékéről (Tannock, 2004).

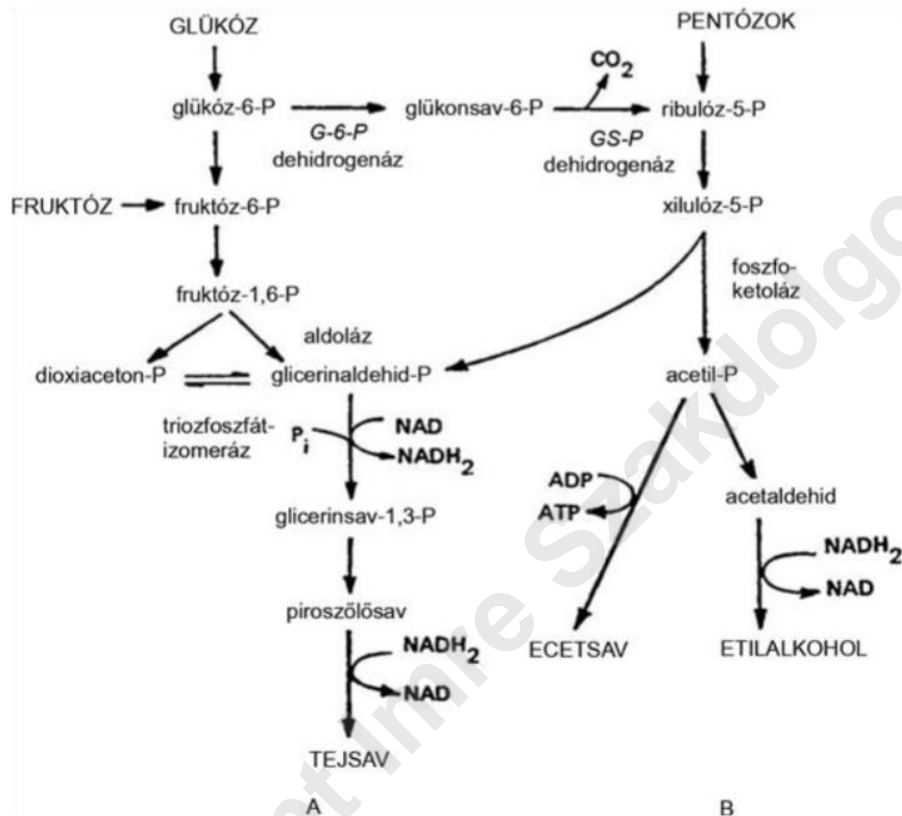
#### 3.3.1. Jellemzőik

2020 márciusi adatok alapján a *Lactobacillus* nemzetség 261 fajt foglal magában, amelyek fenotípusos, ökológiai és genotípusos szinten is rendkívül változatosak (Zheng et al., 2020). A nemzetség a *Firmicutes* törzsbe, *Bacilli* osztályba, *Lactobacillales* rendbe és ezen belül a *Lactobacillaceae* családba tartozik, a legközelebbi hozzátartozói az azonos családba tartozó *Paralactobacillus* és *Pediococcus* nemzetségek (Zheng et al., 2020).

Gram+ baktériumok, melyek nem képesek spórákat képezni. Nem mozgékonyak, alakjuk pálcika vagy kokkusz, melyek rövidebb és hosszabb változatban fordulnak elő (Rafique et al., 2022). Genomjuk GC összetétele 50% alatti (Tannock, 2004). Kataláz negatívak, még akkor is, ha bizonyos törzsek képesek pszeudokataláz aktivitásra és hem csoportot tartalmaznak. Az oxigén igényük szerint lehetnek anaerobok vagy aerotoleránsak, emellett húgysav, illetve savkedvelőek.

Táplálkozási igényük összetettebb, megfelelő növekedésükhöz szükségük van peptidekre, zsírsavakra, sókra, nukleinsav származékokra és vitaminokra is. Szinte minden környezetben fellelhetőek, ahol rendelkezésre állnak szénhidrátok, élelmiszerekben, mint például: tejtermékek (joghurt, kefir, sajt), fermentált húsok (szalámi), kovász, zöldségek (kifejezetten olívbogyó és savanyúság), gyümölcsök és italok, emellett a légúti-, gyomor és bélrendszerben, emberi és állati nemiszerveken, szennyvízben és növényi anyagokban is (Fernández et al., 2015; Zheng et al., 2020).

Két főbb típusra különíthetők el, a fajok között találkozhatunk homo-, illetve heterofermentatív anyagcseretípussal. Abban az esetben, ha szénforrásként glükózt alkalmazunk és végtermékként 85%-ban tejsavat kapunk, akkor anyagcseréjük homofermentatív. A heterofermentatív katabolizmus során a tejsav végtermék mellett hasonló arányban szén-dioxid, etanol és ecetsav is termelődik (Tannock, 2004).



1. ábra A tejsavbaktériumok homo- (A), és heterofermentatív (B) anyagcsere útvonala (Internet I)

### 3.3.2. Alkalmazásuk és kedvező hatásaik

Fő szerepet töltenek be a fermentált termékek előállításában, starter kultúraként vagy másodlagos mikrobiótaként. A starter kultúrák, magas sejt számú, egyetlen törzstípusból vagy több fajból álló készítmények. Az élelmiszeripari termékekben anyagcseretermékeik hasznos metabolitjainak előnyös tulajdonságait aknázzák ki, melyek meghatározzák a termék savasságát, állagát, színét és aromáját is. Alkalmazásukkal így kívánt érzékszervi tulajdonságokkal rendelkező termékeket alakítanak ki. Antimikrobás hatásuk révén az élelmiszer biztonságát is javítják. A tejsavbaktériumok a nyers tej fermentációja közben felszaporodhatnak és proteolitikus (kazeinből), glikolitikus (laktózból) és lipolitikus (zsírból) átalakításokat végezhetnek, melyek pl. a sajt érlelés folyamataiban szerepet játszanak. A kultúrák elsődleges és másodlagos metabolitjaikkal, az élelmiszer mátrixából bioaktív vegyületeket szabadítanak fel. A konjugált linolsav CLA a tejszír natív összetevője,

tartalmazza a tejben erjesztéssel növelhető zsírsavakat linol és linolénsavakat, amelyek gyulladás csökkentők, antiheterogének és antioxidánsok. 1-20 specifikus aminosav szekvenciával rendelkező bioaktív peptidek a kazeinből, tejsavóból szabadulhatnak fel és pl az angiotenzin-I<sub>2</sub>-konvertáló enzim gátlásával képesek csökkenteni a vérnyomást, emellett antimikrobás hatásaik is vannak. A gamma-aminovajsav (GABA) a glutaminsavból keletkezik és szintén csökkenti a vérnyomást. Hozzájárulnak a vitaminok termeléséhez pl. B12 és folsav.  $\beta$ -galaktozidázokat termelnek és pozitív hatásuk van a mikrobiomra (Fernández et al., 2015; Rafique et al., 2022).

### 3.4. Prebiotikumok

A prebiotikumokat kezdetben nem emészthető élelmiszerösszetevőkként határozták meg, amelyek jótékony hatással vannak a gazdaszervezetre, azáltal, hogy szelektíven támogatják a növekedését és vagy aktivitását egy vastagbélben megtalálható korlátozott számban jelenlévő baktériumnak (Gibson és Roberfroid, 1994)

Egy újabb meghatározás szerint a prebiotikumok szelektíven fermentált összetevők, amelyek specifikus változásokat tesznek lehetővé a gasztrointesztinális mikrobióta összetételében és aktivitásában, amely kedvező a gazdaszervezet egészsége és jóléte tekintetében (Scott et al., 2010).

Az általános prebiotikumok közé tartoznak az inulinok, frukto-oligoszacharidok (FOS), galakto-oligoszacharidok (GOS), szója-oligoszacharidok, xilo-oligoszacharidok, pirodextrinek, izomalto-oligoszacharidok és a laktulóz. GOS-t laktózból állítják elő, biokatalizátorként  $\beta$ -galaktozidázt használva. A prebiotikumok por vagy szirup formájában is elkészíthetők, és kiegészítőként forgalmazhatók, vagy élelmiszerekhez, leggyakrabban édesipari termékekhez, joghurtokhoz és kenyerekhez keverhetők (Charalampopoulos és Rastall, 2012).

A prebiotikumoknak a hatékonyság érdekében (Davani-Davari et al., 2019)

- El kell jutniuk a vastagbélbe úgy, hogy kémiai és szerkezeti tulajdonságaik ne változzanak meg
- Szerkezeti összetételükből adódóan a bél felső szakaszán végbemenő emésztési folyamatokat túl kell élniük
- Ellen kell állniuk a hasnyálmirigy és kefeszegély által termelt enzimek emésztő hatásának
- Szelektív szubsztrátumként kell szolgálnia a jótékony hatású baktériumoknak

### 3.5. $\beta$ -Galaktozidáz enzim

Az elmúlt években a glikozidázok (EC 3.2.1) nagyobb figyelmet kaptak, mert kritikus szerepet játszanak a glikozidok hidrolízisében, az oligoszacharidok, poliszacharidok és glikokonjugátumok előállításában (Movahedpour et al., 2022), ugyanis képesek szénhidrátokat szintetizálni olcsó kiindulási anyagokból könnyen, hatékonyan és környezetbarát módon (Lu et al., 2020).

A  $\beta$ -galaktozidáz a galaktohidrolázok (EC.3.2.1.23) közé tartozik, magasabb rendű növényekben, állatokban és mikroorganizmusokban túlnyomó többségben előforduló hidrolitikus enzimek. A forrástól függően széles pH-tartományban aktívak, például a gombák  $\beta$ -galaktozidáz enzimeit pH 2,5-5,4 érték között, míg az élesztő és a bakteriális enzimek pH 6,0-7,0 -tartományban (Movahedpour et al., 2022). A szekvencia-hasonlóság alapján a  $\beta$ -galaktozidázokat a glikozil- hidrolázok (GH) 1., 2., 35., 42., 59. és 147. családjába sorolják a CAZy adatbázisban, melyek együtt alkotják a Clan-A szuperfamilát. Szerkezetük  $(\beta/\alpha)_8$  henger, belső oldalukat 8 párhuzamos  $\beta$ -redő alkotja, melyet a külső oldalon 8  $\alpha$ -hélix vált (Vera et al., 2020).

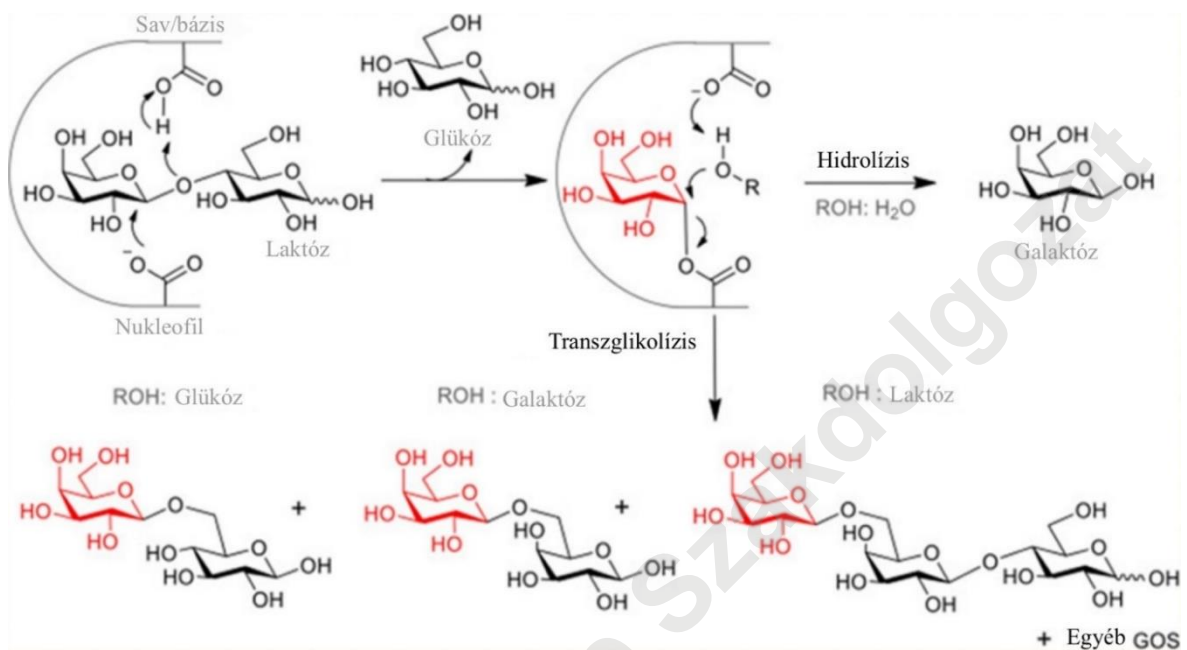
#### 3.5.1. Hatásmechanizmusuk

A  $\beta$ -galaktozidázok kétféle enzimátikus aktivitással rendelkeznek. Hidrolizálják a laktóz diszacharidot, az 1,4-galaktozidos kötéseik hasításával, melynek eredményeként 2 monoszacharidot a glükózt és a galaktózt kapjuk. Az enzimünk ezek mellett transzgalaktoziláz aktivitással is rendelkezik, mely során egy akceptor cukor molekulához a laktóz bontásából származó galaktozil részecskéket kapcsolja, így változatos polimerizációs fokú szénhidrát keverékek jönnek létre, ezek az úgynevezett galakto-oligoszacharidok (GOS).

A katalízisben két glutamin- vagy aszparaginsav- maradék játszik lényeges szerepet: az egyik sav/bázis katalizátorként, a másik pedig nukleofilként. A katalitikus folyamat egy kétlépéses kettős elmozdulásos mechanizmussal valósul meg. A kezdeti galaktozilezési lépésben a nukleofil maradék megtámadja a szubsztrátot az anomer centrumnál, míg a sav-bázis maradék savas segítséget nyújt a kilépő csoport távozásának elősegítése érdekében. Ha laktózt használnak szubsztrátként, kovalens galaktozil-enzim intermediert képződik, a laktózból történő glükóz felszabadulással együtt. A degalaktoziláció következő lépésében a sav-bázis maradék általános bázisként szolgál, és aktiválja az akceptor molekulát, amely megtámadja a galaktozil-enzim intermediert az anomer centrumban, és így olyan terméket eredményez, amely megtartja a szubsztrát anomer konfigurációját. Ha az akceptor víz, akkor

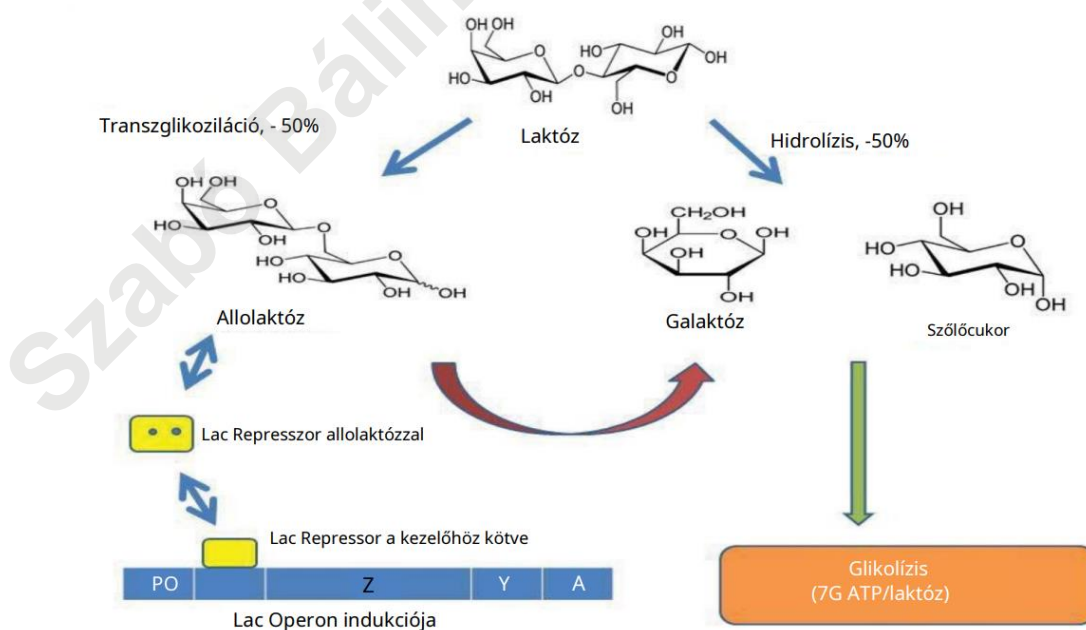


hidrolízis megy végbe, és a galaktóz felszabadul az enzim köztitermékéből. Ha azonban a cukrok szolgálnak akceptorként, transzglykoziláció megy végbe (Lu et al., 2020). A transzglykozilációs aktivitás, valamint a szubsztrátspecifitás és a glikozidos kötés preferenciája az enzimforrástól függően változik (Duan et al., 2022).



2. ábra A  $\beta$ -galaktozidáz katalitikus folyamatai (Lu et al., 2020 nyomán)

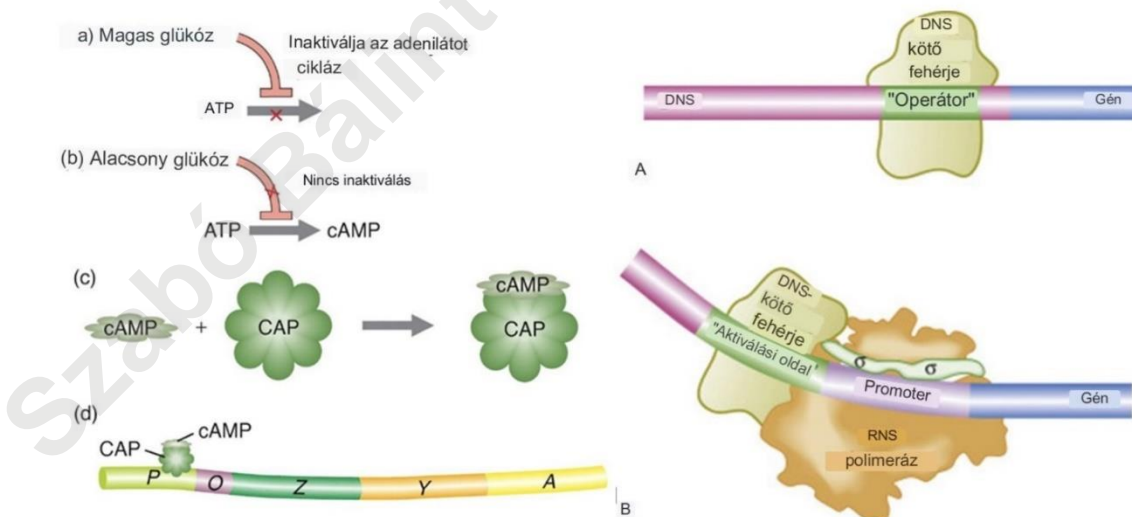
A tejsavbaktériumok laktóz hasznosításának első lépéseként a laktózt a baktérium sejtekbe kell szállítani, ez történhet laktóz-permeázok segítségével vagy a laktóz/D-galaktóz reverz transzporteren keresztül (Xu et al., 2022).



3. ábra A laktóz bontása  $\beta$ -galaktozidáz enzimmal (Sedzro et al., 2018 nyomán)

A laktóz önmagában nem képes indukálni a lac operont. A galaktozidáz enzimet kódoló operon operátor régiójához egy represszor fehérje kapcsolódik, amely meggátolja az transzkripcióért felelős RNS polimeráz kapcsolódását. A LacI gén felel a represszor fehérje expressziójáért, mely konstitutívan nyilvánul meg, azaz kis mennyiségben mindig jelen van. A gén promotere gyenge és irreverzibilisen kapcsolódik, ezért az operonról mindig termelődik kis mennyiségű  $\beta$ -galaktozidáz enzim. Transzgalaktozilációs aktivitása révén a laktóz jelenlétében képes allolaktózt képezni, amely korepresszorként indukálja a lac operon bekapcsolódását. Az allolaktóz képes megváltoztatni a represszor fehérje térszerkezetét, amely így már nem lesz képes specifikusan kötődni az operátor régióhoz.

A lac operon előtt olyan regulációs régiók helyezkednek el, mint a katabolit gént aktiváló fehérjék receptorai (CAP kötő hely). A CAP segíti a transzkripcióért felelős polimeráz kapcsolódását a  $\sigma$ -faktorok stabil kötődése által, de a fehérje önmagában nem képes kötődni a receptorhoz csak cirkuláris adenzin-monofoszfát (cAMP) jelenlétében, ha rendelkezésre áll glükóz, intracelluláris cAMP szintje alacsony, így nem alakul ki a megfelelő kötés és nem jön létre a fehérje-receptor komplex a gén átíródás stimulálásához. Alacsony glükóz koncentráció esetén cAMP éhezést jelző molekulaként CAP-cAMP komplexként erős induktorként fokozzák az operon átíródását.



4. ábra Katabolit gént aktiváló fehérjék szerepe (internet II; III)



### 3.5.2. $\beta$ -Galaktozidáz hatásai és ipari alkalmazása

Mikroorganizmussal vagy különböző enzimekkel kombinálva a  $\beta$ -galaktozidázokat a tejsavóban lévő laktóz lebontásában játszanak szerepet, melyet laktáttá, acetáttá, bioetanollá, butilén-glikollá és tagatózzá alakítanak. A  $\beta$ -galaktozidázok transzglykozilációs aktivitását a galakto-oligoszachidok (GOS) ipari szintézisében is alkalmazhatják, amelyek az emberi tej oligoszacharidjaihoz hasonlóan prebiotikumként szolgálnak és hozzájárulnak az egészséges bélmikrobiom fenntartásához. A GOS szelektíven serkenti a jótékony bélbaktériumok, például a *Lactobacillus*-ok és a *Bifidobacterium*-ok növekedését, amelyek növelik a rövid láncú zsírsavak (SCFA) termelését. A GOS hidratálja az élelmiszer-összetevőket, megakadályozva az élelmiszer-feldolgozás során a kiszáradást (Duan et al., 2022).

A  $\beta$ -galaktozidáz élelmiszeripari alkalmazásai az alábbiak lehetnek:

- (1) laktózmentes termékek előállítása;
- (2) csökkentett kalóriatartalmú ételek előállítása
- (3) a fagylaltok és a sűrített tej kristályosodásának csökkentése;
- (4) kedvezőbb fermentációs körülmények biztosítása

Más cukrokhoz (glükóz, galaktóz, fruktóz és szacharóz) képest a laktóz oldhatósága és édessége kisebb, tehát a laktóz hidrolízise megoldhatja az oldódás problémáját és növelheti az édesítő hatást. A laktóz hidrolízise tehát csökkenti a további édesítőszer hozzáadásának szükségességét, és ennek következtében redukálja a termékek kalóriaértékét. A laktóz hidrolízis termékei (glükóz és galaktóz) könnyebben erjeszhető szénhidrátok, ezáltal csökkenthető a megfelelő pH elérésének ideje a különböző élelmiszerek, mint a joghurtok és a túró előállítása során. Így a laktóz hidrolízise fontos klinikai, technológiai és környezetvédelmi szempontból (Movahedpour et al., 2022).

### **3.6. Probiotikumok és prebiotikumok bioaktivitása, szervezetre gyakorolt hatása**

A kutatók megerősítették, hogy a bélmikrobióta javítható prebiotikus kiegészítők bevitelével és probiotikumokat tartalmazó funkcionális élelmiszerek fogyasztásával (Dahiya és Nigam, 2022). A probiotikumok felveszik a versenyt a kórokozókkal azáltal, hogy modulálják a bél mikrobiótáját és immunmoduláló hatást fejtenek ki, emellett semlegesíthetik a Covid-19 fertőzéseket is. Fokozzák az epiteliális gátat, elősegítik a hasznos baktériumok adhézióját a bélnyálkahártyához, antimikrobás anyagokat termelnek amiatt akár az antibiotikumok alternatíváivá is válhatnak. A gasztrointesztinális megbetegedések esetén is hasznosnak bizonyulnak, megelőzik a fertőzések és az antibiotikumokkal, utazók hasmenéses megbetegedéseit, gyulladós bélszindróma és urogenitális fertőzések, valamint gyomorkefeszegély kezelésére is alkalmazzák. Az ételallergia, az elhízás, cukorbetegség enyhítésével is kapcsolatba hozzák, hiperkoleszterinémias hatásuk is van. A rákos megbetegedések kezelése kapcsán is felmerül alkalmazásuk. Rövid szénláncú zsírsavakat szintetizálnak. A száj egészségét is szabályozzák, a fogszuvasodás visszaszorításával (Das et al., 2022; Hill et al., 2014).

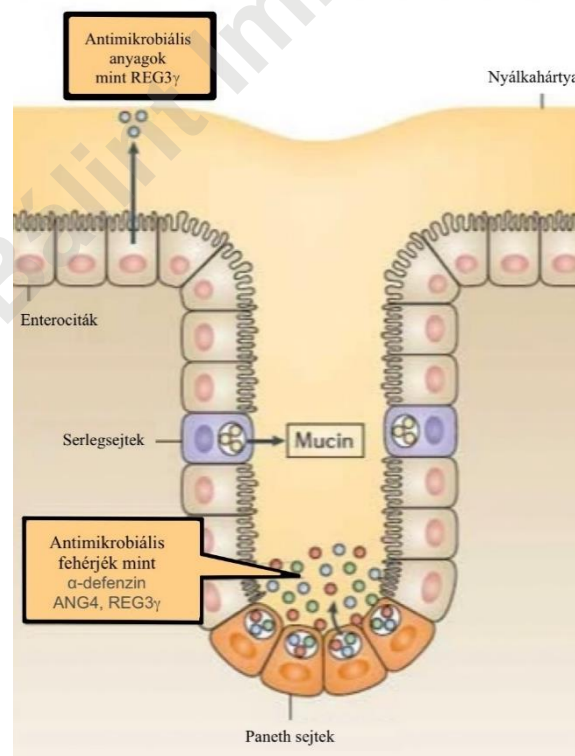
A probiotikumok megtarthatják vagy helyreállíthatják a bél mikroökológiáját antibiotikus kezelés után a receptor kompetíció, a tápanyag-kompetíció, a kórokozó hám- és nyálkahártyához való-tapadásának gátlásával. Szerves savak termelése révén csökkentik a vastagbélben a pH-t, mely a kórokozó fajok növekedésének akadályozásához vezet, serkentik az immunitást vagy az antimikrobiális anyagok termelését. Antioxidáns és gyulladásgátló tulajdonságokkal, valamint sebgyógyító tulajdonságokkal rendelkeznek (Das et al., 2022).

#### **3.6.1. Immunmoduláció**

A pre- és probiotikumok kombinációja segít megőrizni a bélgát megfelelő funkcióját. Bizonyos probiotikus fajok csökkentik egy másik faj populációját azáltal, hogy szabályozzák az immunrendszert a káros baktériumok elleni antagonistá hatás kifejtésével, fokozzák a vírusokkal szembeni adherenciát. Eltávolítják a bakteriális receptor helyeket, sztérikus gátlás által, szelektív metabolitokat választanak ki, versengés alakul ki a tápanyagokért és egyéb erőforrásokért, amely a mikroorganizmusok által felhasználható potenciális tápanyagok csökkenését eredményezi. A probiotikumok képesek modulálni a bélhámot, különböző metabolitok termelésével, mint szerves savak például a tejsav és ecetsav szekretált fehérjék, indolok, bakteriocinek. A szerves sav nem disszociált formájában belép a baktérium sejtjébe, és disszociál annak citoplazmájában. A kórokozó elpusztul, ha a

sejt pH-értéke túl savassá válik, vagy ha az ionizált szerves savból túl sok halmozódik fel a sejtben. A nizin komplexet képez a sejtfal lipidjével, majd aggregálódik, ezzel pórusokat képez a sejtfalon, ezzel az iontranszport is módosul a sejtek lízise is bekövetkezhet.

Testünk bélfelülete hatalmas 200m<sup>2</sup>-nyi területet ölel fel, a bőr további 2m<sup>2</sup>-t, ezen felszíni szövetek hatalmas feladattal birkóznak meg. Fenntartják a homeosztázist és az őshonos mikroorganizmusok bőséges organikus közösségét. Meggátolják a baktériumok, idegen antigének és mérgeanyagok szervezetbe jutását, ezzel látva el védelmi funkciójukat. Valamint csökkentik a víz és tápanyagvesztését a szervezetnek (El-Sayed et al., 2021). A kefeszegély elvesztése és a tápanyagfelvételre képtelen bolyhok megrövidülése az *E. coli* fertőzések mellett növelik a tápanyagok felszívódását, melyek bélelégtelenség és a rossz emésztés következtében alakulnak ki (Das et al., 2022). A hámfelületek aktív antimikrobás védelmének fenntartásáért az őshonos mikroorganizmusok felelősek. Vastag nyálkaréteget hoznak létre a hám felszínén. Hatással vannak a citokinekre, melyek összefüggésbe hozhatók a bélpermeabilitással. Antimikrobiális fehérjéket termelnek (AMP), ezek a katelicidinek, defenzinek, C-típusú lektinek és ribonukelázok, melyeket a bélfém 3 sejtvonala választ ki, ezek az enterociták, a paneth sejtek és a serleg sejtek. A fehérjék expressziója továbbá szoros összefüggésben van a mikrobiom diverzitásával.



5. ábra Bélfém által kiválasztott antimikrobiális fehérjék (Gallo és Hooper, 2012 nyomán)

A defenzinek kis peptidek/fehérjék melyeket probiotikus törzsek képesek kiválasztani, antibakteriális, antifungális és antivirális tulajdonságokkal bírnak. Negatív töltésű foszfolipid csoportjaik elektrosztatikus kölcsönhatások révén, defenzin pórusokat hoz létre a bakteriális sejtfalon, így kiváltva annak lízisét. A katelicidinek kationos,  $\alpha$ -helikális peptidek, melyek megszakítják a bakteriális membrán beépítését. Ezt 3 féle módon érhetik el a sejt típusától és állapotától függően, az AMP-k növekedési faktorokat szabadíthatnak fel melyek hozzájárulnak a transzlációhoz vagy megkötik és közvetlenül aktiválhatják a receptorokat, emellett inaktíválhatják a receptorokat a mikrodomainek megbontásával.

C típusú lektinek (REG3 $\alpha$ ), a Gram-pozitív baktériumok specifikus kapcsolódását biztosítják a hám felszínhez, mivel a peptidoglikán oldalláncaival képesek kapcsolatot létesíteni, amely a bakteriális sejtfal építőeleme.

A probiotikumok elfogyasztást követően kölcsönhatásba lépnek az enterocitákkal és a dendritikus sejtekkel, a Th1-vel, Th2-vel és a szabályozó T-sejtekkel (Treg) a bélben. Indukálják gyulladásgátló vagy pro-inflammatorikus citokinek termelését, melyek a későbbi immun jelátviteli útvonalakat nyithatnak meg (Kwok et al., 2022).

A Toll-like receptorok (TLR) jelátvitel gátlásával vagy fokozásával, immunszabályozó szerepet töltenek be. A baktériumok által termelt lipopoliszacharidok, flagellinek jelátvitelket indíthatnak el, melyek csökkenthetik vagy növelhetik egyes citokinek számát. A serlegsejtek mucint választanak ki, amelyek összeállnak, és vastag nyálkaréteget képeznek a hám felett. A mucinok glikoproteinek, melyek lipidek, fehérjék, immunglobulinok és sók keverékei. A nyálkarétegnek döntő szerepe van a szekretált AMP-k hámfelszín közelében történő koncentráálásában. A mucinok folytonos gélmátrixot szerkezeti alapot biztosítanak a nyálkahártya rétegnek, megvédik a beleket a kórokozótól, enzimektől, toxinoktól, a kiszáradástól és a kopástól. Ugyanakkor a bélnyálkahártyában exogén tápanyagok, például vitaminok és ásványi anyagok vannak jelen, amelyek növekedési előnyt biztosítanak a bélnyálkahártyában megtelepedett baktériumok számára (Han et al., 2021). Az extracelluláris fehérjék (mint a glikoproteinek) részt vesznek a mikrobiom és baktériumok adhéziós kötődésének megvalósulásában, melyet a probiotikum kolonizáció kritikus lépésének tekintenek (Han et al., 2021; Sánchez et al., 2011). A bakteriális sejtfal adhezint tartalmaz, amely más mikroorganizmusok bélfalhoz való tapadását meggátolja.

A bélhám sérülése esetén az antimikrobás fehérjék mennyiségének abnormális növekedése gyulladásokat okozhat, melyek hámkárosodást idézhetnek elő, ezzel megbontva a bélintegritását és potenciális lehetőséget biztosítanak a bél kórokozókkal szembeni kitettségének. Ezek a folyamatok, mind bélrendszeri gyulladással járó betegségek, mind az

emberi bőr gyakori rendellenességeinek kialakulásához vezetnek. Az irritábilis bélszindróma esetén is a gazdaszervezet és a mikrobiom kapcsolata sérül, nő a hám felülethez kapcsolódó baktériumok száma, melyek csökkentik az immunmechanizmusokat, genetikai változásokat idéznek elő. Az AMP szabályozó gének befolyásolásával, azok túlzott expresszióját váltják ki, itt lényegében a paneth-sejtek és serlegsejtekben képződik működési zavar. Az emberi bőrbetegségek, mint az atópiás dermatitisz, vagy a pikkelysömör is részben ennek köszönhető.

Az exopoliszachariok (EPS), egyedi reológiai tulajdonságainak és magas vízmegkötő képességük. Az EPS-t a baktériumsejtek termelik, hogy képesek legyenek túlélni az olyan zord körülményeket, mint a hő, kiszáradás, ozmotikus hatás és savas stressz. Javíthatják a baktériumtörzsek adhézióját vagy serkenthetik a bélsejtek adhéziós fehérjéinek expresszióját. Megvédi a termelő baktériumsejteket egyes antibiotikumok, toxikus vegyületek (kén-dioxid, etanol és mérgező fémionok) hatásától, valamint a gazdaszervezet immunrendszerének fagocitózisától. A biofilmben az EPS létfontosságú szerepet játszik az esszenciális kationok megkötésében, a sejtfelismerésben, a gazda-patogén kölcsönhatásokban (Daba et al., 2021). A *Lactobacillus*-ok felszínén, javíthatja a kommunikációt a bakteriális sejtek és a bélhám között a bélben való megtelepedéshez szükséges probiotikus sejtek adhéziója révén, azáltal, hogy fokozza a baktérium sejtek Caco-2 sejtekhez való tapadását (Dahiya és Nigam, 2022).

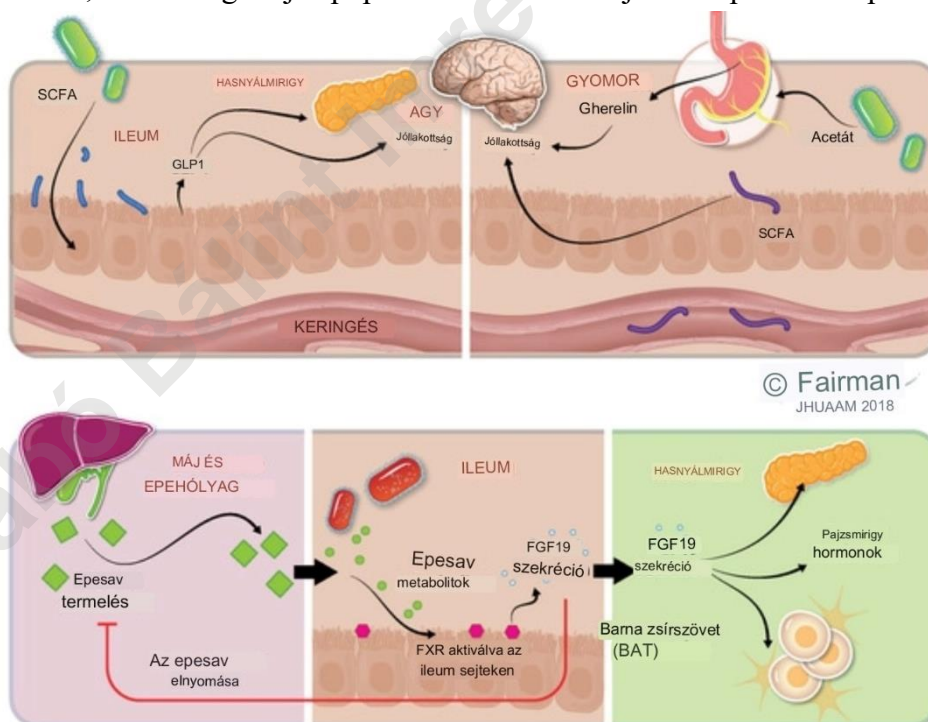
### **3.6.2. Elhízás és cukorbetegségre gyakorolt hatás**

Az étrend összetétele és forrása a mikrobióta vitalitását és összetételét befolyásoló fő tényezők. Az édességek, üdítőitalok és gyorsételek fogyasztásának világszerte tapasztalható növekedése a magas szénhidrát-tartalmú, alacsony aminosav-tartalmú étrend fogyasztása megzavarja a *Firmicutes-Bacteroidetes* arányt. A korlátozott fehérjebevitel a máj génexpressziós mintázatára van hatással, csökkenti a máj farnezoid X receptor FXR-FGF15 jelátvitelét. A rostszegény, magas vörös hús tartalmú étrend daganatképződést indukálhat (El-Sayed et al., 2021).

A probiotikumok hatékonyan alkalmazhatók az elhízás ellen is. Rövid láncú zsírsavakat (SCFA) termelhetnek, amelyek 2-6 szénatomosak lehetnek. Fokozódik a fermentáció során hasznosítható rostok mennyisége, zsír- és glükózmetabolizmuson keresztül az SCFA-k csökkentik a zsírsejtek méretét és a zsírsavak oxidációja révén mérséklék a zsír felhalmozódását. Közéjük tartozik az acetát, a butirát a laktát és a propionát. Prebiotikumként a bélrendszeren túlra is képesek eljutni (Das et al., 2022).

Közvetlen vagy közvetett módon segítik a koleszterinszint csökkenését, *de novo* szintézis gátlásával közvetlen mechanizmussal csökkentik az étrendből származó koleszterin asszimilációját a bélben. Szabályozzák az epesó hidroláz géneket. Az enzim felelős az epesav hidrolíziséért, ezáltal kevésbé oldódik, a széklettel kiürül a szervezetből és csökken az epeszterolok mennyisége. A koleszterin-reduktázon keresztül a koleszterint bélszterolokká alakítják. A szérumban a koleszterinszint csökkenésével, a *de novo* epesav termelése nő, amely felületaktív anyagként hozzá segíti a koleszterin felszívását a baktériumsejt membránjába.

Közvetlenül módosíthatják a gazdaszervezet idegi aktivitását, de serkentik a bélhormonok, például a glukagonszerű peptid 1 (GLP-1) és a tirozin tirozin peptid (PYY) felszabadulását is, amelyek szabályozzák a gazdaszervezet étvágyát és jóllakottságát (Sarkar et al., 2018). GLP-1 egy endogén bélhormon, amelyet L-sejtek választanak ki, és az enteroglukagonhatáson keresztül kritikus fontosságú az inzulinszekréció elősegítésében. Serkenti a hasnyálmirigy  $\beta$  sejtjeinek inzulinszekrécióját, és gátolja a glukagon szekréciót az  $\alpha$  sejtek GLP-1 receptorának aktiválásával. Másrészt elősegítheti a  $\beta$ -sejtek proliferációját és regenerálódását, valamint gátolja apoptózisukat a G-fehérjéhez kapcsolt receptoron.



6. ábra A mikrobiom befolyása az elhízásra (Lee et al., 2020)

Leptin szint emelésével, leptinreceptorok aktiválása révén elősegíti a GLP-1 szekrécióját. Gyermekkori elhízás kialakulásában a leptin a hipotalamuszra hat, és anorexiás hatást fejt ki



a súlycsökkentés érdekében. A probiotikumok a leptinszint növelésével és az energiabevitel visszaszorításával is kezelhetik a gyermekkori elhízást.

Az oxidatív stresszt károsítja a hasnyálmirigy  $\beta$  sejtjeit és az inzulin átviteli utakat. A probiotikumok szuperoxid-diszmutáz enzimükkel lebontják a reaktív oxigénvegyületeket, ezzel fejtvé ki antioxidáns hatásukat. A *Lactobacillus*-ok egyes metabolitjai (glutathion, butirát és folát) növelhetik az antioxidáns enzimek aktivitását. Csökkenthetik a reaktív oxigénfajtákhoz kapcsolódó enzimek (pl. citokróm P450 enzimek és NADPH-oxidáz) aktivitását. A mitokondriális egészség javításával helyreállítja a zsírsavak  $\beta$ -oxidációját, így csökkenti a zsírsavak felhalmozódását a májban és javítja a glükóz anyagcserét az egész szervezetben (Li et al., 2022).

Az FXR jelátvitel egyik útja, amelyen keresztül az epesavak és a bélmikrobióta hozzájárul a gazdaszervezet anyagcseréjéhez. Az epesavakat primer és szekunder epesavakká metabolizálja, melyek FXR receptorokhoz kötődve serkentik a bélből származó hormonok, mint a fibroblasztok szekrécióját. Az FGF 19 növekedési hormon szabályozza az epesav szintézist, valamint a lipid- és glükóz metabolizmust. A megnövekedett epesavsintézis hozzájárul a megnövekedett energiafelhasználáshoz a gazdaszervezetben azáltal, hogy stimulálja a barna zsírszövetet és a vázizomzatot a TGR5-ön, egy membránhoz kötött G-fehérjéhez kapcsolódó epesavreceptoron keresztül, és növeli a pajzsmirigyhormonok szintjét a 2-es típusú dehidrogenáz aktiválásával (Lee et al., 2020).

Egyes citokinek, mint például T-sejtek által szekretált interleukin-6 serkenti a C-reaktív fehérje és a diszglykémiával összefüggő makrofágok termelődését (Li et al., 2022).

Az étrend által kiváltott elhízás és a cukorbetegség modelljeit a keringő lipopoliszacharidok (LPS) megnövekedett szintje jellemezte. A vér LPS kismértékű (azaz az alapszint feletti 2-4-szeres) növekedése kulcsfontosságú tényezőnek bizonyult, amely kiváltja az alacsony fokú gyulladást és végül az inzulinrezisztenciát az elhízás és a kapcsolódó kardiometabolikus rendellenességek során (Wieërs et al., 2019).

### **3.6.3. Laktóztolerancia**

Manapság a laktóz intolerancia egy globális méretet öltő betegség, a föld népességének mintegy 75%-át érinti. Főként az ázsiai, dél-afrikai és afrikai rasszoknál jelentős, a laktóz (tejcukor) lebontásának képtelensége. A  $\beta$ -galaktozidáz (laktáz) enzim aktivitása csecsemőkorban a legintenzívebb és az idő előrehaladtával ennek mértéke csökken. Az embereknél 20-40 éves kor környékén jelentkeznek a tünetek, melyek a következők

lehetnek: gasztrointesztinális jellegűek (hasi fájdalom, hasmenés, hányinger és puffadás). Az emésztetlen laktóz ozmotikus hatása révén elektrolit és folyadék szekrécióhoz vezet, valamint a vastagbél baktériumai rövid szénláncú zsírsavakra, szén-dioxidra és hidrogénre bontják, melyek a panaszok kiváltó okául szolgálnak. A tej fogyasztása azonban fontos, hiszen ez a fő kalcium forrásunk és vitaminokat tartalmaz (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, D, E, K), nem megfelelő mennyiségű bevitele csonttrikuláshoz vezet, amelynek következménye csonttörés is lehet (Juhász, 2005).

A laktózintoleranciában szenvedők fogyaszthatnak olyan fermentált tejtermékeket, amelyek nagyon kevés vagy egyáltalán nem tartalmaznak laktózt. A különböző forrásokból (baktériumokból, gombákból stb.) kivont  $\beta$ -galaktozidázok felhasználhatók a tej laktóz tartalmának lebontására, a laktóz intolerancia okozta problémák és kellemetlenségek leküzdésére (Movahedpour et al., 2022).



## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Alkalmazott törzs

A kutatásom során a probiotikus *Lactobacillus fermentum* LF08 törzset használtam fel, amelyet a Probiotical S.p.A. forgalmaz.

### 4.2. Alkalmazott tápközegek

A liofilizált baktérium törzsek revitalizálásához, fenntartásához, valamint az enzim fermentációhoz különböző összetételű MRS tápközegét állítottam össze.

1. táblázat MRS (de Man Rogosa Sharpe) tápközeg

Összetevő	Mennyiség
Glükóz	20 g
Proteóz-pepton	10 g
Húskivonat	8 g
Élesztőkivonat	4 g
Nátrium-acetát	5 g
Triammónium-citrát	2 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	2 g
Tween 80	1 g
Magnézium-szulfát	0,2 g
Mangán-szulfát	0,05 g
Desztillált víz	1000 ml

2. táblázat 2%/4% laktóz tartalmú MRS tápközeg

Összetevő	Mennyiség
Laktóz	20 g/40 g/
Proteóz-pepton	10 g
Húskivonat	8 g
Élesztőkivonat	4 g
Nátrium-acetát	5 g
Triammónium-citrát	2 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	2 g
Tween 80	1 g
Magnézium-szulfát	0,2 g
Mangán-szulfát	0,05 g
Desztillált víz	1000 ml

- **MRS+Szerves nitrogénforrás**

Szerves nitrogénforrás szelekcióhoz, nitrogén mentes 4% laktóz tartalmú MRS tápközeget készítettem, melyet külön-külön egészítettem ki 10 g proteóz-peptonnal, 8 g húskivonattal és 4 g élesztőkivonattal.

- **MRS+szervetlen nitrogénforrás**

Szervetlen nitrogénforrás szelekcióhoz, nitrogén mentes 4% laktóz tartalmú MRS tápközeget készítettem, melyet külön-külön kiegészítettem 20-20-20g ammónium, -nitráttal, -szulfáttal és -kloriddal.

- **MRS+szénforrás/ok**

A szénforrás szelekcióhoz, szénforrásmentes MRS tápközeget készítettem. Az egyéni hatások vizsgálatára 10-10-10 g galaktózt, glükózt és laktózt adtam az elkészített tápközeghez. Az együttes hatások megfigyelésére 1% szénforrás tartalmú MRS közegeket állítottam össze, melyek szénforrás összetétele: 0,5-0,5 g galaktóz-glükóz, 0,5-0,5 g galaktóz-laktóz, és 0,5-0,5 g glükóz-laktóz

Az adott kísérleteknek megfelelő mennyiségű és összetételű tápleveseknél, a legfontosabb tényező, hogy sterilek és kontamináció mentesek legyenek, hogy csak az adott törzset specifikusan tudjuk vizsgálni. E célból a sterilizandó tápközegeket tartalmazó kémcsöveket és lombikokat autoklávba helyeztem 15 percre 121°C hőmérsékleten.

### 4.3. Alkalmazott puffer és reagensek

McIlvaine puffer (pH=6,5):

- 0,1 M citromsav oldat (21,008g/l)
- 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (35,63g/l)

Az oldatok megfelelő arányú összemérésével készítem el a puffert mágneses keverő és pH mérő segítségével. pH 6,5 esetén 71% 0,2 M-os  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  oldatra és 29% 0,1M citromsav oldatra lesz szükség, az esetleges korrekciót a megfelelő törzsoldat adagolásával végeztem.

Cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB)

- 0,45g szilárd CTAB
- 1 liter desztillált víz

Analitikai mérlegen főzőpohárba kimértem a szükséges anyagmennyiséget, majd desztillált vízzel jelre töltöttem.

#### 4.4. Enzim aktivitás méréséhez szükséges reakcióelegyek

Szubsztrátum

- 0,01125g szilárd p-nitrofenil- $\beta$ -D galaktopiranozid
- 25 ml desztillált víz

A szilárd szubsztrátum kimérése analitikai mérlegen történt egy főzőpohárba, amelyet kevés desztillált vízben feloldottam mágneses keverővel, majd mérőlombikba töltöttem és az anyagvesztés elkerülés érdekében többször is átmostam. Végezetül jelre töltöttem.

#### 4.5. Alkalmazott módszerek

##### 4.5.1. *Lactobacillus fermentum* törzs fenntartása

A *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs kultúra liofilizált formában állt rendelkezésemre, ezért első lépésként a baktérium sejtek revitalizálását kellett elvégeznem, amelyhez standard MRS tápközeget készítettem 10 ml-es kémcsőbe. A steril tápoldatot tartalmazó kémcsőbe steril körülmények között adtam egy jó késhegnyit a liofilizált, szárított formában lévő kultúrámból. A beoltott tenyészetet 24 órára 37°C-os termosztátba helyeztem. A nagyobb sejthozam és a kedvezőbb aktivitás eléréseért, különböző összetételű inokulum tenyészeteket is készítettem. A párhuzamos kísérletek számától, az optimalizálandó paramétereiktől függően ezeket 10 ml, illetve 20 ml-es kémcsővekbe öntöttem, amelyekbe 0,5-1 ml baktérium tenyészetet oltottam be. A törzsfenntartás ebben az esetben is 37°C hőmérsékleten 24 órán át tartott.

##### 4.5.2. *Lactobacillus fermentum* törzs enzimfermentációja

A fermentációs tápközegnek szintén biztosítani kell a *Lactobacillus* törzsem számára megfelelő körülményeket. A kísérleti beállításhoz megfelelően 50 és 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban készítettem el a fermentációs tápleveseket, melyekhez az előzetesen elkészített inokulumokból 5 térfogat%-nyi mennyiséget pipettáztam. A fermentáció 37°C-on zajlott. Különböző időintervallumokban 16, 24 és 48 óra elteltével elszívó fülke alatt automata pipetta segítségével centrifugacsővekbe 25 ml mintát vettem, és előkészítettem az enzim aktivitás méréshez.

##### 4.5.3. Sejtfeltárás

Az általam vizsgált  $\beta$ -galaktozidáz intracellulárisan termelődik, az enzimhez való hozzáféréshez a sejtek lízise szükséges, mely során a sejtmembrán szerkezete meg bomlik és a sejt tartalma a táplevesbe kerül. Először a centrifuga csővekbe gyűjtött mintákat 10 percig 10.000 rpm-en és 4°C-on centrifugáltam, mely során koncentráltam és összegyűjtöttem a

sejteket. A felülúszót elöntöttem, majd a centrifuga csövek alján összegyűlt sejtekre 5 ml McIlvaine puffert mértem, visszaszuszpendáltam, majd vortexeltem. Ezt a folyamatot 2x ismételttem. A folyamat során kinyert sejteket végezetül 2 ml McIlvaine pufferben vortex segítségével homogenizáltam, és ehhez pipettáztam hozzá az 1 ml cetil-trimetil-ammonium-bromid (CTAB) oldatot. A CTAB egy kationos felületaktív anyag, mely antimikrobás és bakteriosztatikus hatással rendelkezik, a membrán szerkezetet roncsolja, emellett a poliszacharid szennyeződések is képes eltávolítani. A megfelelő hatás eléréséért 10 percig hagytam hatni a detergenst, és az aktivitás mérése előtt még egy vortex lépést is beiktattam.

#### 4.5.4. $\beta$ -Galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározása

Az aktivitás méréséhez, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid szubsztrátumot alkalmaztam, amely egy mesterségesen előállított kromogén szubsztrát. A  $\beta$ -galaktozidáz  $\beta$ -D kötéseinél hasítja, így az enzim mennyiségével arányosan p-nitrofenol szabadul fel, amely sárga színreakciót ad. A reakció során megjelenő színintenzitással, az enzim aktivitás mértéke spektrofotometriás méréssel nyomon követhető. Az egységnyi enzim pedig az az enzim mennyiség, amely 1  $\mu$ M p-nitrofenolt szabadít fel egy perc alatt a reakciókörülményeken. A reakcióelegy összeállításához szükséges reagenseket 6. táblázat szerint készítettem el.

3. táblázat Reakcióelegyek tartalma

	McIlvaine puffer (pH 6,5)	Desztillált víz	Szubsztrátum	Minta
<b>Műszervak</b>	0,3 ml	0,7 ml	-	-
<b>Szubsztrátumvak</b>	0,3 ml	0,2 ml	0,5 ml	-
<b>Enzimvak</b>	0,3 ml	0,5 ml	-	0,2 ml
<b>Reakció elegy</b>	0,3 ml	-	0,5 ml	0,2 ml

A reakcióelegyeket a mintha hozzáadása nélkül készítettem el, amelyeket 40-50°C hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztem előinkubációs céllal. A reakciót a megfelelően hígított minták hozzáadásával indítottam, melynek ideje 5 perc volt. Az időleltével 5ml 0,1M-os  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  állítottam le a folyamatot. A mintákat Eppendorf csövekbe töltöttem és 10.000 rpm-en 5 percig centrifugáltam, hogy a mérés során a megmaradt sejttörmelék ne befolyásolja a kapott eredményeket. Az abszorbanciát 405 nm-en mértem a műszervakra nullázott spektrofotométer segítségével. Az enzimaktivitást a következő egyenlet segítségével határoztam meg:

$$\text{Aktivitás} \left[ \frac{NE}{ml} \right] = \frac{(A_{\text{minta}} - A_{EV} - A_{SZV}) * h * V_r}{V_m * t * 2,559}$$

A: mért abszorbancia érték (minta, enzimvak és a szubsztrátum)

h: enzim oldat hígítása

V<sub>r</sub>: a reakció térfogata [ml]

V<sub>m</sub>: a bemért enzim oldat térfogata [ml]

t: reakció idő [min]

2,559: p-nitrofenol kalibrációs egyenesének meredeksége

Szabó Bálint Imre Szakdolgozat

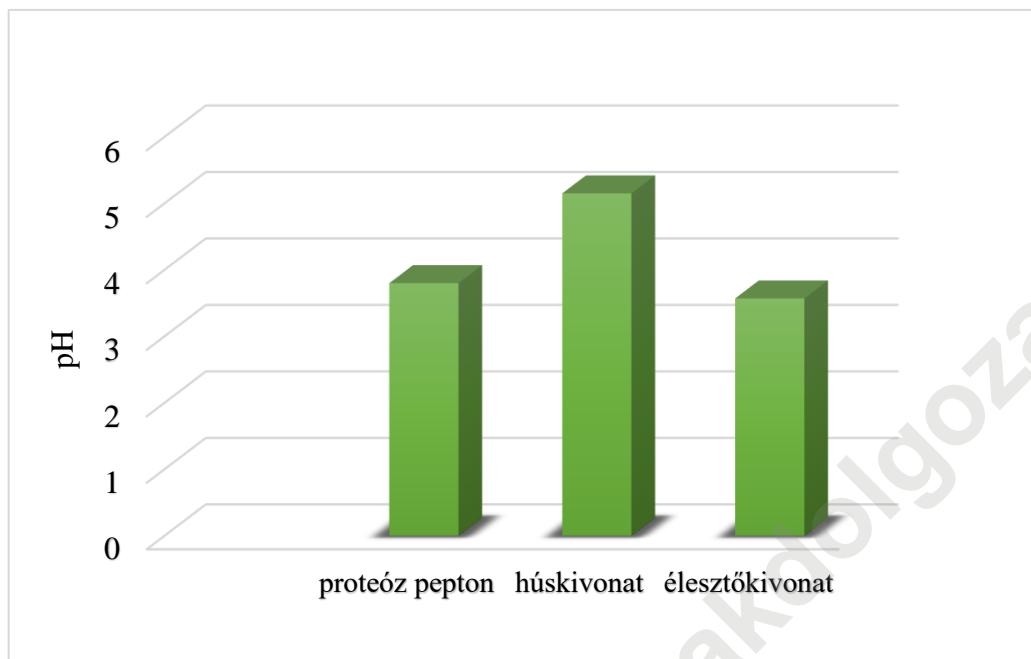
## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Kutatómunkám során a probiotikus *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének optimalizálását céloztam meg, mely a Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszéken folyó kutatások eredményeként került kiválasztásra, mint a legjobb  $\beta$ -galaktozidáz termelő törzs (Tóth, 2019). A vizsgált probiotikum  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének fokozását tápközeg optimalizációs kísérletekkel terveztem megvalósítani, különös tekintettel a tápközeg nitrogén és szénforrásának minőségi és mennyiségi összetételére.

### 5.1. Szerves nitrogén források hatása a laktáz aktivitásra

A szerves nitrogén források vizsgálatához egy módosított összetételű MRS tápközeget alkalmaztam. Vasudha és Gayathri (2023) kutatási eredményei alapján a fermentációs tápközeg 4% körüli laktóz tartalma pozitívan hatott az általam választott törzs  $\beta$ -galaktozidáz aktivitására, így én is ezt a beállítást alkalmaztam. Ezen felül a MRS-ben lévő nitrogén források hasznosításával kapcsolatban szerettem volna információt szerezni, melyik hatása kedvezőbb a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitására. Gomaa (2018) megállapította, hogy a *L. delbrueckii* és a *L. reuteri* bioszintéziséhez szerves összetevőkre van szükség, s általában a tejsavbaktériumokra jellemző az összetett tápanyagigény. A mikroorganizmusok a nitrogén forrásokat aminosavak, illetve fehérjék, lipidek és rostok felépítésére használja fel, emellett fontosak a sejt membránok szintéziséhez, mivel ezek a sejtfal esszenciális elemei. A tápanyagok specifikus vizsgálatára nitrogén forrás mentes MRS tápközeget állítottam össze, melyhez az egyéni hatások érdekében külön-külön adtam nitrogén tartalmú komponenseket, proteóz peptont, élesztőkivonatot és húskivonatot. A liofilizált sejtek revitalizációjához glükóz tartalmú MRS tápközeget alkalmaztam. A tápközegben található glükóz hozzájárul a tejsavbaktérium sejtek gyors növekedéséhez az első 24 órában, mint energia és szénforrás. A folyamatot a tejsav koncentráció növekedése és a glükóz csökkenése jellemzi, melyet Park és Oh (2010) kísérlete is jól reprezentál. A legtöbb tejsavbaktérium számára az ideális fermentációs hőmérséklet 37°C-ra tehető, melyet számos eredmény igazol (Alazzez és társai 2009, Carević és társai 2017, Gomaa 2018, Liu és társai 2011, Kim és Rajagopal 2000, Vasudha és Gayathri 2023). A fermentációs idő kiválasztásában Havas (2014) által vizsgált *L. acidophilus* La-5 törzs 24 órás fermentációt követő kiemelkedő  $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitása ösztönzött. Az enzimaktivitás mérés megkezdése előtt, a tenyészetem életképességének ellenőrzését végeztem el, a laktóz tartalmú tápleves kémhatásának mérésével. A tejsavbaktériumok anyagcserefolyamataik következtében a tápleves pH-ját savas irányba tolják, az általuk termelt tejsavnak köszönhetően. A heterofermentatív törzsek

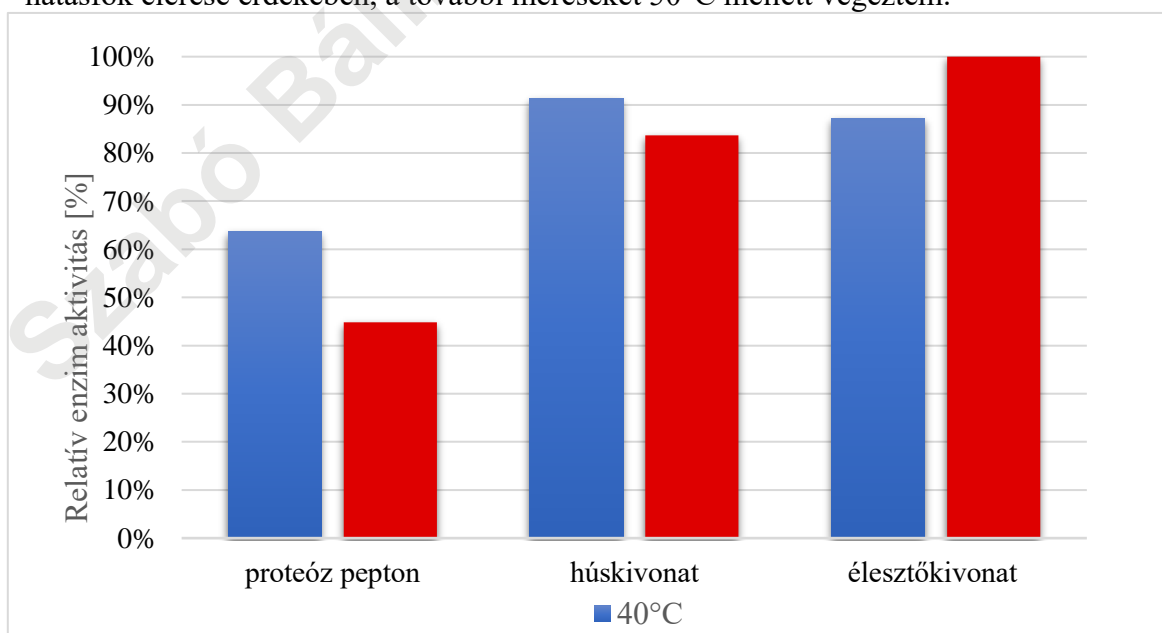
másodlagos metabolitként további savakat is termelhetnek. A kísérleti eredményeket a 7. ábrán mutatom be



7. ábra Különböző nitrogén tartalmú MRS tápközeg pH értékei *L. fermentum* LF08 törzsszel megvalósított 24 órás fermentációt követően

A minták enzim aktivitás mérését 40°C és 50°C-os vízfürdőben mértem, mert Liu és társai (2011) által vizsgált *Lactobacillus fermentum* K4  $\beta$ -galaktozidáz enzimének optimális működési hőmérséklete 40 °C volt transzgalaktozilációs aktivitás és 50°C körüli a laktózhidrolízis esetén. A 24 órás fermentációt követően mért kémhatás a tápközeg kiindulási pH 6,8-as értékéhez képest minden esetben csökkent, legkisebb mértékben a húskivonatot tartalmazó tápközeg értéke változott, pH 5,15-re. Az élesztőkivonat (pH 3,8) és a proteóz pepton (pH 3,6) jelenlétében intenzívebb savtermelést tapasztaltam, amely arra engedett következtetni, hogy ezen tápközegeken a sejtek jobban növekedtek. Bár Gomaa (2018) feljegyzett pH értékei, melyeket módosított MRS tápközegben 24 órás inokulum és 72 óra fermentációt követően külön-külön élesztőkivonat, pepton és húskivonat kiegészítésével kapott, az általam mértéknél nagyobbak, mégis az általa leírt enzimtermelés jobbnak bizonyult. Azok a környezeti körülmények, amelyek kedveznek a tenyészetek szaporodásának, és nagy sejthozamot produkálnak, nem biztos, hogy az enzim tevékenységére nézve is ígéretesek. A *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs, a proteóz pepton és a húskivonat tartalom mellett 40°C-on mutat magasabb aktivitást, de a legmagasabb értéket 50°C-on az élesztőkivonat produkálta, ezért az eredményeim nem támasztják alá biztosan az 50°C-os optimum értéket. Tóth (2019) és Nagy (2019) azonos törzsön végzett kísérletei, azonban megerősítenek abban, hogy a továbbiakban, vizsgálataimat 50°C-on

végezzem. A szerves nitrogén források közül, az élesztőkivonat hasznosítása esetén érte el a legmagasabb szintet a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitása. 37°C-os hőmérsékleten mérve, Alazzeh és társai (2009) szintén az élesztőkivonatot találták a leghatékonyabbnak a fehérjeforrások közül *Lactobacillus reuteri* törzsekkel termelt  $\beta$ -galaktozidáz esetén, 40°C-on Gomaa (2018) azonos törzsnél a peptont, *L. delbrueckii* törzsnél azonban már a húskivonatot tapasztalta. A törzseken belüli eltérő hasznosítás is érzékelteti a tápközeg optimális fontosságát. Pavithra (2018) említést tesz arra, hogy a *Bifidobacterium* törzsek tenyészetinél az élesztőkivonat bizonyult alkalmasabbnak a  $\beta$ -galaktozidáz termeléséhez, melyet Gomaa (2018) is említ a *Bifidobacterium animalis* esetén. A *Lactiplantibacillus plantarum* (Vasudha és Gayathri, 2023) esetén alacsonyabb hőmérsékleten a húskivonatot tartalmazó táplevesben nagyobb enzimaktivitást tapasztaltak, mely tendencia az általam kapott eredményeknél is fellelhető. Annak ellenére, hogy a proteóz pepton tápanyag összetevő mellett a pH igen alacsonynak bizonyult, az enzimaktivitás mind a két vizsgált hőmérséklet esetén a legkisebb értéket mutatta, vagyis a kiválasztott enzimek hatékonyságát a túlzottan savas közeg negatívan befolyásolhatja. Kevésbé savas pH-n Gomaa (2018) által vizsgált törzsek pepton hasznosítása jobbnak bizonyult, azonban ezek az eredmények a törzs preferenciájából is fakadhatnak. Összességében elmondható, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz 4% laktóz tartalmú MRS tápközegben, különböző szerves nitrogén források jelenlétében is termelődött, melyek közül legsikeresebbnek az élesztőkivonat mutatkozott. A *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs optimális hőmérséklete termofil karakterisztikát mutat, a legjobb hatásfok elérése érdekében, a további méréseket 50°C mellett végeztem.

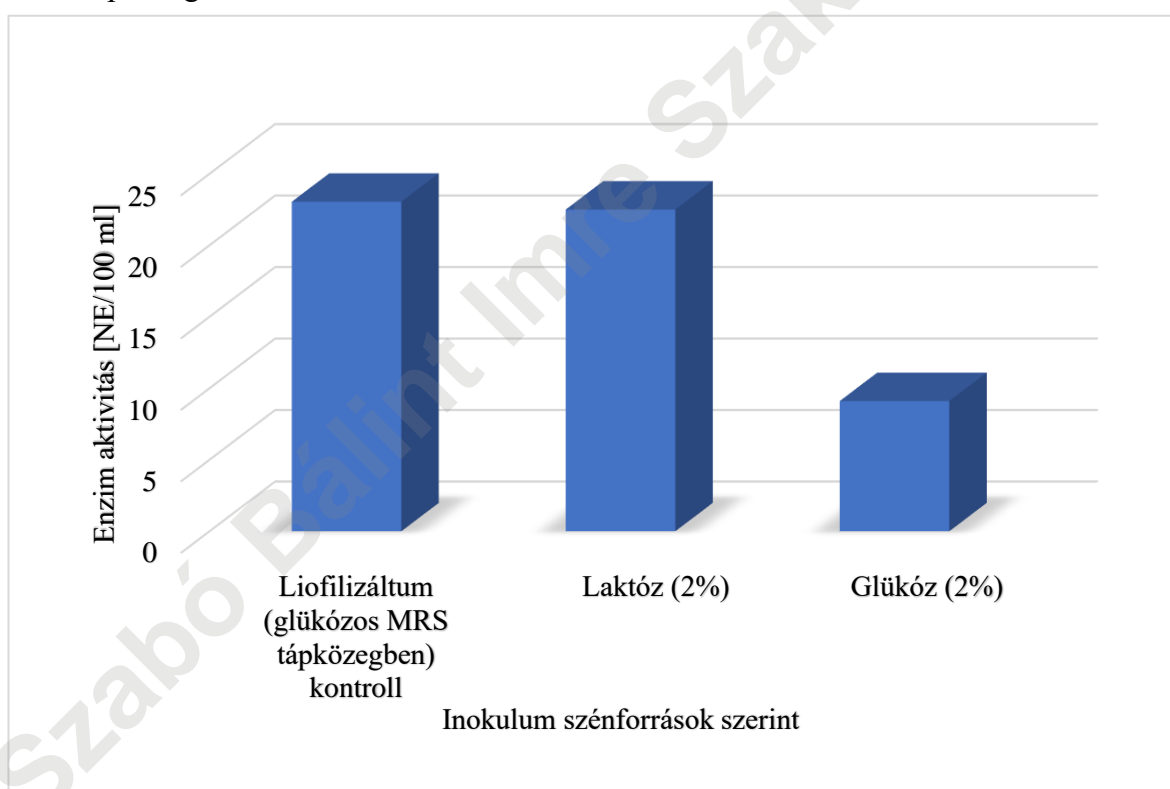


8. ábra *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs  $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitása szerves nitrogén tartalmú tápközegekben



## 5.2. Az inokulum tápközegek hatása a $\beta$ -galaktozidáz termelésre

Az előző kísérlet során a liofilizált sejtek hidratálásához glükóz tartalmú MRS tápközeget alkalmaztam, mely pozitívan hatott a sejtek életképességére. Az enzimek alacsonyabb szintű termelése viszont további változtatásokat kívánt meg. A megoldás a törzsek fenntartó közegének optimálásában rejlett, ugyanis a *Lactobacillus fermentum* törzsek magas laktóz preferenciával rendelkeznek, így az inokulum tápközegeket glükóz helyett laktózzal készítettem. A laktóz a  $\beta$ -galaktozidáz kódoló gének expressziójában játszik fontos szerepet. A továbbiakban megfigyeltem az enzimek aktivitásának alakulását, melyet a 9. ábrán mutatok be. Az összehasonlításhoz 2% laktózos és 2%-os glükózos tápközeget állítottam össze. A liofilizátumból származó baktérium tenyészeteket továbbra is glükózos MRS tápközegekben revitalizáltam, melyből a különböző szénforrás tartalmú inokulum tápközegekbe oltottam steril körülmények között. A liofilizátumból átoltás nélkül indított MRS tápközeget kontrollként használtam fel.



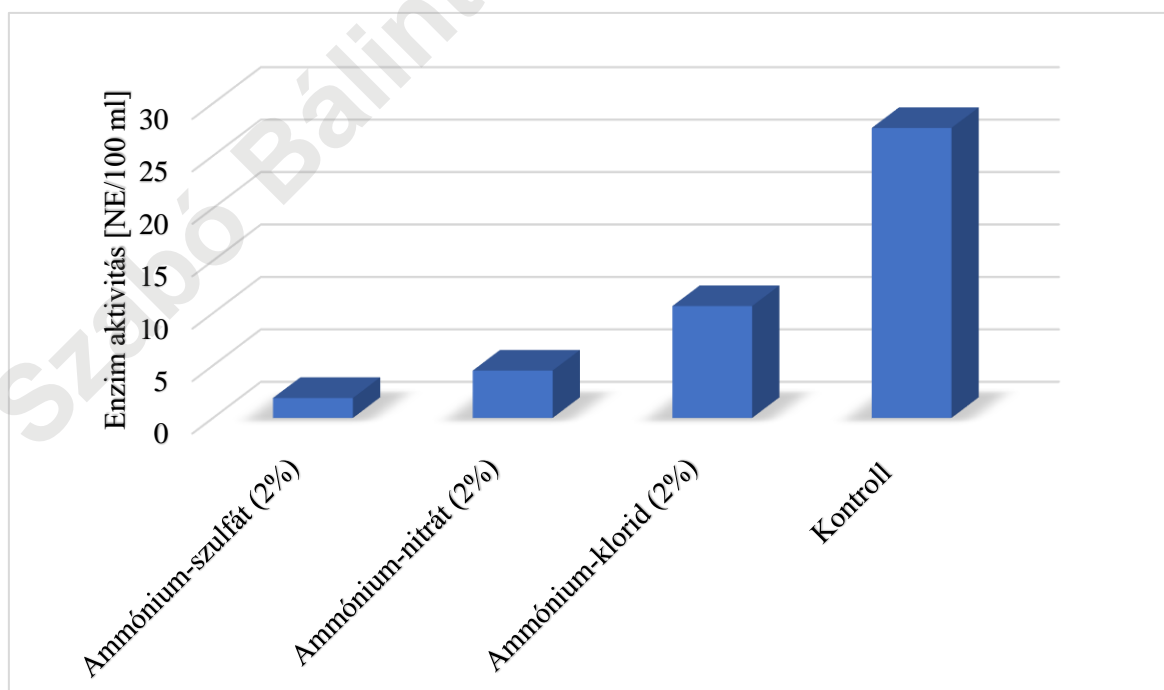
9. ábra Különböző szénforrás tartalmú inokulum tápközegek hatása a *L. fermentum* LF08  $\beta$ -galaktozidáz aktivitására

A laktóz szénforrás esetén az enzim aktivitások (22,5 NE/100 ml) a kontroll (23 NE/100 ml) mintához viszonyítva, nem mutattak nagy eltérést, ezért megállapítható, ha glükóz tartalmú tápközegről átvisszük a sejteket laktózos tápközegre, akkor az enzim hatékonyságára gátló hatást nem fejt ki. A szembevetendő változás azonban a 9. ábrán a glükóz szénforrások esetén figyelhető meg. Az enzim aktivitása több mint 50%-kal csökkent, a kontroll mintáénak

csupán csak 39,57%-a. Ennek fényében a laktóz jelenlétében bekövetkező pozitív hatás beigazolódik, ellentétben a glükózzal. Az eleve glükózos tápanyagban felszaporított tenyészet, glükózos közegbe való átvitele katabolit repressziót vált ki, mellyel a csökkent  $\beta$ -galaktozidáz termelés magyarázható. A katabolit represszió hatása a  $\beta$ -galaktozidázok kifejeződésért felelős operonra gyakorolt hatásában rejlik. A glükóz lebontása a prokarióta szervezetek által, egyszerű és gyors, kedvező a mikrobák szaporodásának. A laktóz diszacharid hasznosuláshoz azonban először  $\beta$ -galaktozidáz enzimet kell szintetizálniuk, mely glükózzá és galaktózzá hidrolizálja a laktózt. A repressziós folyamat hatása a *Lactobacillus fermentum* LF08-as törzs esetén is tapasztalható, ennek fényében a szervesetlen nitrogénforrások befolyását a  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésére már 2%-os laktóz tartalmú inokulum alkalmazásával végeztem.

### 5.3. Szervesetlen nitrogén források hatása a $\beta$ -galaktozidáz termelésre

A különböző nitrogén tartalmú tápközegek enzim termelésre gyakorolt hatásának feltérképezéséhez, az inokulum optimalizálás során  $\beta$ -galaktozidáz termeléshez ideálisnak talált 2% laktóztartalmú tápleves szolgált törzsoldatként, az új inokulum elkészítéséhez. A szervesetlen nitrogén tápanyagok fermentációjához, ismét nitrogén forrás mentes 4%-os laktóz tartalmú MRS-t használtam, melyet ammónium-szulfáttal, ammónium-nitráttal és ammónium-kloriddal egészítettem ki. A pozitív kontroll tartalmazta az MRS tápközegben előírt összes nitrogén forrást, így az előző kísérlet ellenőrzésére is felhasználható.



10. ábra Szervesetlen nitrogén források hatása az *L. fermentum* LF08  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelődésére 4% laktóz tartalmú MRS levesben

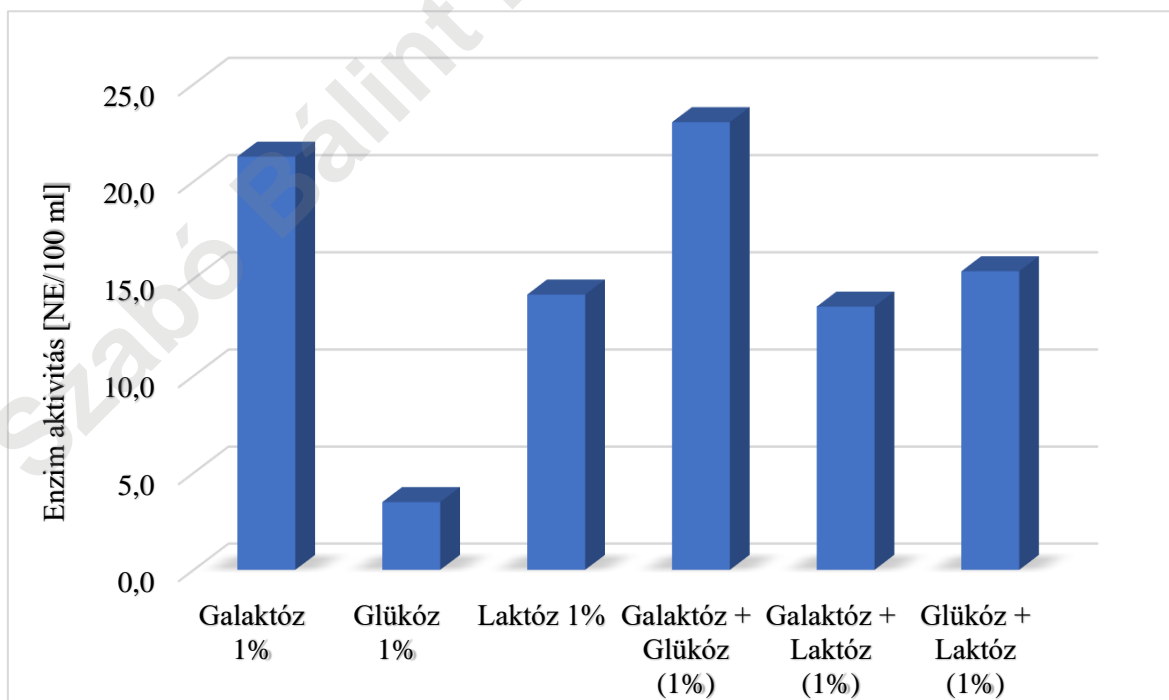
A kontroll, szerves nitrogén forrást tartalmazó mintához képest (27,64 NE/100 ml), 60%-ot meghaladó csökkenést mutatott a legjobb eredményt elérő ammónium-klorid tartalmú tápleves (10,66 NE/100 ml). Az enzimaktivitás sorrendje szerint a következő helyet elfoglaló ammónium-nitrát (4,52NE/100 ml) ismételten 50%-os csökkenést hozott. A *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs a többi szerves nitrogén forrás viszonylatában az ammónium-kloridot preferálta leginkább, legkevésbé pedig az ammónium-szulfátot. Gomaa (2018), valamint Vasudha és Gayathri (2023) által vizsgált tejsavbaktériumok esetén épp ellentétes hatás jellemző, ugyanis az ammónium-szulfát nemcsak a szerves nitrogén források, de az összes vizsgált nitrogén forrás közül a kedvezőbbnek bizonyult az egyik *Lactiplantibacillus* törzs  $\beta$ -galaktozidázok szintézisére. A Gomaa (2018) által megfogalmazott gondolat, miszerint „a különböző törzsek más tápanyagokat követelnek meg genetikájukból adódóan” esetében is beigazolódott.

### **Szénforrás hatásának vizsgálata az enzim aktivitásra**

3 különböző összetételű szénforrás  $\beta$ -galaktozidázra gyakorolt hatásának vizsgálatára szeparáltan egy-egy szénforrás mentes MRS tápközeget egészítettem ki 1-1%-nyi galaktózzal, glükózzal és laktózzal. A 24 órás fermentáció alatt 0,5%-0,5% galaktóz-glükóz, galaktóz-laktóz és glükóz-laktóz kombinációkat is megfigyeltem, amelyet a 12. ábra is szemléltet. Az ideális beállítások alapján 2% laktóz tartalmú inokulum tápközeget készítettem, melyet laktózos tápközegben fenntartott tenyészetből oltottam be.

Az egyedüli szénforrások eredményeire rátekintve láthatjuk, hogy a legmagasabb aktivitás 1% galaktóz (21,27 NE/100 ml) jelenlétében detektálható, ezt követi a laktóz (14,18 NE/100 ml) és végül a glükóz (3,49 NE/100 ml). A korábban feltételezett glükóz katabolit repressziós hatása szintén érvényesül, a galaktózhoz képest az aktivitásban több mint 80%-os eltérés jelenik meg. A mért  $\beta$ -galaktozidáz aktivitások több kísérleti eredménnyel is szemben állnak, melyek legjobb inductorként a laktózt említik (Hsu és társai, 2005; Gomaa, 2018; Carević és társai, 2017; Sriphannam és társai, 2012). A galaktózhoz képest a laktóz is több mint 30%-kal kisebb értéket mutat. Kim és Rajagopal (2000) *Lactobacillus crispatus* törzsnél vizsgálta a különböző szénforrások egyéni és egymásra gyakorolt hatását, mellyel eredményeim és az általam alkalmazott módszerek is magas szintű egyezést mutatnak. Amennyiben galaktóz tartalmú MRS tápközeget alkalmaztak, magas enzimaktivitások mutatkoztak. Az aktivitási eredmények növekvő tendenciát követtek, ha a tápközeg glükóz mellett laktózt vagy galaktózt is tartalmazott, ekkor a galaktóz jelenléte hatékonyabban növelte a szintézist, mint a laktózé. Amennyiben az inokulum tápközeg laktózt tartalmazott, a glükózt tartalmazó

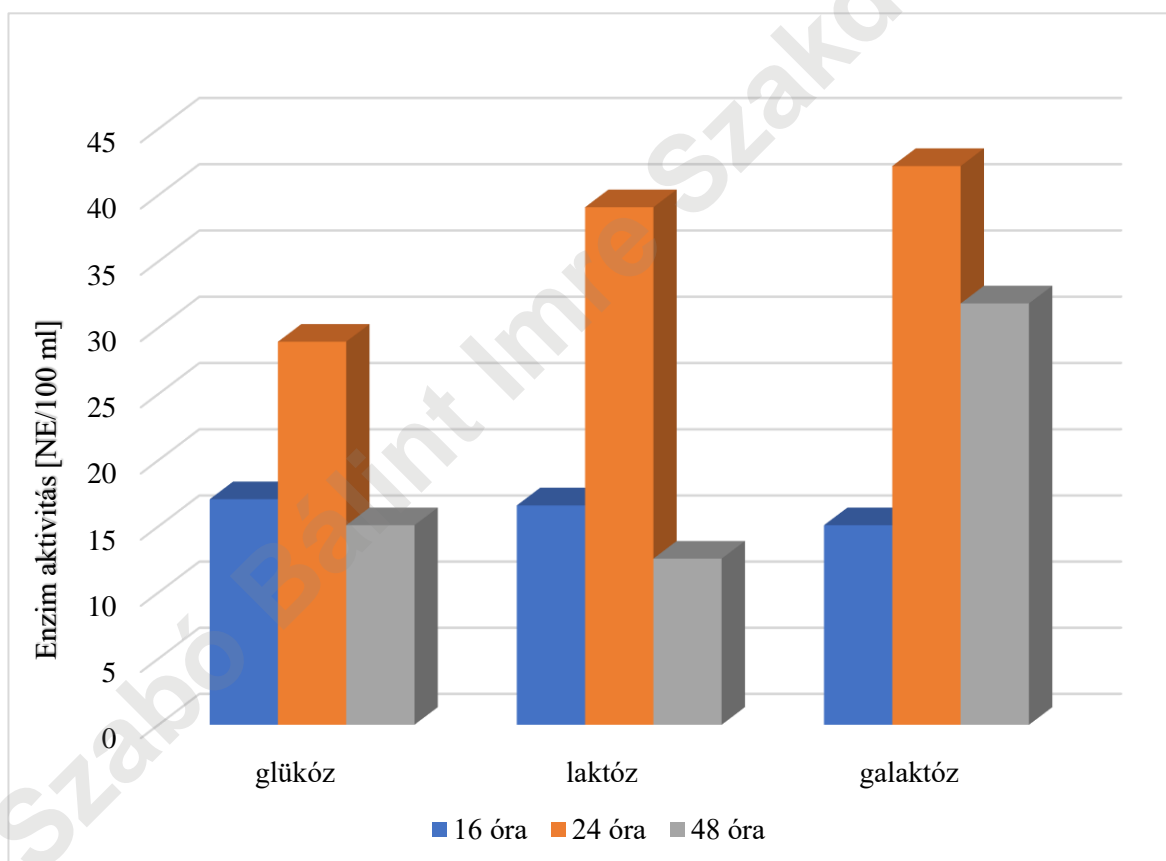
fermentációs tápközegekbe való átvitelével, a glükóz represszálta az aktivitást, a galaktóz pedig növelte. Az általuk feltételezett laktóz inhibíciós hatás, eredményeimnél nem állapítható meg egyértelműen. Liu és társai (2011) génklónozással és szekvenanciaanalízissel vizsgálták a *Lactobacillus fermentum* K4 törzset, melyben megállapították, hogy a törzs által termelt  $\beta$ -galaktozidáz a GH2 család tagjaira hasonlít. A családot operonszerkezetük szerint a lacLM típusba sorolják, mely az *E.coli*-ban megtalálható és az évek során jól jellemzett lacZ típustól eltér. A sav/bázis és nukleofil aminosavak terén viszont feltűnően nagy azonosságot mutattak. Zhensang és társai (2022) a lacLM szerkezetét figyelte meg a *Lactiplantibacillus plantarum* törzsben és a gén kiütése után a baktérium növekedési képtelenségét mutatott laktózos tápközegekben, ebből látszik a laktóz hidrolízisében betöltött fő szerepe. Továbbá megfigyelték a laktóz hasznosításban részt vevő egyéb gén architektúrákat, mint a laktóz transzport fehérjék, transzkripciós szabályzó fehérjék és cukortranszport fehérjék, majd kijelentették, hogy sorrendjük a különböző törzseknél ellentmondásos. A vizsgált törzs azonban az operonon kívül, tartalmazott laktóz jelenlétében felszabályozott transzkripciós szinttel rendelkező galaktózt hasznosító lókusztokat. Véleményem szerint a *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs esetében elképzelhető, hogy a galaktóz hasznosulásért felelős gének a lac operon közelében helyezkednek el és transzkripció szabályozásában töltenek be fontos szerepet. Összeségében elmondható, hogy a szénforrások kiegészítésével, a glükóz kivételével az enzim megfelelő aktivitást mutatott.



11. ábra A különböző szénforrást tartalmazó fermentációs tápközegek hatása a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásra

#### 5.4. A különböző szénforrást tartalmazó inokulum tápközegek hatása az enzim aktivitásra

Az enzimek különböző környezeti feltételek mellett eltérő aktivitást mutathatnak, ezért vizsgáltam a különböző szénforrás tartalmú inokulum tápközegek hatását az optimált 1% koncentrációjú, galaktózt és glükózt 1:1 arányban tartalmazó MRS fermentációs tápközegben megvalósuló enzimtermelésre. A törzsek felszaporítása 2% glükóz, galaktóz és laktóz tartalmú MRS tápközegekben történt. Mindemellett a fermentációs idő hatását is vizsgáltam az enzimtermelésre. A szakirodalmi források alapján az enzimtermelés optimális ideje nagy szórást mutat, előfordul 16-24 órás, de ennél hosszabb, akár 72 órás inkubációs idő is (Gomaa, 2018; Hsu és társai, 2005; Liu és társai, 2011). Kutatómunkám során 2 napon keresztül tartó fermentációt terveztem, mely során a 16., 24. és 48. órában is mintát vettem, melynek eredményei a 13. ábrán láthatók.



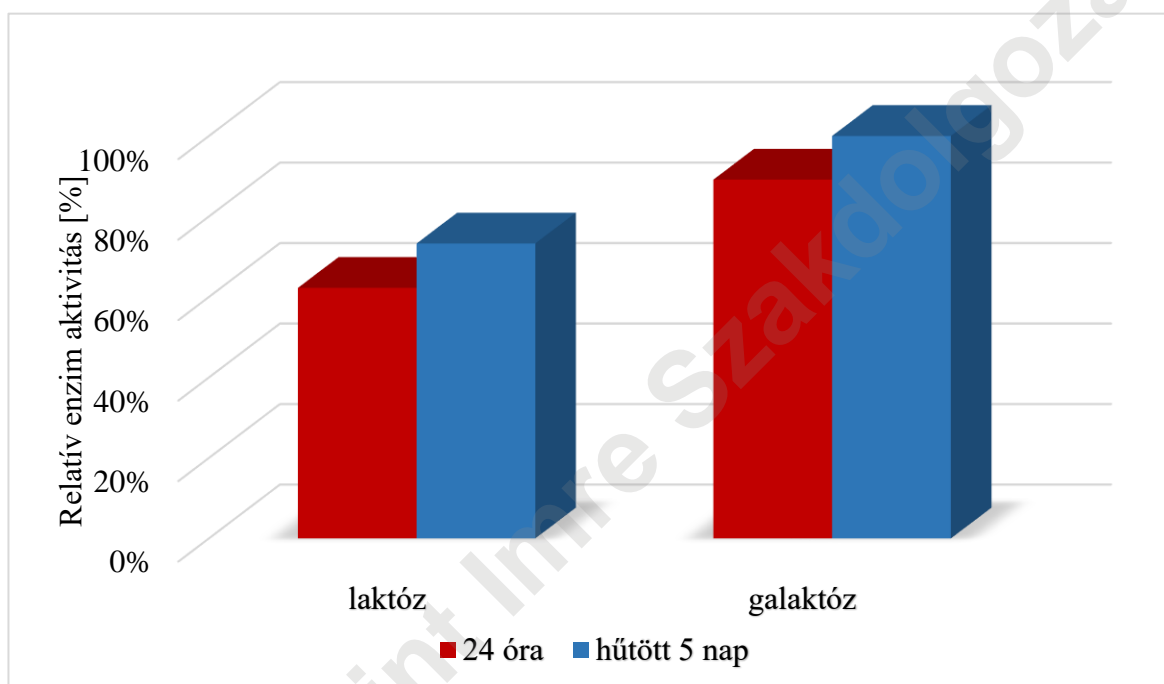
12. ábra Különböző szénforrás tartalmú inokulum tápközeg hatása a *L. fermentum* LF08 törzs  $\beta$ -galaktozidáz aktivitására

A legjobb aktivitási eredményeket 24 óra után mértem a galaktózt tartalmazó (42,19 NE/100 ml) inokulummal indított fermentáció esetén, de az egyéni maximum glükóz (28,94 NE/100 ml) és laktóz (39,09 NE/100 ml) esetén is ebben az időpontban mutatkozott. Havas (2014) a legtöbb esetben szintén 22-24 óra elteltével mért maximális  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás értéket

az általa vizsgált tejsavbaktériumoknál. Tóth (2019) 16 órás maximumánál magasabb, azonban Nagy (2019) 48 órát meghaladó extracelluláris enzim termelés optimumánál kisebb ideális tenyésztési időt tapasztaltam, annak ellenére, hogy a törzs ugyanaz volt, amely jól tükrözi a különböző környezeti körülmények által előidézett optimum változásokat. 48 óra elérésekor a laktóz tartalmú inokulummal indított fermentáció során az enzim szintézise drasztikusan csökkent, a 24 órás értékhez képest 75%-os csökkenést tapasztaltam. A fermentáció 16. órájában míg a glükóz és a laktóz tartalmú inokulumok esetén hasonló enzimaktivitást mértem, az érték a 24. órára jelentősen megnövekedett az utóbbi közeg esetén. 24 óra elteltével, a fermentáció előrehaladtával a tápanyag utánpótlás kimerülhetett, amely az enzim szintézisére is negatívan hatott. A *L. crispatus* növekedése Kim és Rajagopal (2000) eredményei alapján 16 óra után a glükózozos tápközegen elérte a stacioner fázist, más szénforrások esetén, mint a laktóz és a maltóz, ez több időt vett igénybe. A glükóz tartalmú tápközegben felszaporított inokulum tenyészet esetén, miután galaktóz és glükóz tartalmú fermentációs tápközegre került nem volt megfigyelhető erős represszív hatás. A laktóz és galaktóz tartalmú tápközegen termelt enzim aktivitása között a különbség a 24 óra elérésekor csupán 7,3%. Hosszabb fermentáció esetén, viszont érdekesebb galaktóz tartalmú tápközéget alkalmazni, mivel az enzim aktivitása még 48 óra után is magasnak bizonyult. A *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs eredetű  $\beta$ -galaktozidáz termelése esetén egy rövidebb, 24 órás fermentáció a legkedvezőbb, amely ipari felhasználás szempontjából is előnyös, hisz rövidebb idő alatt több enzim szintetizálható és forgalmazható. A kísérletsorozatból megállapítható, hogy a vizsgált törzsnél a galaktóz induktora a  $\beta$ -galaktozidáz szintézisének.

### 5.5. A $\beta$ -galaktozidáz enzim stabilitásának vizsgálata

Ahhoz, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz enzim a hatásmechanizmusának megfelelően működjön, nagy stabilitással kell rendelkeznie. A sejtfeltárással nyert intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz enzim stabilitását 4°C-on való tárolás során vizsgáltam. A kísérlethez a laktóz és a galaktóz tartalmú inokulummal indított 1%-ban galaktózt és glükózt tartalmazó fermentációs tápközegekben 24 óra alatt termelt  $\beta$ -galaktozidáz enzimet használtam. Az aktivitás mérést követően a maradék sejtlizátumot, 5 napra hűtött körülmények közé helyeztem, s az idő leteltével ismét megmértem az enzim aktivitását.



13. ábra  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás változása hűtött körülmények között

A 14. ábra szemlélteti az 5 nap leteltével is meglévő enzim aktivitásokat, mely alapján látható, hogy az enzim stabil maradt, aktivitása nem csökkent. A *Lactobacillus fermentum* LF8 törzs által termelt  $\beta$ -galaktozidáz a K4-es törzs eredetű enzimnél stabilabbnak bizonyult. Liu és társai (2011) vizsgálatai szerint a *L. fermentum* K4 törzs  $\beta$ -galaktozidáz enzime pH 8 mellett 4°C-on 3 napig maradt stabil, az enzim 55°C-os inkubáció után 20 percen belül inaktívvá vált.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Lactobacillus* nemzetség probiotikus tulajdonságú tagjai és az általuk előállított  $\beta$ -galaktozidáz enzim egyaránt széleskörű felhasználási lehetőségekkel rendelkezik. Alkalmazzák a fermentációs iparban, fermentált ételek és italok előállítására, részt vesz a tejcukor hidrolízisében, növelve a laktózérzékenyek számára fogyasztható termékek számát. Ezenkívül prebiotikus galakto-oligoszacharidok előállítása is megvalósítható alkalmazásukkal. Kutatómunkám során a probiotikus *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs  $\beta$ -galaktozidáz enzimét vizsgáltam. A fermentáció paramétereinek, különös tekintettel a tápközeg szén és nitrogén forrásának optimalizálásával a célom az enzim termelésének fokozása volt. A törzsek tápanyag igénye eltérő, a törzsspecifikus tápigényekről a laboratóriumban végzett fermentációval információkat szerezhetünk.

A szerves nitrogén források specifikus hatását nitrogén forrás mentes 4% laktóz tartalmú MRS tápközegekben vizsgáltam, melyhez külön adtam hozzá a proteóz-peptont, a húskivonatot és az élesztőkivonatot a tápközeg leírásának megfelelő mennyiségben. A tápközeg fermentáció utáni kémhatása a sejtek életképességét tükrözi a termelt szerves savak mennyiségén keresztül. A mért savas pH a sejtek megfelelő növekedését bizonyította. Az enzim aktivitásokban kezdetben nem értem el kimagasló értékeket, de megállapítottam, hogy az élesztőkivonatot 50°C-on a legmagasabb aktivitási értéket hozta. A hőmérsékleti optimumot illetően a proteóz-peptont és a húskivonatot 40°C kedvezőbb hatást gyakorolt a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitására. Tóth (2019) iránymutató, eredményeivel együtt elmondható, hogy a *Lactobacillus fermentum* LF08  $\beta$ -galaktozidáz termelése magasabb hőmérsékleten több esetben is jobb.

Az enzimaktivitás fokozása érdekében, optimalizáltam az inokulum tápközegét. Amennyiben a törzsfenntartás során a glükózt tartalmazó tápközeg szintén egy glükóz tartalmú tápközegbe oltottam, alacsony aktivitást mértem, a kontroll mintához képest. A glükóz tartalmú tápközeg aktivitása 9,1 NE/100 ml, míg a kontroll mintáé 23,04 NE/100 ml. A gátló hatás a több mint 50% aktivitás csökkenésben mutatkozik meg. Laktózos tápközegbe való átvitel esetén, a represszív hatás nem jelent meg, mivel a kontroll minta és a 2% laktózos MRS tápközeg között 2%-os eltérés volt, az aktivitás 22,50 NE/100 ml. A következő kísérletben az inokulum számára törzsszuspenzióként az inokulum optimalizálásánál készített 2%-os laktózos MRS-ben fenntartott sejteket alkalmaztam, amely aktivitási értéke 27,64 NE/100 ml, amely az előző kontrollnál 15%-kal magasabb volt.

A 2% koncentrációban alkalmazott szerves nitrogén forrás enzimtermelésre való hatásának vizsgálatát 4% laktózos MRS táplevesben végeztem. Az aktivitások alakulása



csökkenési sorrendben ammónium-klorid 10,66 NE/100 ml, ammónium-nitrát 4,51 NE/100 ml, ammónium-szulfát 1,90 NE/100 ml. A legjobb teljesítményt az ammónium-klorid biztosította, de még ez is több mint 60%-os teljesítmény csökkenést jelent a kontrollhoz képest. A nitrogén források kapcsán elmondható, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz termeléséhez a szerves nitrogén források közül az élesztőkivonat, a szerves nitrogén források esetén az ammónium-klorid javasolható.

A szénforrás egyéni vizsgálata során kimagaslott a galaktóz tartalmú MRS tápvesben mért  $\beta$ -galaktozidáz 21,27 NE/100 ml-es aktivitása, a legkedvezőtlenebb körülményeket az 1% glükózt tartalmazó MRS tápközegben tapasztaltam, 3,49 NE/100 ml-es értékével, közöttük a laktóz 14,18 NE/100 ml aktivitása található. A glükóz gátló hatása csökkent, ha a tápközeg tartalmazott laktózt vagy galaktózt. A galaktóz a laktóz jelenlétében, az egyéni értékükhöz képest csökkentette az enzim aktivitás mértékét. A galaktóz a glükózra, viszont kedvező indukáló hatást fejtett ki, elérve a legjobb teljesítményt az együttesen alkalmazott szénforrások tekintetében is, amely 23,04 NE/100 ml. Az 1%-os 1:1 arányú-galaktóz és glükóz tartalmú fermentációs tápközegnél vizsgáltam, hogy különböző szénforrást tartalmazó inokulum befolyásolja-e az ideális körülményeket, szükség van-e hosszabb fermentációs időre.

A  $\beta$ -galaktozidáz továbbra is 24 órás fermentáció után érte el a szénforrások egyéni vizsgálatánál a maximális értékeket. A glükóz gyors felhasználása a tápközeg kimerülésében játszhat szerepet, melyet a fellépő aktivitás csökkenés mutat. A hosszabb fermentációknál a laktóz és a galaktóz lassabb felhasználása kedvezőbb lehet. A galaktóz tartalmú inokulum 24 óra után érte el a legmagasabb értéket (42,19 NE/100 ml) és 48 óra elteltével sem csökkent drasztikusan. Galaktóz és laktóz tartalmú tápközegknél végeztem, az enzim eltarthatóságát is megvizsgáltam. Az enzim mind két szénforrás mellett képes volt megőrizni aktivitását 5 nap hűtött körülmények között is.

Összegezve a *Lactobacillus fermentum* törzsek kedvező  $\beta$ -galaktozidáz termelése elérhető 2% laktózos MRS tápközegben felszaporított inokulum tenyészet készítésével, melyet 1% galaktózt és glükózt 1:1 arányban tartalmazó fermentációs MRS tápközegben inkubálunk. A törzsek galaktóz és laktóz hasznosítása, alkalmassá teszi őket tejipari alkalmazásra, mivel ezeknek a szénhidrátoknak édessége és vízoldhatósága is kedvezőtlenebb a glükózénál. Kedvező fermentációs idejük, és magas szintű életképességük a termékbe építhetőség szempontjából is hasznosnak bizonyulnak. Véleményem szerint sikerült informatív és hasznos eredményeket kinyernem a kísérleteim során, melyek jó alapot biztosítanak az esetleges nagyobb mennyiségű ipari termelés megtervezéséhez.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

- Alazzeh, A.Y., Ibrahim, S.A., Song, D., Shahbazi, A., AbuGhazaleh, A.A.,** 2009. Carbohydrate and protein sources influence the induction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases in *Lactobacillus reuteri*. *Food Chem* 117, 654–659. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.04.065>
- Bezkorovainy, A.,** 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 73, 399s–405s. <https://doi.org/10.1093/AJCN/73.2.399S>
- Carevic, M., Vukasinovic-Sekulic, M., Grbavcic, S., Stojanovic, M., Mihailovic, M., Dimitrijevic, A., Bezbradica, D.,** 2015. Optimization of  $\beta$ -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hem Ind* 69, 305–312. <https://doi.org/10.2298/HEMIND140303044C>
- Charalampopoulos, D., Rastall, R.A.,** 2012. Prebiotics in foods. *Curr Opin Biotechnol* 23, 187–191. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2011.12.028>
- Daba, G.M., Elnahas, M.O., Elkhateeb, W.A.,** 2021. Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *Int J Biol Macromol* 173, 79–89. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.01.110>
- Dahiya, D., Nigam, P.S.,** 2022. The Gut Microbiota Influenced by the Intake of Probiotics and Functional Foods with Prebiotics Can Sustain Wellness and Alleviate Certain Ailments like Gut-Inflammation and Colon-Cancer. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 665 10, 665. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10030665>
- Das, T.K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K.C., Ghosh, K.,** 2022. Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research* 2, 100185. <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100185>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S.J., Berenjian, A., Ghasemi, Y.,** 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* 8(3), 92; <https://doi.org/10.3390/FOODS8030092>
- Juhász M.,** 2005. Laktóz intolerancia. *HIPPOCRATES* VII/5.
- Duan, F., Sun, T., Zhang, J., Wang, K., Wen, Y., Lu, L.,** 2022. Recent innovations in immobilization of  $\beta$ -galactosidases for industrial and therapeutic applications. *Biotechnol Adv* 61, 108053. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.108053>
- El-Sayed, A., Aleya, L., Kamel, M.,** 2021. Microbiota's role in health and diseases. *Environ Sci Pollut Res Int* 28, 36967-36983. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-14593-Z>
- Fernández, M., Hudson, J.A., Korpela, R., De Los Reyes-Gavilán, C.G.,** 2015. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. *Biomed Res Int* Article ID 412714, 13 pages <https://doi.org/10.1155/2015/412714>

- Gallo, R.L., Hooper, L. V.**, 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology* 12:7 12, 503–516. <https://doi.org/10.1038/nri3228>
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., Gramenzi, A.**, 2016. Probiotics History. *J Clin Gastroenterol* 50, S116–S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Gibson, Y., Roberfroid, M.B.**, 1994. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125(6), 1401-1412.
- Gomaa, E.Z.**, 2018.  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus reuteri*: Optimization, characterization and formation of galactooligosaccharides. *Indian J Biotechnol* 17, 407–415.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L.**, 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition* 93, 783-786 <https://doi.org/10.1079/BJN20051428>
- Havas P.**, 2014. Kereskedelmi forgalomban kapható probiotikus baktériumok galaktozidáz enzimének tanulmányozása, Budapest: Doktori értekezés
- Han, S., Lu, Y., Xie, J., Fei, Y., Zheng, G., Wang, Z., Liu, J., Lv, L., Ling, Z., Berglund, B., Yao, M., Li, L.**, 2021. Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 102. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.609722/BIBTEX>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E.**, 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hsu, C.A., Yu, R.C., Chou, C.C.**, 2005. Production of  $\beta$ -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *Int J Food Microbiol* 104, 197–206. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.02.010>
- Kim, C.S., Ji, E.S., Oh, D.K.**, 2004. A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 738–743. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.02.118>
- Kim, J.W., Rajagopal, S.N.**, 2000. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol (Praha)* 45, 29–34. <https://doi.org/10.1007/BF02817446/METRICS>
- Kwok, K.O., Fries, L.R., Silva-Zolezzi, I., Thakkar, S.K., Iroz, A., Blanchard, C.**, 2022. Effects of Probiotic Intervention on Markers of Inflammation and Health Outcomes in Women of Reproductive Age and Their Children. *Front Nutr* 9, 889040. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.889040>

- Lee, C.J., Sears, C.L., Maruthur, N.,** 2020. Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1461, 37–52. <https://doi.org/10.1111/NYAS.14107>
- Lee, P., Yacyshyn, B.R., Yacyshyn, M.B.,** 2019. Gut microbiota and obesity: An opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT). *Diabetes Obes Metab* 21, 479–490. <https://doi.org/10.1111/DOM.13561>
- Li, Y., Wu, Y., Wu, L., Qin, L., Liu, T.,** 2022. The effects of probiotic administration on patients with prediabetes: a meta-analysis and systematic review. *J Transl Med* 20, 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12967-022-03695-Y/TABLES/2>
- Liu, G.X., Kong, J., Lu, W.W., Kong, W.T., Tian, H., Tian, X.Y., Huo, G.C.,** 2011.  $\beta$ -Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4. *J Dairy Sci* 94, 5811–5820. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4479>
- Lu, L., Guo, L., Wang, K., Liu, Y., Xiao, M.,** 2020.  $\beta$ -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. *Biotechnol Adv* 39, 107465. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.107465>
- Metchnikoff, E.,** 1908. *The Prologation of Life.*
- Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., Savardashtaki, A.,** 2022.  $\beta$ -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. *Biotechnol Appl Biochem* 69, 612–628. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.107465>
- Nagy E.,** 2019. Probiotikus *Lactobacillus* törzsek extracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének vizsgálta, Budapest: Szakdolgozat
- Net, M.E.S.M., Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E.,** 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Park, A.R., Oh, D.K.,** 2010. Effects of galactose and glucose on the hydrolysis reaction of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1427–1435. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-2165-7/TABLES/3>
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y.,** 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 100, 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2006.02963.X>
- Pavithra, V., Thirumagal, J.,** 2018. PURIFICATION OF BETA GALACTOSIDASE ENZYME FROM DAIRY EFFLUENT BACILLUS SPECIES. Thirumagal et al. *World Journal of Pharmaceutical Research World Journal of Pharmaceutical Research SJIF Impact Factor* 7, 996–1012. <https://doi.org/10.20959/wjpr20187-11577>

- Rafique, N., Mamoon, T., Bashir, S., Hussain, I., Hayat, I., Rafique, N., Mamoon, T., Bashir, S., Hussain, I., Hayat, I., 2022. *Lactobacilli*: Application in Food Industry. *Lactobacillus* - A Multifunctional Genus [Working Title].** <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.106856>
- Sánchez, B., González-Tejedo, C., Ruas-Madiedo, P., Urdaci, M.C., Margolles, A., 2011. *Lactobacillus plantarum* extracellular chitin-binding protein and its role in the interaction between chitin, caco-2 cells, and mucin. *Appl Environ Microbiol* 77, 1123–1126.** [https://doi.org/10.1128/AEM.02080-10/SUPPL\\_FILE/SUPPLEMENTARY\\_FILE\\_AEM\\_3.DOC](https://doi.org/10.1128/AEM.02080-10/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_FILE_AEM_3.DOC)
- Sarkar, A., Harty, S., Lehto, S.M., Moeller, A.H., Dinan, T.G., Dunbar, R.I.M., Cryan, J.F., Burnet, P.W.J., 2018. The Microbiome in Psychology and Cognitive Neuroscience. *Trends Cogn Sci* 22, 611–636.** <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2018.04.006>
- Schrezenmeir, J., De Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73, 361s–364s.** <https://doi.org/10.1093/AJCN/73.2.361S>
- Scott, K.P., Tuohy, K.M., Mach -Istituto, F.E., San, A., All’adige, M., Gibson, G.R., Rastall, R.A., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington, R., 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 7, 1–19.** <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>
- Sedzro, D.M., Bellah, S., Akbar, H., Billah, S.S., 2018. Structure, Function, Application and Modification Strategy of  $\beta$  –Galactosidase. *Journal of Multidisciplinary Research and Reviews* 1, 10–16.**
- Tannock, G.W., 2004. A Special Fondness for *Lactobacilli*. *Appl Environ Microbiol* 70, 3189–3194.** <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004>
- Tóth B., 2019. Tápközeg optimalás probiotikus *Lactobacillus* törzsek intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz termelésére, Budapest: Szakdolgozat**
- Vasudha, M., Gayathri, D., 2023. Kinetic and modeling analyses of lactosehydrolyzing  $\beta$ galactosidase from *Lactiplantibacillus plantarum* GV54. *World Acad Sci J* 5, 11.** <https://doi.org/10.3892/wasj.2023.188>
- Vera, C., Guerrero, C., Aburto, C., Cordova, A., Illanes, A., 2020. Conventional and non-conventional applications of  $\beta$ -galactosidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1868, 140271.** <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2019.140271>
- Walter, J., 2008. Ecological Role of *Lactobacilli* in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl Environ Microbiol* 74, 4985.** <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>

- Wattana Sriphannam**, 2012. Medium component improvement for  $\beta$ -galactosidase production by a probiotic strain *Lactobacillus fermentum* CM33. Afr J Biotechnol 11. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3771>
- WHO, FAO**, 2001-2002. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO FOOD AND NUTRITION PAPER.
- Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., Philippart de Foy, J.M., Dequenne, I., de Timary, P., Cani, P.D.**, 2019. How Probiotics Affect the Microbiota. Front Cell Infect Microbiol 9, 454. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00454>
- Xu, Z., Li, C., Ye, Y., Wang, T., Zhang, S., Liu, X.**, 2022. The  $\beta$ -galactosidase LacLM plays the major role in lactose utilization of *Lactiplantibacillus plantarum*. LWT 153, 112481. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112481>
- Xu, Z., Zhang, S., Wang, T.**, 2022. Lactose Metabolism by *Lactiplantibacillus plantarum*, in: Updates on Fermentation [Working Title]. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109134>
- 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., 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*. Int J Syst Evol Microbiol 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107>

Internet I: Deák T., Kiskó G., Maráz A., Mohácsiné Farkas Cs. (2006): Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Internet II: [https://www.mun.ca/biology/scarr/bio4241\\_chapter13.htm](https://www.mun.ca/biology/scarr/bio4241_chapter13.htm)

Internet III: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123785947000160>

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Bujna Erika egyetemi docensnek, hogy idejét nem kímélve nyújtott segítséget a dolgozat megírásában és kiváló iránymutatásával terelte gondolataim a megfelelő irányba. Hálás vagyok az építő kritikákért is, melyekből sokat tanulhattam és a laboratóriumi munkám során nyújtott segítségért, amely lehetővé tette a gördülékeny munkavégzést.

Köszönöm Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi tanárnak, a Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette a kísérletek elvégzését a tanszéken.

Szabó Bálint Imre Szakdolgozat



## NYILATKOZAT

### a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Szabó Bálint Imre  
A Hallgató Neptun kódja: C5TNVU  
A dolgozat címe: Probiotikus *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz enzim termelésének optimalása  
A megjelenés éve: 2023  
A konzulens tanszék neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

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

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, 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 tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

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

Kelt: Budapest, 2023. május 3.

  
Hallgató aláírása



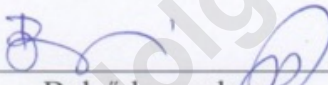
## KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Szabó Bálint Imre (Neptun azonosítója: C5TNVU) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2023. május 3.

  
Belső konzulens

Szabó Bálint Imre Szakdolgozat