

DIPLOMADOLGOZAT

Csányi Boglárka

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

**Élelmiszermérnök mesterképzési szak, Élelmiszeripari
folyamattervezés**

**KÜLÖNBÖZŐ SEJTFELTÁRÁSI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA
LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM LF08 INTRACELLULÁRIS B-
GALAKTOZIDÁZ ENZIM KINYERÉSÉNEK OPTIMÁLÁSÁRA**

Belső konzulens:

Dr. Bujna Erika
egyetemi docens

Kristijan Hristovski
PhD hallgató

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:**

Biomérnök és Erjedésipari
Technológia Tanszék

Készítette:

Csányi Boglárka

**Budapest
2024**

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések.....	3
2.	Szakirodalmi áttekintés.....	5
2.1.	Tejsavbaktériumok.....	5
2.2.	Tejsavbaktériumok szénhidrát anyagcseréje.....	6
2.3.	<i>Lactobacillus</i> nemzetség.....	7
2.3.1.	<i>Lactobacillus</i> nemzetség sejtfal felépítése	8
2.3.2.	<i>Lactobacillus</i> fajok alkalmazási területei	10
2.3.3.	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	10
2.4.	β -galaktozidáz enzim	11
2.4.1.	Előfordulás	12
2.4.2.	Szerkezete.....	13
2.4.3.	Hatásmechanizmusa	14
2.4.4.	Enzimműködést befolyásoló paraméterek.....	15
2.5.	Sejtfeltárás	16
2.5.1.	Mechanikus sejtfeltárási módszerek.....	17
2.5.2.	Nem mechanikus sejtfeltárási módszerek.....	18
3.	Alkalmazott anyagok és módszerek	21
3.1.	Alkalmazott törzs.....	21
3.2.	Alkalmazott tápközeg	21
3.2.1.	MRS 2% laktózzal.....	21
3.2.2.	MRS tápközeg 4% laktózzal.....	21
3.3.	Alkalmazott oldatok, reagensek.....	22
3.4.	<i>Lactobacillus</i> törzs fenntartása	23
3.5.	<i>Lactobacillus</i> nemzetség enzimfermentációja.....	23
3.6.	Sejtfeltárás	23

3.6.1.	French Press.....	23
3.6.2.	Kémiai eljárás	24
3.6.3.	Lizozim enzim	24
3.7.	β -galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározása	24
3.8.	Központi elrendezésű kísérlettervezés.....	26
3.9.	Felhasznált berendezések és eszközök.....	27
4.	Eredmények és értékelésük	29
4.1.	Enzimfermentáció	29
4.2.	Mechanikai sejtfeltárás eredménye.....	30
4.3.	Kémiai sejtfeltárás eredményei.....	31
4.4.	Enzimes feltárás	33
4.5.	Kémiai és enzimes sejtfeltárás kombinálása.....	34
4.5.1.	Koncentráció és inkubációs idő hatása.....	36
5.	Következtetések és javaslatok	41
6.	Összefoglalás	42
7.	Irodalmi hivatkozás	45
8.	Ábrák jegyzéke	54
9.	Táblázatok jegyzéke	56

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi 30 évben jelentősen megnőtt a mikrobiális enzimek biotechnológiai felhasználása, így ennek a folyamatosan növekvő iparágnak a szükségleteit kell kielégíteni gyorsan növekvő, egyszerű genetikai állományú, illetve alacsony proteáz aktivitással rendelkező mikroorganizmusokkal (Geciova, Bury & Jelen, 2002; Bury, Jelen & Kalab, 2001).

A tejsavbaktériumok (Lactic Acid Bacteria, LAB) „Generally Regarded As Safe” (GRAS) és „Qualified Presumption Of Safety” (QPS) státusszal rendelkeznek, ami azt jelenti, hogy a belőlük izolált enzimeket - bonyolult tisztítási lépések nélkül - biztonságosan fel lehet használni az élelmiszeriparban (Wright, 2005; Sharma & Singh, 2014).

A *Lactobacillus* nemzetség által termelt β -galaktozidáz enzimet széles körben alkalmazzák az élelmiszeripar több területén, amelyek közül kiemelendő a tejiparban betöltött szerepe (Chandel & Sharma, 2020). A baktériumokból származó galaktozidázokat gyakran alkalmazzák a laktóz bontására, mivel a fermentáció egyszerű, az enzim aktivitása magas és stabilan működik (Sharma & Singh, 2014).

Megfelelő körülmények között a tejben lévő tejcukor (laktóz) glükózzá és galaktózzá hidrolizálódik az enzim hatására, ami a laktóz tartalmú termékek technológiai és érzékszervi tulajdonságainak javítására ad lehetőséget. A tejcukor lebontása után az adott tejtermékek emészthetőbbé válnak a laktóz intoleránsok számára anélkül, hogy az intolerancia tünetei megjelenjenek. Laktóz felszívódási problémával rendelkezők jelenleg a világ népességének körülbelül 70%-át teszik ki, Magyarországon a lakosság 30%-a szenved ebben a betegségben, ezért elengedhetetlen a laktóz lebontását végző β -galaktozidáz vizsgálata (Malik & Panuganti, 2018; Czeizel, Czeizel & Flatz, 1983). A tejcukron kívül a szerkezetileg rokon galaktozidok hidrolízisét, valamint transzgalaktozidáz aktivitása révén galakto-oligoszacharidok (GOS) szintézisét is katalizálja a β -galaktozidáz (Bhalla TC, 2015).

A legtöbb baktérium nem képes a célfehérjék kiválasztására, azok a sejten belül, intracellulárisan halmozódnak fel, ami megnehezíti a termék kinyerését és tisztítását, ezzel rontja a kifizetést és az egész technológia gazdaságosságát. Ezenkívül az intracelluláris fehérjék izolálására az iparban nagy mennyiségű vegyi anyagot használnak fel, ami hulladékként nagy mértékben terheli a környezetet (Pécs, 2012).

A bakteriális eredetű β -galaktozidáz enzimnek is jelentős alkalmazási korlátja, hogy intracellulárisan termelődik. Gazdaságos előállítás érdekében elengedhetetlen a megfelelő sejtfeltérési módszer kiválasztása és annak optimalizálása úgy, hogy a feltérzés során bekövetkező enzimaktivitás csökkenését minimalizáljuk (Anisha, 2017). Laboratóriumi és ipari

léptékű sejtfeltáró módszerek tömegét dolgozták ki az utóbbi években és használják őket mai napig. Több új sejtfeltáró készüléket (szonikátor, homogenizátor), kémiai reagenst, detergenset fejlesztettek ki és vittek világpiacon különböző nagyvállalatok. E terület iránt folyamatos érdeklődés mutatkozik nemcsak a tudományos, de a gazdasági életben is. A sejtfeltárás globális piacát 2016-ban 2,35 milliárd dollárra becsülték és az elkövetkezendő évekre még nagyobb ütemű értéknövekedést jósoltak (Islam, Aryasomayajula & Selvaganapathy, 2017).

A *Lactobacillus*ok és az általuk termelt β -galaktozidáz enzim széles körű alkalmazási lehetőségei indokoltá teszik a baktérium sejtek feltárási módszereinek vizsgálatát az enzim kinyerése végett.

A diplomamunkám során célul tűztem ki a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 baktérium optimális sejtfeltárási módszerének kidolgozását, amely nagy β -galaktozidáz enzim aktivitást eredményez. Az ideális sejtfeltárási módszer megtalálása összetett, hiszen az intracelluláris enzimnek mindvégig ellenállónak kell lennie a roncsolás során használt mechanikai erőkkel és kémiai vegyületekkel szemben. A kísérleti munkám során célt volt az enzim eltávolítása a sejtfalról a roncsolást követően, úgy, hogy az enzimaktivitás csökkenést mindvégig optimálisan alacsony szinten tartsam. A megfelelő sejtfeltárási módszer optimalizálásához az alábbi részfeladatok megvalósítását tűztem ki célul:

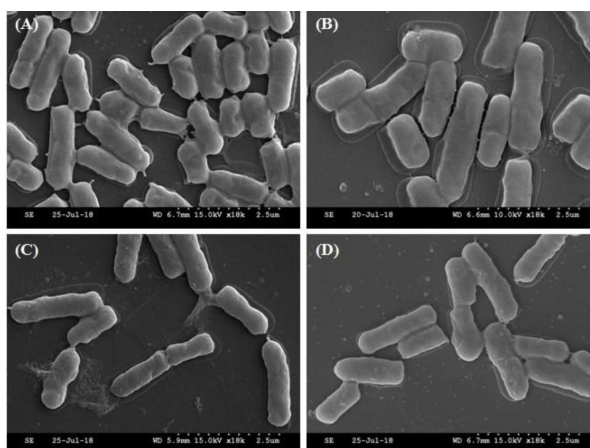
- Nagy mennyiségű sejtömeg előállítás a β -galaktozidáz enzim kinyeréséhez.
- Különböző sejtfeltárási műveletek összehasonlítása:
 - French Press nagynyomású homogenizátor
 - Kémiai kezelés CTAB detergenssel
 - Lizozim enzimes sejtfeltárás
 - Kombinált kémiai és enzimes kezelés
- Egyszerű, de megbízható, jól reprodukálható sejtfeltárási módszer kidolgozása a lehető legnagyobb enzimaktivitással.

Az utóbb említett folyamatok mindegyikét megfelelően kell optimalizálni, hogy a kinyert enzimet eredményesen lehessen felhasználni későbbi tisztítási műveletekhez, illetve ipari alkalmazásokhoz.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Tejsavbaktériumok

Tejsavbaktériumok alatt olyan baktériumcsoportokat értünk, amelyek közös élettani és anyagcsere tulajdonságokkal rendelkeznek. Az ebbe a csoportba tartozó savtűrő, spórát nem képző mikroorganizmusok általánosságban véve pálcza vagy gömb (kokkusok) alakú Gram-pozitív baktériumok (Holzapfel et al., 2001). Az 1. ábra bemutatja néhány tejsavbaktérium pásztázó elektronmikroszkópos képét, ahol jól látható az egyes 1-1,5 µm nagyságú sejtek pálcika, illetve elnyújtott alakja (Kang et al., 2019).



1. ábra: **Különböző tejsavbaktériumokról pásztázó elektronmikroszkóppal készült képek** (Kang et al., 2019). (A) *Lacticaseibacillus plantarum* MG4221; (B) *Limosilactobacillus fermentum* MG4231; (C) *Limosilactobacillus fermentum* MG4261; (D) *Lactiplantibacillus plantarum* MG4270

Ezeknek a baktériumoknak vastag peptidoglikán rétegük van a sejtfalukban, ami képes megkötni a Gram-féle festési eljárás során a kristályibolya jód-komplexét. Alkoholos mosás után is ezek a baktériumok kék vagy lila színt mutatnak, innen kapták a Gram-pozitív elnevezést. Anyagcseréjük tekintve heterotrófok, tehát a kémiai energia megtermeléséhez szerves anyagokat (szénhidrátokat, magasabb rendű alkoholokat) alakítanak át. Elsődleges anyagcsereútjuk a homo- vagy heterofermentatív tejsavas erjedés, fő végtermékként pedig tejsavat termelnek. Areotoleráns anaerobokként az oxigén jelenléte sem gátolja őket a növekedésben, szaporodásban, de teljes citromsav körrel nem rendelkeznek (Holzapfel et al., 2001).

Hőmérséklet igényük szerint megkülönböztetünk mezofil és termofil tejsavbaktériumokat. A mezofil tejsavbaktériumok szaporodási optimuma 25 – 30 °C közötti, míg a termofileké 37-42 °C között van (Deák, 2006).

A tejsavbaktériumok széleskörű felhasználhatóságának lehetőséget ad az a tulajdonságuk, hogy bizonyos törzsei GRAS és QPS státuszokkal egyaránt rendelkeznek, tehát mind az Amerikai Egyesült Államokban, mind az Európai Unióban elismerik biztonságos élelmiszeripari alkalmazásukat (Wright, 2005).

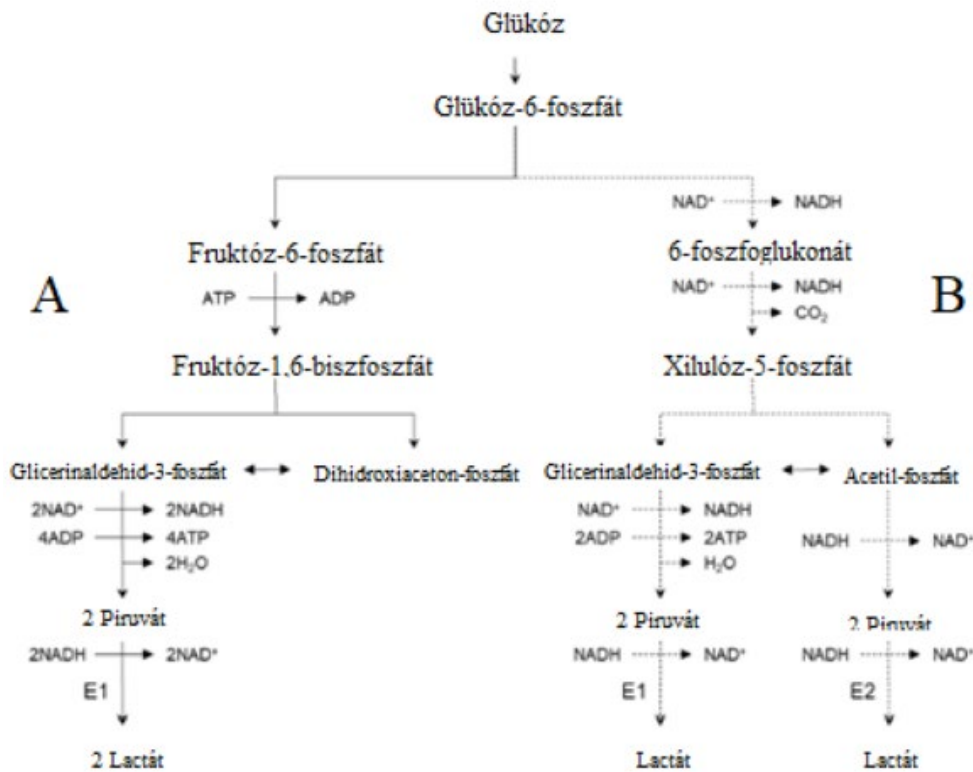
2.2. Tejsavbaktériumok szénhidrát anyagcseréje

A tejsavbaktériumok szénhidrát metabolizmusuk során makromolekulákat, emészthetetlen poliszacharidokat, kellemetlen ízt okozó anyagokat bontanak le tejsavas erjesztéssel és eközben különféle metabolitokat termelnek a tejsav mellett, mint például zsírsavakat, aminokat, vitaminokat, jellegzetes ízt kialakítva az élelmiszerekben. Az említett metabolikus jellemzők lehetővé teszik a tejsavbaktériumok széles körű felhasználását a fermentációs iparban és az élelmiszeripar különböző területein (Wang et al., 2021).

A homofermentatív tejsavbaktériumok a glükóz lebontását glikolízis útján végzik, amelyet jól szemléltet a 2. ábra. E folyamat során 1 mol glükóz molekulából 2 mol piruvát jön létre, miközben 2 mol ATP szintetizálódik. A piruvátból 2 mol NADH oxidációja mellett egyetlen végtermékként tejsav keletkezik, miközben az intracelluláris redox egyensúly is helyreáll. A glükóz a sejtek belsejébe speciális permeáz fehérjék segítségével jut be, ahol glükóz-kináz enzim foszforillálja ATP ADP-vé való átalakulása közben. Az egyéb hat szénatomos monoszacharidok ebbe az útvonalba a glükóz-6-foszfát és fruktóz-6-foszfát pontokon léphetnek be. A homofermentatív törzsek nagy része képes a pentózok metabolizmusára a pentóz-foszfát anyagcsereúton keresztül, mely folyamat fő végterméke szintén a tejsav (Gänzle, 2015; Kenneth, 2020).

Heterofermentatív útvonal esetén a glükóz (és a pentózok) lebontása a pentóz-foszfát (PP) útvonalon zajlik le (2.ábra). Ebben az esetben a glükóz-6-foszfát dekarboxileződés és dehidrogénezés hatására pentóz-5-foszfáttá alakul és szén-dioxid szabadul fel. Az így kialakult pentóz-5-foszfátot a foszfoketoláz enzim hasítja, a hasítás terméke a glicerinaldehid-foszfát mellett a két szénatomból álló acetyl-foszfát. A glicerinaldehid-foszfát piruváton keresztül tejsavvá alakul, azonban az acetyl-foszfátból acetyl-koenzim-A és acetaldehid intermediereken keresztül etanol keletkezik. A folyamat fő végtermékei: tejsav, etanol, acetát és szén-dioxid (NAD⁺/NADH arány függvényében) (Gänzle, 2015; Kenneth, 2020).

A *Lactobacillus* fajok többsége homofermentatív, de például a *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus viridescens* fajok heterofermentatív anyagcserét folytatnak (Deák, 2006).



2. ábra: **Tejsavbaktériumok anyagcsere útvonalai** (Kim et al., 2022). **A:** homofermentatív útvonal; **B:** heterofermentatív útvonal. P: foszfát; ADP: adenozin 5'-difoszfát; ATP: adenozin 5'-trifoszfát; NAD⁺: nikotinamid adenin dinukleotid (oxidált forma); NADH: nikotinamid adenin dinukleotid (redukált forma); E1: laktát-dehidrogenáz; E2: alkohol-dehidrogenáz

2.3. *Lactobacillus* nemzetség

A nemzetség több tagja, mint például a *Lacticaseibacillus casei* és a *Lactobacillus paracasei*, megtalálható a humán szervezetben, ahol részt vesznek a normál mikroflóra fenttartásában (Marco et al., 2017). A szájüregben 10³-10⁴ TKE/g, a csípőbélben 10³-10⁷ TKE/g, míg a vastagbélben 10⁴-10⁸ TKE/g mennyiségben találhatóak meg (Borriello et al., 2003).

Bizonyos tagjai zöldségekből, silózott takarmányokból vagy akár az állati emésztőrendszerből is izolálhatóak (Rossi et al, 2019). Az 1. táblázat az élelmiszeriparban gyakran használt *Lactobacillus* fajok előfordulási helyét és fő technológiai alkalmazását mutatja be.

1. táblázat: **Különböző *Lactobacillus* fajok előfordulása és élelmiszeripari felhasználása**

(Rossi et al., 2019)

<i>Lactobacillus</i> fajok	Előfordulása	Fő technológiai alkalmazás
<i>L. acidophilus</i>	Tejtermékek	Probiotikum
<i>L. brevis</i>	Fermentált zöldségek	Kovász fermentáció
<i>L. buchneri</i>	Emésztőtraktus	Szilázs fermentáció
<i>L. casei</i>	Tejtermékek, emésztőtraktus	Sajtgyártás
<i>L. helveticus</i>	Tejtermékek	Fermentált tej és sajtgyártás
<i>L. reuteri</i>	Bőr és nyálkahártya	Probiotikum
<i>L. rhamnosus</i>	Tejtermékek, emésztőtraktus	Probiotikum

A szénhidrátok erjesztése során (homo- és heterofermentatív anyagcsere) elsődleges termékként tejsavat termelnek és alacsony pH optimumuk miatt kifejezetten szeretik az enyhén savas környezetet (Rossi et al., 2019). Növekedésükhöz szükséges pH érték 3,0-8,0 közötti, míg az optimális hőmérséklet 30-40 °C közötti tartományban található. Az értékek jelentősen különbözhetnek nemzetség, faj és törzs szinten is (Salveti et al., 2012).

2.3.1. *Lactobacillus* nemzetség sejtfal felépítése

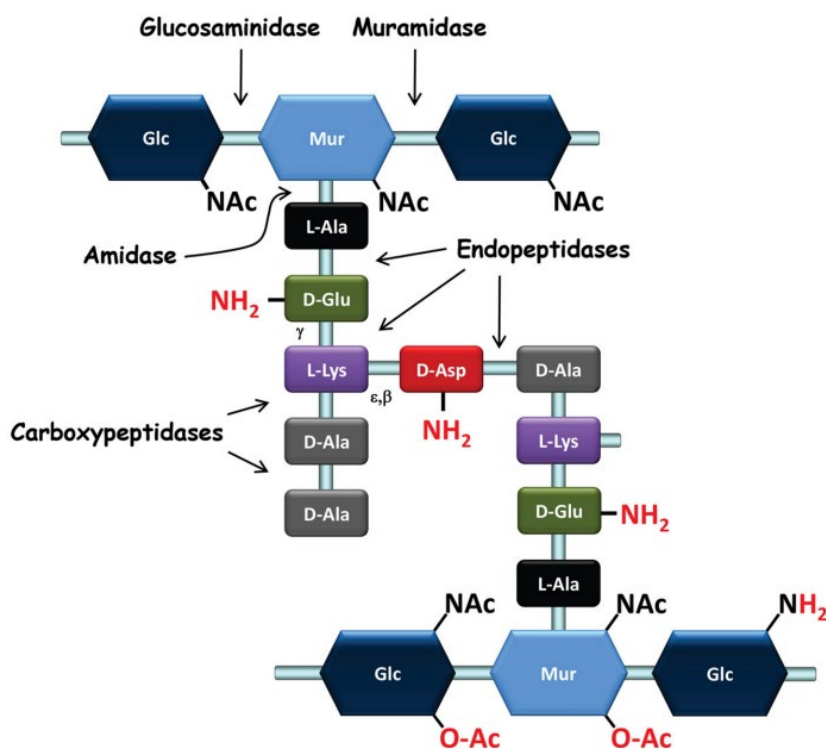
A sejtfal egyik legfontosabb funkciója, hogy védi a baktériumsejtet a környezet mechanikai, fizikai és kémiai hatásaival szemben, ugyanakkor határfelületként kapcsolatot teremt a külvilág és a sejt között. Fontos biológiai szerepe, hogy fenntartja a baktériumsejt integritását, alakját, ellenáll a belső turgornyomásnak, ugyanakkor képes biztosítani a sejtfal rugalmasságát az osztódási és növekedési folyamatok során (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014).

A sejtfal összetétele és szerkezete jelentősen függ különböző genetikai és környezeti tényezőktől, így azok törzsenként, fajonként is nagy változatosságot mutathatnak. Fő szerkezeti tulajdonságai azonban egyes mikroorganizmus-csoportokon belül hasonlóak mondhatóak (Pécs, 2012).

A baktériumsejtek ellenállóképessége a sejtfeltárási technikákkal szemben főként a sejtfalat alkotó peptidoglikántól függ. A Gram-pozitív baktériumok közé tartozó *Lactobacillus*-ok 10-80 nm vastagságú sejtfala komplex makromolekulákból épül fel, mint például a peptidoglikán (PG). Ez a térhálós szerkezetű cukor amin két fő típusú molekulából áll: hosszú glikán (cukor) láncokból és az ezekhez kapcsolódó peptid (aminosav) láncokból. A glikán láncok N-acetilglükózaminból (GlcNAc) és N-acetilmurámsavból (MurNAc) épülnek fel, amelyek β -1,4-

glikozidos kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. A PG felépítését a 3. ábra mutatja be. A peptidoglikán, más néven murein, a Gram-pozitívoknál a sejtfa szárazanyagának 40-90%-át teszi ki, míg a Gram-negatívoknál 5-20%-át. Ez a poliszacharid a citoplazma membránt veszi körül és hozzá különböző proteinek, savas poliszacharidok kapcsolódnak (teichoinsav és lipoteichoinsav) (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014).

A glikánhoz kapcsolódó peptid oldalláncok aminosavsorrendje baktériumcsoportonként változhat, tejsavbaktériumok esetén az aminosavsorrend: L-Ala- γ -D-Glu-X-D-Ala. A harmadik aminosav (X) általában egy diaminosav a *Lactobacillus*-ok esetén, ami többségében L-lizinnek (*Lactobacillus lactis*) vagy L-ornitinnek (*Limosilactobacillus fermentum*) felel meg. Transzpeptidáz típusú enzim köti össze az egyik peptid lánc harmadik pozíciójában lévő diaminosav aminos csoportját a másik szomszédos lánc negyedik pozíciójában lévő D-alaninjával (4-3 keresztkötés), kialakítva a különböző keresztkötésekkel a térhálós szerkezetet (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014).



3. ábra: *L. lactis* peptidoglikánjának sematikus felépítése (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014). A peptidoglikán szerkezetének lehetséges módosításai, mint az O-acetilezés (O-Ac), N-deacetilezés, amidálás (NH₂), piros színnel jelölve. A különböző PG hidrolázok hasítási helyeit a nyilak jelölik

2.3.2. *Lactobacillus* fajok alkalmazási területei

Az emberiség több ezer évvel ezelőtt már hasznosította a *Lactobacillus* nemzetség tagjait élelmiszerek mikrobiológiai romlásának megakadályozásához, előnyös beltartalmi értékek eléréséhez. Felhasználásukkal mesterséges tartósítószerrel nélkül, kíméletes módon lehet előállítani fermentált termékeket, illetve a megfelelő fermentációs technika alkalmazásával jellegzetes szín- és aroma anyagokat kialakítani (aminok, zsírsavak).

A tejsavbaktériumok számos makromolekula (emésztetetlen poliszacharidok, proteinek) degradációjában részt vesznek, amivel javítják az adott élelmiszer minőségét, tápértékét és fokozzák annak biztonságát. A *Lactobacillus* baktériumok a fermentációs folyamatok során nagy mennyiségben képesek hidrolitikus enzimeket előállítani (amilázt, dehidrogenázt, dekarboxilázt, β -galaktozidázt), ezért széles körben felhasználják az élelmiszeriparban tejtermékek (joghurt, sajt) és sok más erjesztett-savanyított élelmiszer (savanyú káposzta, kovászos uborka) készítéséhez (Lu et al., 2022). Számos olyan enzimet állítanak elő, amelyek a baktérium növekedéséhez szükséges fehérjéket hidrolizálják, könnyebben emészthető aminosavakká. A fehérjék lebontása megszüntetheti az élelmiszerekben található fehérjeallergéneket, például a tejtermékekben előforduló kazein hidrolízisével csökkenthető az allergén hatás, továbbá a keletkező aminosavak könnyebben felszívódnak az emberi bélrendszerben (Wang et al., 2021). Néhány izolált tejsavbaktérium képes a búzában található albuminokat, globulinokat és gliadinokat hidrolizálni, aminek eredményeként fermentált gabona termékekhez lehet jutni (Lu et al., 2022).

Az emberi szervezetre is jótékony, egészségvédő hatással vannak, ugyanis bizonyított probiotikumként hozzájárulnak az egészséges bélflóra fenntartásához, segítik az emésztést és az immunrendszer megfelelő működését. Az imént felsoroltak is azt bizonyítják, hogy ezzel a nemzetséggel foglalkozó kutatások kiemelt jelentőséggel bírnak (Zalán, 2008; Székér, 2007).

2.3.3. *Limosilactobacillus fermentum*

A probiotikus tulajdonsággal rendelkező *Limosilactobacillus fermentum* törzset 2009-ben felvették az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóságnak (EFSA) a QPS listájára és 2013-ban GRAS minősítést is szerzett (Zhao et al., 2019). Probiotikus tulajdonsága és biztonságos felhasználhatósága lehetővé teszi, hogy széleskörűen alkalmazzák egészségügyi és gyógyszerészeti célokra, valamint az élelmiszeripar számos területén. Az emberi szervezetben a *Limosilactobacillus fermentum* képes gátolni a szájpenészt, bőrgombát és egyéb fertőzést okozó *Candida albicans* elszaporodását, ezen tulajdonságát kamatoztatják a gyógyszeriparban

különböző fertőzést megelőző gyógyszerek előállításával. A *Limosilactobacillus fermentum* hatékony lehet női húgyúti fertőzések ismétlődésének csökkentésében is (Bhavini & Sudeepa, 2020). Egyes tanulmányok szerint azonban továbbra is az egyik legkevésbé vizsgált probiotikum, pedig számos egészségre gyakorolt pozitív hatása miatt érdemes a *Limosilactobacillus fermentum* baktériumok vizsgálata (Zhao et al., 2019; Benov & Al-Ibraheem, 2002; Santiago-López et al., 2018). A nevében található „fermentum” pedig kiemeli az élelmiszeripar fermentációs technológiáiban betöltött kiemelkedő szerepét. Olyan élelmiszeripari termékek fermentációjában tölt be elengedhetetlen szerepet, mint a például a tej, savanyú rozskenyér, különböző kásák, valamint a hagyományos kovászos kultúrák (Bhavini & Sudeepa, 2020). Az egyik legkedveltebb koreai étel, a kimchi, is nagy mennyiségben tartalmaz *Limosilactobacillus fermentum*-ot (Kim et al., 2021).

Ezen baktériumok mérete törzsenként eltérő lehet, de általánosságban véve 0,5-0,9 x 3,0µm méretű mozgásra képtelen pálcák. Tenyésztési körülményei törzsenként szintén eltérőek lehetnek, de általában 41-42 °C-on és a növekedéséhez szükséges komponensekkel kiegészített MRS táptalajon gyorsan szaporodnak. A *Limosilactobacillus fermentum* törzseknél gyakran használt MRS tápközegben fő fehérjeforrásként peptont, pH szabályozásra nátrium-acetátot, illetve a baktérium számára esszenciális összetevőket (vitaminok, fehérjék, nukleinsavak) tartalmazó marha- és élesztőkivonatot alkalmaznak. Az imént felsoroltokon kívül még számos ionforrást (mangán, magnézium), illetve a baktériumok számára energiát és szénforrást biztosító glükózt tartalmazhat a fermentációs táptalaj (Bhavini & Sudeepa, 2020). A *Limosilactobacillus fermentum* törzs szénforrásként kiválóan képes alkalmazni még a laktózt és galaktózt is, így az MRS tápközeg gyakran ezen cukrok 1%-os mennyiségével is kiegészítik a glükóz mellett (Pakroo et al., 2022). Az utóbbi időben egyes tudományos cikkek beszámoltak arról, hogy a *Limosilactobacillus fermentum* növekedése során előnyben részesíti a karbamidot, a peptont és az élesztőkivonatot. Ennek alapján a tradicionálisnál 64%-kal magasabb baktériumhozamot értek el az alábbi tápközeg összetétellel: 30g/l kukorica szirup; 15g/l glükóz; 14,4g/l pepton, 7g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l karbamid, 3g/l nátrium-acetát, 4g/l nátrium citrát (Bhavini & Sudeepa, 2020).

2.4. β-galaktozidáz enzim

A β-galaktozidáz, (enzimszám: EC 3.2.1.23) más néven laktáz (hétköznapi név), a glikozid-hidrolázok enzimsaládjába tartozik. A laktáz enzim elnevezés valójában gyűjtőnév, a β-galaktozidázok egyik alosztályát értjük alatta. Ebbe a családba tartozó enzimek nagy része a

laktóz diszacharid lebontásáért felelősek, de különböző galakto-oligoszacharidok (GOS) képződését is katalizálhatják.

2.4.1. Előfordulás

Az enzim igen elterjedt a természetben, számos mikroorganizmusból (baktériumok, gombák, élesztők) és növényből izolálták már, illetve egyre elterjedtebbek a rekombináns fajtái a biotechnológiában (Saqib et al., 2017). Ipari enzimként gyakran hasznosítják az *Aspergillus*, *Kluyveromyces*, *Escherichia* és *Lactobacillus* különböző fajainak biokatalizátorait (Husain, 2010). Ezen fajok laktáz enzimjének tulajdonságait, optimális működési körülményeit mutatja be a 2. táblázat.

2. táblázat: **Különböző mikroorganizmus fajok enzimtermelési tulajdonságai, optimális körülményei** (Mlichova & Rosenberg, 2006)

Mikroorganizmus		Enzim termelés	pH optimum	T optimum [°C]
Penész	<i>Aspergillus niger</i>	extracelluláris	3,0-4,0	55-60
	<i>Aspergillus oryzae</i>		5,0	50-55
Élesztő	<i>Kluyveromyces lactis</i>	intracelluláris	6,5-7,0	30-35
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>		6,6	30-35
Baktérium	<i>Escherichia coli</i>	intracelluláris	7,2	40
	<i>Lactobacillus thermophilus</i>		6,2	55

A gombák által termelt β -galaktozidáz 2,5-5,4 közötti savas pH-optimummal rendelkezik, ezért kiválóan alkalmas a tejsavóban lévő laktóz hidrolízisére. Hőstabil tulajdonságuk szintén kiemelkedő, viszont érzékenyek a galaktóz által okozott termék-inhibícióra (Husain, 2010). A gomba eredetű laktázt előszeretettel használják különböző fermentációs technológiáknál, mert extracellulárisan nagy mennyiségű, olcsó enzimet képesek termelni. Az extracelluláris enzimtermelés esetén a mikrobacejtet könnyebb a fermentálótól elválasztani, ami csökkenti a feldolgozási költségeit is. Hátrányuk, hogy baktériumoknál hosszabb fermentációs idővel rendelkeznek és tenyésztésük nehezebben reprodukálható. Alacsony pH optimum miatt tejben nem alkalmazható a fonalas gombák által termelt β -galaktozidáz (Pécs, 2012).

A bakteriális laktázt széles körűen alkalmazzák a fermentációs iparban (tejipar), ugyanis a baktériumok gyors szaporodásához elegendő egy gombákhoz képest egyszerűbb tápoldat is. A megfelelő tápközeg kiválasztásával jól reprodukálhatóak a tenyésztések, illetve az általuk

termelt laktáz is stabil, magas enzimaktivitást mutat semleges pH értékeknél (Pécs, 2012; Husain, 2010). Tejsavbaktériumok közül érdemes kiemelni a probiotikus hatással rendelkező *Lactobacillus* nemzetséget.

Az élesztők is intracellulárisan képesek termelni a β -galaktozidázt, amely pH 6,0–7,0 közötti környezetben képesek magas hidrolitikus aktivitásra (Husain, 2010). A *Kluyveromyces lactis*, mint az egyik legtöbbet tanulmányozott modellorganizmus, illetve a *Kluyveromyces marxianus* (más néven *Kluyveromyces fragilis*) laktázait érdemes kiemelni, amelyek 30–35°C között képesek a laktóz bontására. Manapság kiemelten alkalmazzák a *Kluyveromyces lactis* törzset az eredetileg borjúgyomorban található rennin előállítására is, de elsősorban a tejben lévő laktóz költséghatékony lebontására alkalmazható, közel semleges pH optimumuk miatt (Pécs, 2012).

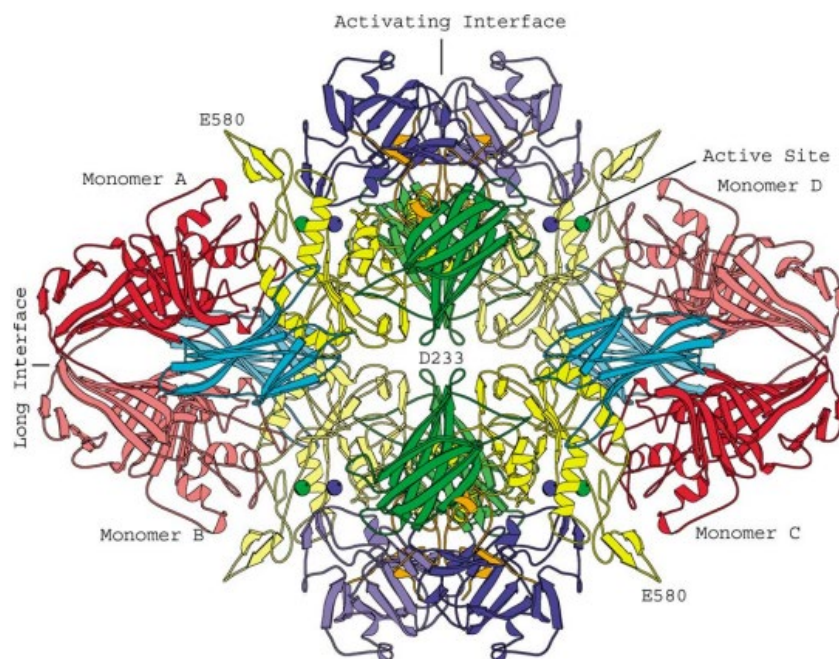
2.4.2. Szerkezete

A β -galaktozidáz enzimek funkcionalitásuk szempontjából a glikozid-hidrolázok (GH) GH-1, GH-2, GH-35 és GH-42. családjába tartoznak. Az *Escherichia coli*, *Bacillus megatherium* és *Sulfolobus solfataricus* a GH-2 csoportba tartoznak, ami az egyik leggyakrabban tanulmányozott glikozid-hidroláz család a magas hidrolitikus (elsősorban laktózzal szemben) enzimaktivitása miatt (Lee, 2008; Zhu et al., 2020). A GH2 család tagjai jellegzetesen szűk szubsztrátspecifitással rendelkeznek, csak laktózzal és β -1,3, valamint β -1,6 galaktozidokkal lépnek reakcióba (Cantarel et al., 2009).

A tejsavbaktériumok (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) bizonyos kutatási eredmények szerint a GH-42 és GH-2 csoportba sorolhatóak (Lee, 2008).

Az enzim négy polipeptid láncból áll, amelyek tetramer szerkezetet alakítanak ki. Minden egyes monomert 1023 aminosav és 5 domén alkot. A domének közül a harmadik, középső domén egy trióz-foszfát izomeráz "TIM barell". Ez a szerkezet 8 α -hélixből és ezzel párhuzamos 8 β -redőből áll. Az enzim aktív helye a domén C-terminális vége felé helyezkedik el. Az enzim működéséhez szükségesek Na^+ vagy K^+ és Mg^{2+} ionok, így azok kötőhelyei is megtalálhatóak szerkezetén (Matthews, 2005).

Az *Escherichia coli* eredetű β -galaktozidáz enzim térbeli szerkezetét mutatja a 4. ábra.



4. ábra: *Escherichia coli* eredetű β -galaktozidáz térbeli szerkezete (Matthews, 2005)

Domén 1: kék; Domén 2: zöld; Domén 3: sárga; Domén 4: világoskék; Domén 5: piros;

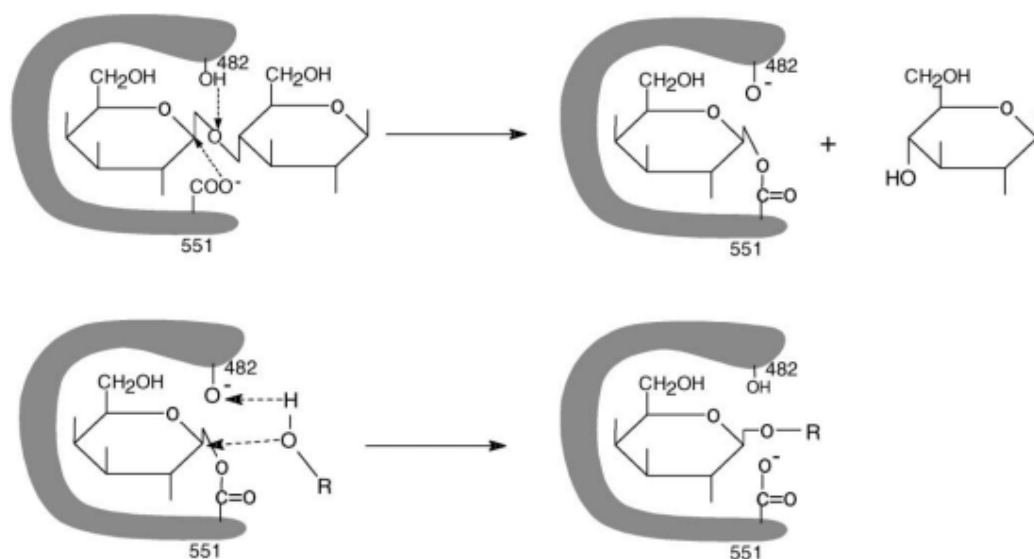
Na^+ : zöld gömb; Mg^{2+} : kék gömb; Kiegészítő peptidek: narancssárga

Az enzim tulajdonságai jelentős eltérést mutatnak különböző mikroorganizmus forrás szerint. Ezek a tulajdonságok kiterjednek az enzim szerkezetére, molekulatömegére, aminosav lánchosszára, az aktív hely pozíciójára, valamint a pH és hőmérséklet optimumára is (Zhou & Chen, 2001).

2.4.3. Hatásmechanizmusa

A béta-galaktozidáz leggyakoribb szubsztrátja a laktóz, amelyben egy galaktóz- és egy glükózmolekula kapcsolódik egymáshoz 1'-4' glikozidos kötéssel. A laktóz hidrolízisének mechanizmusát először Wallenfel írta le, amely szerint az enzim cisztin és hisztidin molekulái protondonorként és nukleofil helyként viselkednek az enzimatis hidrolízis során. A különböző mikrobiális eredetű béta-galaktozidázoknak katalitikus része a glutaminsav (Glu482 és Glu551), amelyek proton donorként és nukleofil/bázisként vannak jelen a reakció során (Zhou & Chen, 2001).

Első lépés az enzim-galaktozil komplex forma kialakulása, és az ezzel egyidejű glükóz-felszabadulás. Második lépésben egy hidroxil csoportot tartalmazó akceptor transzferálódik az enzim-galaktozil komplexre. Az akceptor (R-OH) pl. víz, hidrolízis során felszabadítja a galaktózt (Zhou & Chen, 2001). Az enzimatis hidrolízis folyamatát mutatja be az 5. ábra.



5. ábra: **Laktóz hidrolízise β -galaktozidáz enzim által** (Zhou & Chen, 2001).

Első lépés: kialakul az enzim-galaktozil komplex, oxigénatom kapcsolódik a 482-es aminosavhoz. Második lépés: a szubsztrát szétválk egy kisebb szénhidrát-molekulára és egy akceptor molekulára (R jelöléssel)

2.4.4. Enzimműködést befolyásoló paraméterek

A β -galaktozidáz működését több tényező is befolyásolja, amelyek összetett módon hatnak együtt, meghatározva a béta-galaktozidáz aktivitását és hatékonyságát különböző körülmények között. Ilyen befolyásoló tényező a pH, a hőmérséklet, a szubsztrát koncentráció, illetve különböző inhibitorok, aktivátorok, ionok jelenléte is hatással lehet az enzimes folyamatok működésére (Anisha, 2017).

A β -galaktozidáz működésének optimális pH-ja nagy változatosságot mutat mind nemzetség, mind faj és törzs szinten is. Megkülönböztetünk savas és semleges pH-jú β -galaktozidázokat, amelyek közül az utóbbi általában bakteriális eredetű, illetve származhat élesztőkből is. A savas pH-n mutatott magas β -galaktozidáz enzimaktivitás a gombákra jellemző tulajdonság (Carević et al., 2015).

Hung és Lee (2002) a mikrobiális eredetű béta-galaktozidáz enzim optimális pH értékét 3,0 – 7,2 között határozta meg. A *Limosilactobacillus fermentum* és más *Lactobacillus* törzs esetén 6,5 pH értéknél mérték a legnagyobb enzimaktivitásokat több tudományos kutatás során (Liu et al., 2011; Khusniati et al., 2015; Nguyen et al., 2012). Ettől az értéktől eltér a *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sakei* Lb790 törzsek béta-galaktozidázának pH optimuma, viszont itt is a semlegeshez közeli tartományban mérték a magasabb enzimaktivitásokat (Ruiz-Ramírez & Jiménez-Flores, 2023; Nguyen et al., 2012; Iqbal et al., 2011).

Lactobacillus delbrueckii, *Limosilactobacillus reuteri* esetén a β -galaktozidáz enzim pH 7,0 értéknél mutatott maximális aktivitást, míg pH 5,0 és 6,0 értéknél jelentős csökkenés következett be (Gomaa, 2018).

A β -galaktozidáz eredetétől függően hasonlóan nagy változatosságot mutat az enzim működésének optimális hőmérséklete. Bizonyos termofil *Lactobacillus* törzsek béta-galaktozidáz enzime 55-60 °C között mutatja a legnagyobb aktivitást, míg Gomaa (2018) a *Lactobacillus delbrueckii* és *Limosilactobacillus reuteri* törzseknél nagy mértékű enzimaktivitás csökkenést tapasztalt 50 °C felett (Gomaa, 2018; Premi et al., 1972). Összeségében elmondható, hogy az eukarióta eredetű béta-galaktozidáz enzimeknek 30-65 °C közötti tartományban található a hőmérséklet optimumuk (Havas, 2014).

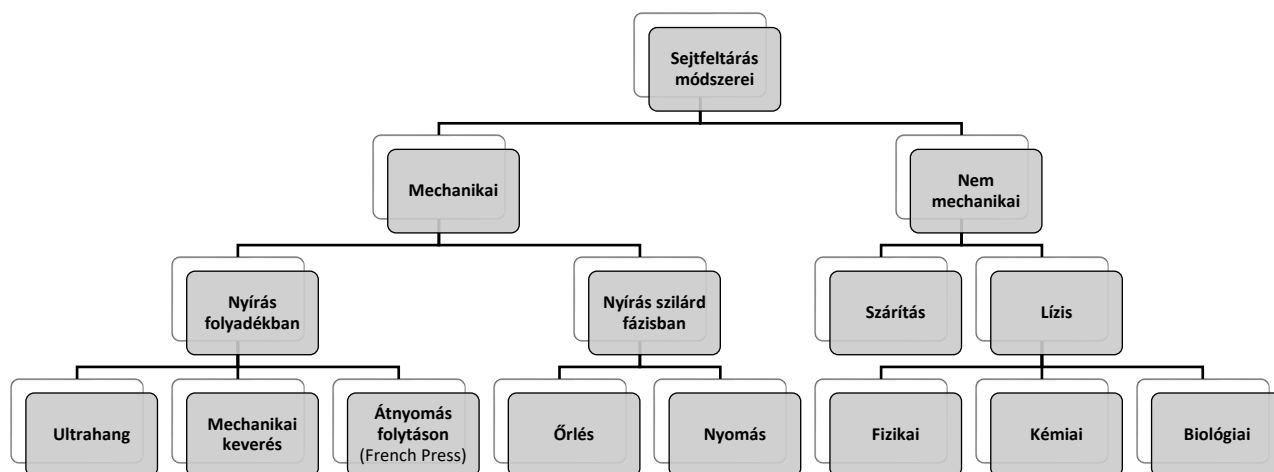
A béta-galaktozidázok aktivitása szintén függ bizonyos ionok jelenlététől, amelyek gátolhatják vagy elősegíthetik az enzim működését. Liu és munkatársai (2021) vizsgálták különböző kationok és reagensek hatását a *Limosilactobacillus fermentum* K4 β -galaktozidáz enzim működésére. A kutatások során azt tapasztalták, hogy a vas (II), mangán és cink ionok gátolták az enzim működését, míg a réz és a vas (III) kationok deaktiválták az enzimet. A nátrium, magnézium és kálium ionok kofaktorként növelték az enzimaktivitást. Iqbal és munkatársai (2010) szintén hasonló eredményekről számoltak be.

2.5. Sejtfeltárás

A mikroorganizmusok, különösen a baktériumok sejtstruktúrájának és sejtfeltárásának kutatása fontos szerepet játszik a biotechnológiai és biokémiai kutatásokban, valamint az ipari felhasználásokban. A sejtfeltárás alapvető célja a sejten belüli értékes biomolekulák, például fehérjék, nukleinsavak és más biológiai hatóanyagok kinyerése. Az optimális sejtfeltérési módszer kiválasztása során több faktort is figyelembe kell venni, mint például a termék sejten belüli helyzete, denaturációs érzékenysége, illetve a folyamat során a termék visszanyerésének mértéke, minősége (Üstök, 2007). A sejtfeltérás során kulcsfontosságú tényezőnek számít a sejtet környezeti hatásoktól védő sejtfal összetétele és szerkezete (Choonia et al, 2013).

Az intracelluláris enzimek - β -galaktozidáz - vizsgálatára is általában csak a sejtfeltérési eljárás után nyílik lehetőség, amelynél fő kihívást jelent a sejtfal roncsolása. A bakteriális sejtfal lízisét jelentősen befolyásolja a baktérium fajtája, ezért általános módszerleírások helyett különböző beállítású mechanikai, fizikai, kémiai és biológiai (enzimatikus) módszer található a szakirodalomban (Kang et al., 2019; Üstün-Aytekin et al., 2016).

A sejtfeltárési módszerek közül megkülönböztetünk mechanikus és nem mechanikus műveleteket, amit a 6. ábra is mutat.



6. ábra: Sejtfeltárési módszerek csoportosítása (Pécs, 2012)

2.5.1. Mechanikus sejtfeltárési módszerek

A mechanikus sejtfeltárési módszerek tovább csoportosíthatóak annak alapján, hogy a nyírás szilárd vagy folyékony fázisban történik. Közülük érdemes kiemelni a *Lactobacillus* törzsek esetén gyakran alkalmazott ultrahangos technikákat és a nagynyomású homogenizátorokkal (French Press) végezett feltárásokat (Üstök, 2007; Havas, 2014).

A French Press az egyik leggyakrabban használt berendezés ipari léptékű mikrobiális sejtfeltárásra, azonban laboratóriumi közegben is nagy hatékonyságot mutat. Garro és kutatócsoportja (1973) nagynyomású homogenizátort használtak a *Limosilactobacillus fermentum* törzs sejteinek feltáráshoz. Az eljárás során a tápközegben lévő sejteket magas nyomáson kényszerítik át egy szűkítésen, amelynek hatására a sejt összepréselődik, majd kiáramláskor kitágul. A nyomásváltozás hatására a sejt roncsolódik. Hátránya, hogy a feltárás során jelentősen emelkedik a hőmérséklet, ami sok esetben az enzimek denaturációját okozhatja. Szintén problémát jelent ennél a módszernél, hogy egyszerre csak kis mennyiségű minta vizsgálható (Islam et al., 2017; Orban & Patterson, 2000).

Az ultrahangos kezelés is szintén gyakori laboratóriumi léptékű sejtfeltárás módszer, amelynek során a sejtek károsodását kavitációs hatások okozzák. A hőfejlődés miatt a szonikátorokat rendszeresen le kell állítani a túlmelegedés elkerülése érdekében, ami megszakítja a folyamatot

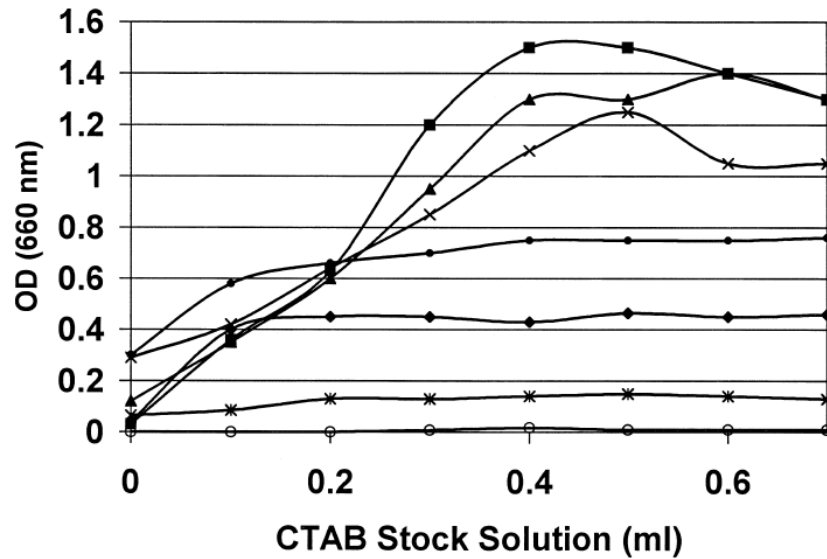
és csökkenti a hatékonyságot. További hátránya, hogy az ultrahangos rezgések hőt termelnek, ami károsíthatja az érzékeny enzimeket (Islam et al., 2017).

2.5.2. Nem mechanikus sejtfeltárási módszerek

A nem mechanikus módszerek között megkülönböztetünk líziseket (ozmotikus sokk, hősokk, kémiai reagensek, enzimek), valamint különböző szárítási műveleteket (Havas, 2014). A fizikai, kémiai és enzimikus módszerek sokkal kíméletesebbnek, specifikusabbnak tekinthetők az enzimek izolálásához a többi feltárási módhoz képest (Geciova et al., 2002).

Egyre gyakrabban alkalmazott kémiai sejtfeltárási módszer a sejtmembrán permeabilitásának növelése különböző detergensekkel, amellyel például a citoplazmában lévő enzimek válhatnak hozzáférhetővé a szubsztrátjuk számára (Geciova et al., 2002). Ennek a módszernek jelentős korlátot szab a bakteriális sejtfal gyenge áteresztőképessége enzimmolekulákkal szemben, azonban számos kutatásban beszámoltak különböző szerves oldószerek (toluol, kloroform, etanol) okozta permeabilitás növekedésről (Anisha, 2017; Geciova et al., 2002). Mahadevaiah és munkatársai (2020) a *Limosilactobacillus fermentum* törzs sejtjeit toluol, aceton-toluol és nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-kloroform kezelésnek vetették alá, amelyek közül a kloroformos feltárás következtében mérték a legnagyobb enzimaktivitást (Mahadevaiah et al., 2020). A toluollal végzett sejtfeltárások során nehézséget jelent, hogy a toluolt nehéz elválasztani a terméktől és toxicitási problémákat is okozhat (Havas, 2014).

Orban és Patterson (2000) kutatásaikkal bizonyították, hogy a cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB) kationos detergens sikeresen alkalmazható a bifidobaktériumok sejtfalának megbontására. Ezen kutatásuk célja volt egy módosított foszfoketoláz teszt létrehozása, amihez az optimális sejtfeltárási módszer megtalálása volt az első kulcsfontosságú lépés. Vizsgálataik során a sejteket foszfát pufferrel (pH = 6,5) mosták (15 perc, 10000 rpm, 4°C), majd 1 ml pufferbe visszaszuszpendálták őket. A baktérium sejtekhez 450 µg/ml CTAB oldatot adtak különböző mennyiségekben (0 ml; 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml; 0,7 ml), hogy megállapítsák a feltáráshoz szükséges detergens mennyiséget. Mérési eredményeik alapján a 0,4 ml hozzáadott CTAB mennyiség bizonyult a legmegfelelőbbnek, amelyet a 7. ábra is mutat.



7. ábra: *Bifidobacterium* törzsek optikai sűrűsége (OD) 450 µg/ml CTAB oldat koncentrációjának növelésével (Orban & Patterson, 2000). *B. bifidum* ◆, *B. adolescentis* 15704 ■, *B. breve* ▲, *B. adolescentis* 15703 ×, *B. infantis* *, *B. longum* ●, *Lactocaseibacillus casei* 4646 ○

Az ábra alapján a *B. adolescentis* 15704 törzs optikai sűrűsége 0,4 ml hozzáadott CTAB-nál mutatta a legnagyobb értéket, majd a detergens mennyiségének növelésével drasztikusan nőtt az OD értéke. A diagram szintén jól szemlélteti, hogy a sejtfeltáráshoz szükséges CTAB mennyisége jelentősen különbözhet akár egy nemzetségen belül is. A *B. adolescentis* 15703 és a *B. bifidum* sejtek megfelelő mértékű sejtfeltáráshoz 0,5 ml szükséges a 450 µg/ml koncentrációjú CTAB oldatból.

Az organikus oldószerek permeabilitásra gyakorolt hatékonysága jelentősen függ az inkubációs időtől, hőmérséklettől és az alkalmazott oldószerek koncentrációjától. Ezen paraméterek optimális megválasztása is elengedhetetlen a megfelelő sejtfeltárási módszer kidolgozásához (Anisha, 2017).

A biológiai sejtfeltáró módszerek közül az enzimes módszer is számos előnnyel rendelkezik, mint például a nagyfokú specifikussága, illetve az enzimes folyamatok, pH és hőmérséklet paramétereinek könnyebb szabályozhatósága (Üstök, 2007). Goulas és kutatócsoportja (2003) a kereskedelmileg is elérhető lizozim enzimet választották a *Limosilactobacillus reuteri* törzs sejteinek feltáráására, amivel hatékony eredményeket értek el. A peptidoglikán alapláncának glikozid-kötéseit bontó enzim általában 35°C-on és pH 6-7 között mutatja a legnagyobb aktivitást (Islam et al., 2017; Nettmann et al., 2008).

Több tanulmány is bizonyítja, hogy a lizozim enzimmel történő sejtfeltárás nagy mértékben függ a lizáló enzim koncentrációjától, az inkubáció időtől és a hőmérséklettől (Choonia et al., 2013; Islam et al., 2017).

A *Lactobacillus*-ok sejtfa - Gram-pozitív baktériumokra jellemzően - vastag peptidoglikán réteggel rendelkeznek, ezért az enzimátikus kezeléseket gyakran kombinálják kémiai módszerekkel (Liu et al., 2021). Erre jó példa, hogy Alimolaei és Golchin (2016) a *Lactocaseibacillus casei* sejtek lizozimes roncsolását etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) és Triton X-100 kémiai reagensek használatával egészítették ki. A Triton X-100 detergens segít felbontani a sejtfa lipidjeit és membránjait, lehetővé téve a lizozim számára, hogy könnyebben hozzáférjen a peptidoglikán réteghez, különösen Gram-pozitív baktériumok esetében. Az EDTA pedig egy hatékony kelátképző aminosav, amely képes megkötni a sejtfa szerkezetében található kationokat, mint például a kalcium (Ca^{2+}) és a magnézium (Mg^{2+}) ionokat (Alimolaei & Golchin, 2016). Enzimátikus és kémiai módszerek sikeres kombinálása fűződik Chen és munkatársai (2015) nevéhez. Tudományos cikkükben a párosujjú patások rendjébe tartozó jak bendőjének mikroorganizmusait vizsgálták. A mikrobák DNS-ének kivonási módszereit hasonlították össze, ahol eredményesnek bizonyult a 4% (w/v) CTAB és 0,3 mg/ml lizozimmal történő sejtfaeltárás. Több CTAB-val kiegészített sejtfaeltárás során magas termékkihozatalt sikerült elérniük, ami bizonyítja a vegyület sejtfaeltárásban betöltött kiemelkedő szerepét (Chen et al., 2015).

3. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott törzs

Limosilactobacillus fermentum LF08 baktérium izolátum (Probiotal S.p.A.).

3.2. Alkalmazott tápközeg

3.2.1. MRS 2% laktózzal

A baktérium sejtek felszaporításához 2% laktózt tartalmazó MRS tápközeget használtam. A tápközeg összetételét a 3. táblázat tartalmazza. A táptalajt az elkészítést követően 121 °C-on 15 percig sterilizáltam.

3. táblázat: 2% laktózt tartalmazó MRS tápközeg összetétele

Komponens	Mennyiség
Laktóz	20 g
Proteóz-pepton	10
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

3.2.2. MRS tápközeg 4% laktózzal

Az enzimfermentációhoz 4% laktózt tartalmazó MRS tápközeget használtam. A tápközeg összetételét a 4. táblázat tartalmazza. A táptalajt az elkészítést követően 121 °C-on 15 percig sterilizáltam.

4. táblázat: **4% laktózt tartalmazó MRS tápközeg összetétele**

Komponens	Mennyiség
Laktóz	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

3.3. Alkalmazott oldatok, reagensek

- **Sorensen puffer** (pH = 6,5)

KH_2PO_4 (9,0178 g/l) és $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (23.876g/l) oldatok megfelelő arányú összemérésével állítottam be a kívánt pH-t. 63,1 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ és 936,9 ml KH_2PO_4 oldatból készítettem el 1 liter 6,5 pH-jú Sorensen puffert.

- **Cetil-trimetil-ammónium-bromid oldat (CTAB)**

A lízishoz használt oldat elkészítése során 0,45 g szilárd CTAB-t oldottam fel egy liter desztillált vízben.

- **p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrátum (PNPG)**

A szubsztrátum előkészítéséhez 0,0225 g p-nitrofenil β -D-galaktopiranozidot használtam, amit 50 ml desztillált vízben oldottam fel. A szubsztrátumot 4°C-on hűtőben tároltam a további használatig.

- **Nátrium-karbonát (Na_2CO_3)**

0,1 N (5,13 g/l) Na_2CO_3 -ot használtam az enzimreakció leállításához.

3.4. *Lactobacillus* törzs fenntartása

A *Lactobacillus* törzs fenntartása céljából 10 g/l glükózt tartalmazó MRS tápoldatot készítettem, ezt 10 ml térfogatonként kémcsövekbe pipettáztam. A tápoldatot tartalmazó kémcsöveket sterilizálás céljából autoklávba helyeztem (15 perc, 121 °C). A steril táplevesbe 0,5 ml baktérium tenyészetet pipettáztam, az átoltást 24 óránként ismételtam. A törzsfenntartás 37 °C hőmérsékleten történt.

3.5. *Lactobacillus* nemzetség enzimfermentációja

Az enzimfermentációhoz 1 liter 4% laktóz tartalmú MRS tápközeget alkalmaztam. A fermentáció indításához a felszaporított 5 v/v%-os inokulum sejt szuszpenziót beleoltottam a tápközegbe. Az enzimfermentáció 37 °C-on zajlott 16 órán keresztül. Fermentációt követően a sejttömeget tartalmazó oldatot 10 percig 10000 rpm-en, 4°C-on centrifugáltam, a fermentlé és a biomassza szétválasztása céljából. A centrifugálással összegyűjtött sejteket 15 ml 6,5 pH-jú Sorensen pufferrel mostam kétszer és végül 80 ml pufferbe visszaszuszpendáltam a sejteket.

3.6. Sejtfeltárás

Mivel a β -galaktozidáz enzim intracellulárisan termelődik, ezért 3 sejtfeltárási módszert (French Press, CTAB, lizozim enzim), illetve azok kombinációit alkalmaztam különböző beállításokkal az enzim kinyerésére. Ezen módszereket, mérési beállításokat összehasonlítottam egymással, illetve vizsgáltam különböző faktorok változtatásának hatását.

3.6.1. French Press

A mechanikai eljárások közül French Press nagynyomású homogenizátort alkalmaztam. A centrifugálással összegyűjtött baktériumsejtekből három párhuzamos beállítással végeztem el a sejtfeltárást, a nagy mintamennyiség miatt három részletben, 800 Psi nyomás mellett. A sejtfeltárás után kapott sejttörmelékes szuszpenzióból két párhuzamos mintát vettem, majd ezt követően 10 percig 10000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltam. Az így kapott felülúszóból, illetve a centrifugálás nélküli sejttörmeléből két párhuzamos méréssel meghatároztam az enzim aktivitását.

3.6.2. Kémiai eljárás

Az összegyűjtött baktériumsejtekhez két párhuzamosban, 1:0,5; 1:1 és 1:2 arányban 0,45 mg/ml CTAB oldatot adtam, majd vortex segítségével alaposan homogenizáltam. A kísérletek során különböző időtartamokig (10, 20, 30, 60 és 120 perc) szobahőmérsékleten inkubáltam a lizáló oldatot tartalmazó mintákat.

A sejtfeltárás során keletkezett sejttörmelékes szuszpenzióból két párhuzamos mintavételt végeztem. Ezt követően a szuszpenziót 10 percig 10000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltam és a kapott felülúszóból két párhuzamos enzimaktivitás mértem a 3.7. fejezetben foglalt módszer szerint.

3.6.3. Lizozim enzim

Az enzimes kezelés során a Serva cég által gyártott lizozim enzimet használtam, amelynek 37 °C-on található a működéséhez optimális hőmérséklete. A sejtfeltárás során keletkezett sejttörmelékes szuszpenziót 10 percig 10000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltam és a kapott felülúszóból két párhuzamos enzimaktivitás mértem a 3.7. fejezetben foglalt módszer szerint.

3.7. β -galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározása

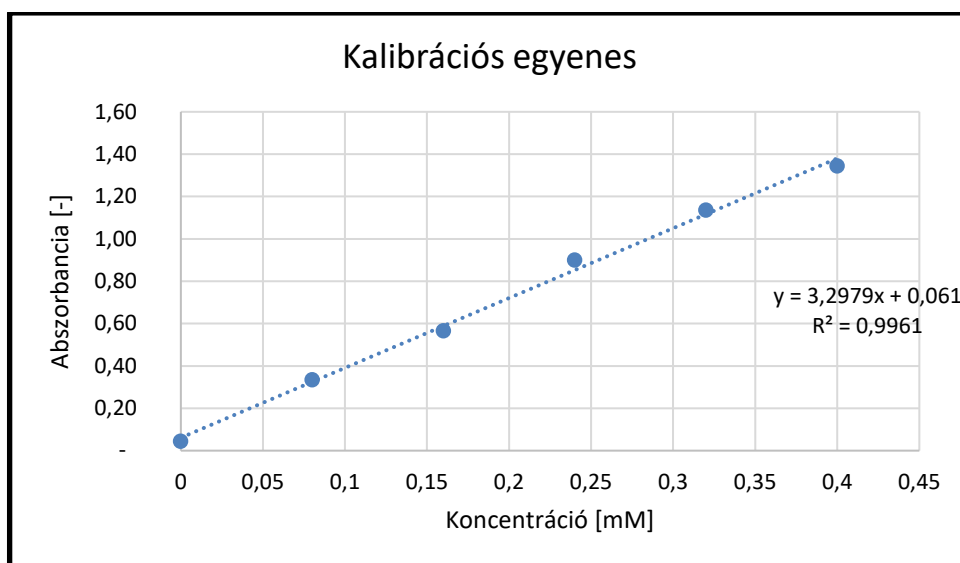
A feltárt sejtekből az intracelluláris β -galaktozidáz enzim aktivitása megállapítható. Az enzimaktivitás meghatározásának elve, hogy a β -galaktozidáz enzim a p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrátum β -D kötéseit felhasítva p-nitrofenolt szabadít fel, amelynek mennyisége spektrofotometriás méréssel 405 nm-en meghatározható. Az enzimaktivitás méréshez összeállított reakcióelegyek és a vak minták összetételét az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: Enzimaktivitás mérés reakcióelegyeinek és vak mintáinak összetétele

	Puffer	Desztillált víz	Szubsztrátum	Minta
Műszervak	0,3 ml	0,7 ml	-	-
Szubsztrátvak	0,3 ml	0,2 ml	0,5 ml	-
Enzimvak	0,3 ml	0,5 ml	-	0,2 ml
Reakció elegy	0,3 ml	-	0,5 ml	0,2 ml

Az elkészített oldatokat előinkubálás céljából előmelegített vízfürdőbe helyeztem (5 perc, 50 °C) és a reakciót a megfelelően hígított minta 0,2 ml térfogatának hozzáadagolásával indítottam. Az 5 perces reakcióidő leteltével a reakciót 5 ml 0,1 N-os Na₂CO₃ oldattal állítottam le, majd a műszervakra nullázott spektrofotométerrel 405 nm hullámhosszon mértem a minták abszorbanciáját.

A felszabadult para-nitrofenol mennyiség meghatározásához standard sort készítettem és a kapott kalibrációs pontokra illesztett egyenes meredekségét használtam fel az aktivitás kiszámításához (8. ábra).



8. ábra Para-nitrofenol mennyiségi meghatározására szolgáló kalibrációs egyenes

A kapott abszorbancia értékekből a következő egyenlettel számoltam ki az enzimaktivitás értékeket:

$$\text{Enzimaktivitás (U)} = \frac{(A_{\text{minta}} - A_{\text{enzimvak}} - A_{\text{szubsztrátvak}}) * h * V_R}{V_M * t * 3,2979}$$

Ahol:

A - mért abszorbancia érték (minta; enzimvak; szubsztrátvak)

h - enzimoldat hígítása

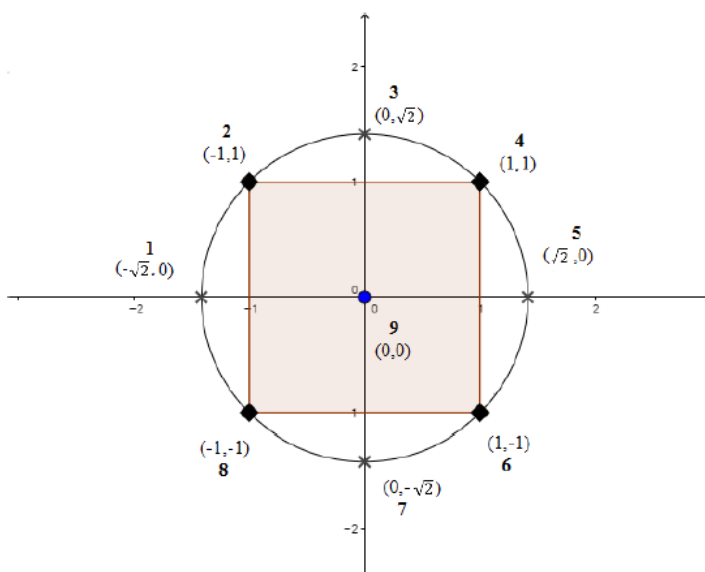
V_R - reakció térfogat [ml]

V_M - minta térfogat [ml]

t - reakció idő [perc]

3.8. Központi elrendezésű kísérlettervezés

A *Lactobacillus* sejtek enzimes sejtfeltárásánál az optimális inkubációs időt és a lizozim koncentrációt (két faktor) központi elrendezésű kísérlettervezéssel (central composite design) határoztam meg. Ezzel a módszerrel minimális a kísérleti beállítások száma a főhatások és a kvadratikus hatások becslésére, így kevesebb kísérletet igényel. Központi elrendezésű kísérlettervezés esetén minden faktornak öt szintje van (extra magas, magas, központ, alacsony, extra alacsony), így a megfelelő lizozim koncentráció és inkubációs idő meghatározásához a pontjaimat a 9. ábra szerinti kétdimenziós koordináta rendszerben helyeztem el.



9. ábra: Központi elrendezésű kísérlettervezés pontjai kétdimenziós koordináta rendszerben

Összesen 13 mérési beállítást határoztam meg, amelyek közül 5 beállítás a központi pontnak felel meg. Az elrendezés központi pontja az 50 mg/ml-es lizozim enzimes kezelés 150 perces inkubációs idővel. A magas, illetve alacsony szinteket a középponttól meghatározott léptékre lévő négyzet pontok (-1, +1) jelölik, míg az extra magas és extra alacsony értékeket, azaz a vizsgálat szélső értékeit az úgynevezett csillagpontok ($\sqrt{2}, -\sqrt{2}$) mutatják.

A választott faktorok értékeit az alábbi képlettel határozhatjuk meg:

$$\text{Lizozim koncentráció} = \text{Középpont}_1 - (\text{Lépték} \cdot x_1)$$

illetve,

$$\text{Inkubációs idő} = \text{Középpont}_2 - (\text{Lépték} \cdot x_2)$$

ahol: X_1 = a pontok abszcicán felvett értékei

X_2 = a pontok ordinátán felvett értékei

A kísérlet elrendezési szintjeit a 6.táblázat mutatja be.

6. táblázat: **Kísérlet elrendezési szintjei**

	X_1 Lizozim koncentráció [mg/ml]	X_2 Inkubációs idő [perc]
$\sqrt{2}$	7,6	22
1	20,0	60
0	50,0	150
-1	80,0	240
$-\sqrt{2}$	92,4	277

Két faktor esetén az alábbi modell írható fel a függő változó és a független transzformált faktorkok jellemzésére:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2 + b_5X_1X_2$$

Ahol: Y: függő változó, β -galaktozidáz enzimaktivitás [U/ml]

X_1 : független változó, lizozim koncentráció [mg/ml]

X_2 : független változó, inkubációs idő [perc]

b_1 - b_5 : független változókhoz tartozó koefficiensek és a tengelymetszet (b_0)

b_0 : független változókhoz tartozó tengelymetszet

Az adatok statisztikai elemzését a MiniTab statisztikai és adatelemző szoftver felhasználásával hajtottam végre.

3.9. Felhasznált berendezések és eszközök

- Analitikai mérleg (Sartorius CP225D)
- Táramérleg (Sartorius ED3202S-CW)
- Laboratóriumi mágneses keverő (FALC-F06)
- Autokláv
- Lamináris box (BV I200)

- Vortex keverő
- Termosztát
- Laboratóriumi centrifuga (Sigma 1-15)
- pH mérő (Mettler Toledo GmbH)
- Vízfürdő (Julabo F34)
- Stopper óra
- Spektrofotométer (UNICAM, Helios Alpha)
- French Press homogenizátor (Thermo Electron Corporation)
- Általános laboratóriumi eszközök (főzőpoharak, pipetták, Erlenmeyer-lombikok, mérőhengerek, kémcsövek, kémcsőállványok, Eppendorf csövek)

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

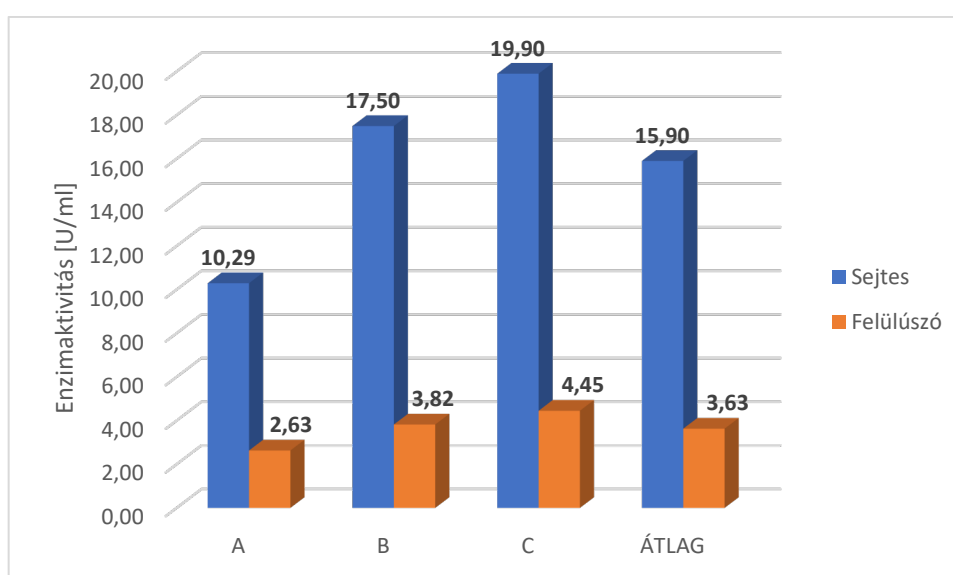
Kísérleti munkám során a probiotikus tulajdonsággal rendelkező *Limosilactobacillus fermentum* LF08 baktérium sejtfeltárásának optimalizálására összpontosítottam, β -galaktozidáz enzimének kinyerése céljából. Az ideális feltárási módszer kidolgozásakor mindvégig törekedtem az intracelluláris β -galaktozidáz enzim aktivitásában minimális csökkenést okozni. A kereskedelmi forgalomban kapható béta-galaktozidáz általában *Escherichia coli* vagy *Aspergillus niger* eredetű, azonban a *Lactobacillus* források probiotikus tulajdonságuk miatt is egyre nagyobb figyelmet kapnak az élelmiszeripar több területén. A sejtfeltárási módszerek optimalizálása előtt első lépésként enzimfermentációt végeztem, majd a meghatározott paraméterek beállítása mellett végeztem el az adott sejtfeltárási technikát. Az alkalmazott sejtfeltárási módszereket egymáshoz képest összehasonlítottam és választottam ki a β -galaktozidáz kinyeréséhez legmegfelelőbbet. A sejtfeltáró technikák kidolgozásakor több ponton is enzimaktivitást mértem és a kapott eredményeket összehasonlítottam a szakirodalmakban fellelhető adatokkal.

4.1. Enzimfermentáció

Az enzimfermentáció körülményeinek beállítását már meglévő kísérleti eredményekre alapozva végeztem el, Tóth (2019) által a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 β -galaktozidázának termeléséhez szükséges optimális körülményeket alkalmazva. A maximális enzimaktivitást 16 órás fermentációval érte el 37 °C-on, MRS tápközegben, amely 4% laktózt tartalmazott (Tóth, 2019). Az említett feltételek mellett 1000 ml fermentlevet állítottam elő. A *Limosilactobacillus fermentum* J20 és J28 törzsek béta-galaktozidázának maximális aktivitását szintén 16 órás fermentáció után határozták meg Santiago-López és munkatársai (2018). Cikkükben 37 °C-os inkubációs hőmérsékletéről és MRS tápközegről számoltak be. Több tanulmány is a *Limosilactobacillus fermentum* baktériumok esetén 6,0-6,5 pH tartományt határoz meg az enzimtermelés szempontjából optimálisnak (Zhang et al., 2011; Wattana et al., 2012). Devi és munkatársai (2011) arról számoltak be, hogy a laktóz tartalmú tápközeg növelheti a béta-galaktozidáz termelődését. Megállapításaik szerint egészen 7% -ig. Carevic és kutatócsoportja (2015) pedig tudományosan bizonyították, hogy a laktóz egyedüli szénforrásként hatékonyabban elősegíti a β -galaktozidáz termelődését, mint amikor galaktózzal vagy glükózzal együtt alkalmazták.

4.2. Mechanikai sejtfeltárás eredménye

Az intracelluláris β -galaktozidáz enzim fermentációját követően, a tisztítási folyamat kezdeti lépése a sejtek feltárása. Ennek megvalósításához első lépésként centrifugálással elválasztottam a *Lactobacillus* sejteket (10000 rpm, 10 perc, 4 °C-on). French Press feltárás után elkülönítettem a sejtörmeléket és a felülúszót, annak a megállapítására, hogy az enzim sejtfalhoz kötött-e ki. Három párhuzamos mintavételt végeztem és mintavételként kettő párhuzamos mérést hajtottam végre, amelyeket átlagoltam. A felülúszóban és a sejt mintákban mért enzimaktivitás értékek, illetve a három különböző mintavétel átlagait a 10. ábra mutatja be.



10. ábra: French Press után mért enzimaktivitások a sejtörmelékes szuszpenzióban és felülúszóban

Az oszlopdiaagram jól szemlélteti, hogy a felülúszóban a sejtfeltárási művelet után alacsony enzimaktivitás volt mérhető, míg a sejtet tartalmazó minták esetén jóval magasabb 10,29; 17,50 és 19,90 U/ml, átlagban 15,9 U/ml enzimaktivitásokat mértem.

Benov és munkatársai (2002) szintén nagynyomású homogenizátort használtak az *Escherichia coli* baktérium sejtfeltárásához 900 psi nyomáson. Kutatásaik során több mechanikai módszert is összehasonlítottak a French Press művelettel és mérték a sejtfeltárást követően különböző enzimek (például: fumaráz, glicerín-kináz, 3-dehidrokinát szintáz) aktivitását. Megállapították, hogy a French Press kevésbé volt alkalmas magas fehérje kihozatal elérésre, illetve a művelet során az érzékeny molekulák, mint például a fehérjék, enzimek is könnyen denaturálódtak. Szintén nagynyomású homogenizátort használtak Bury és munkatársai (2001) a *L. delbrueckii*

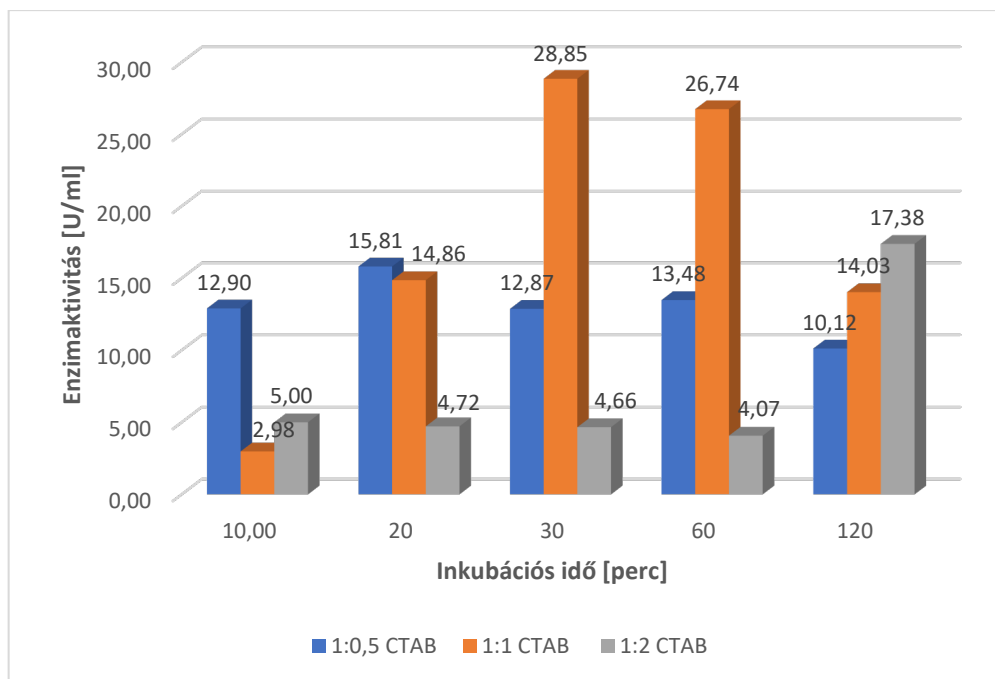
ssp. *bulgaricus* 11842 béta-galaktozidázának kinyeréséhez, azonban 0,25°C/MPa hőmérséklet emelkedést tapasztaltak a feltárási lépések során. A sejtszuszpenziót a feltárási ciklusok végén hűtésnek vetették alá, de így sem sikerült a β -galaktozidáz hő általi denaturálódását megakadályozni. A fentiekben említett, hő általi enzimaktivitás csökkenés következhetett be az általam végzett French Press módszer során is, ami magyarázza az alacsony aktivitás értékeket. A módszer nem képes a sejtfal-enzim komplex megbontására sem, így ez is hozzájárulhatott a felülúszóban tapasztalt alacsony enzimaktivitásokhoz. A továbbiakban olyan módszer kiválasztása szükséges, ami megbontja a sejtfal és β -galaktozidáz enzim közötti erős kölcsönhatást.

4.3. Kémiai sejtfeltárási eredményei

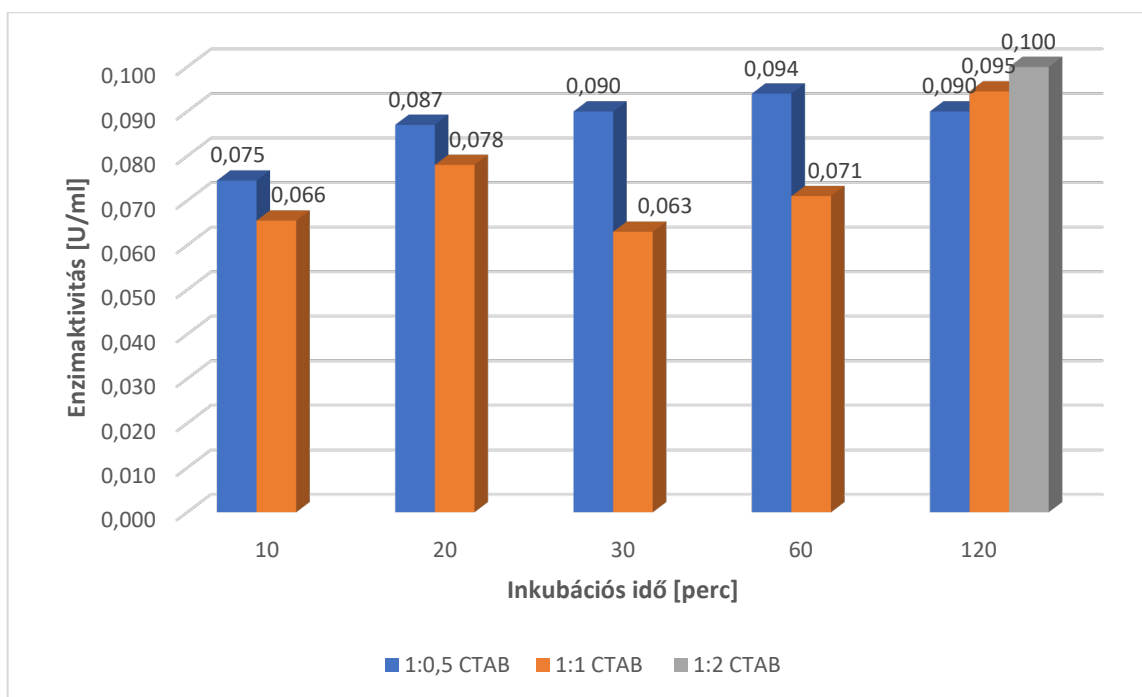
Orban és Patterson (2000) kutatásaikkal igazolták, hogy a 0,45 mg/ml CTAB hatékonyan használható a bifidobaktériumok sejtfalának megbontására, ezért a szintén Gram-pozitív *Limosilactobacillus fermentum* törzs esetén is ezt a sejtfeltárási módszert vizsgáltam.

A felületaktív, hosszú alkil-láncot és kvaterner amónium iont tartalmazó CTAB a sejtekhez való kapcsolódáskor csökkenti a sejtek negatív töltését, elősegítve ezzel kicsapódási hajlandóságukat. Az N-alkil csoportot tartalmazó hidrofób farki részével képes bejutni a baktérium belsejébe, megváltoztatva ezzel a sejtmembrán lipid kettősrétegét. A sejtmembrán szerkezetében bekövetkező változás hatására a sejten belüli fluidumok kiszivároghatnak az intracelluláris térből, ami a sejt halálát okozhatja (Albadran et al., 2018). Megfelelő mennyiségű CTAB hozzáadásával tehát a sejtek membránja roncsolódik, ami elősegíti a hidrofób, intracelluláris komponensek, köztük az enzimek sejten kívülre jutását (Lai et al., 2018).

Annak érdekében, hogy megállapítsam a hatékony sejtfeltáráshoz szükséges CTAB mennyiséget 1:0,5, 1:1 és 1:2 arányban adtam a sejtekhez a 0,45 mg/ml CTAB-t. A sejtfeltárási optimális inkubációs idejét úgy állapítottam meg, hogy 10, 20, 30, 60 és 120 perc után két párhuzamos mintát vettem, majd mértem a sejttörmelékes szuszpenzió és a centrifugálás után kapott felülúszó β -galaktozidáz aktivitását. A sejtfeltárási során cél volt, hogy a β -galaktozidáz enzim a kémiai kezelést követően a felülúszóba kerüljön. A sejttörmelékes szuszpenzió esetén kapott eredményeket a 11. ábra, míg a felülúszóban mért aktivitásokat a 12. ábra mutatja be.



11. ábra: Különböző sejtörmelék:CTAB arányú sejtfeltárás utáni β -galaktozidáz aktivitások a sejtörmelékes szuszpenzióban



12. ábra: Különböző sejtörmelék:CTAB arányú sejtfeltárás utáni β -galaktozidáz aktivitások a felülúszóban

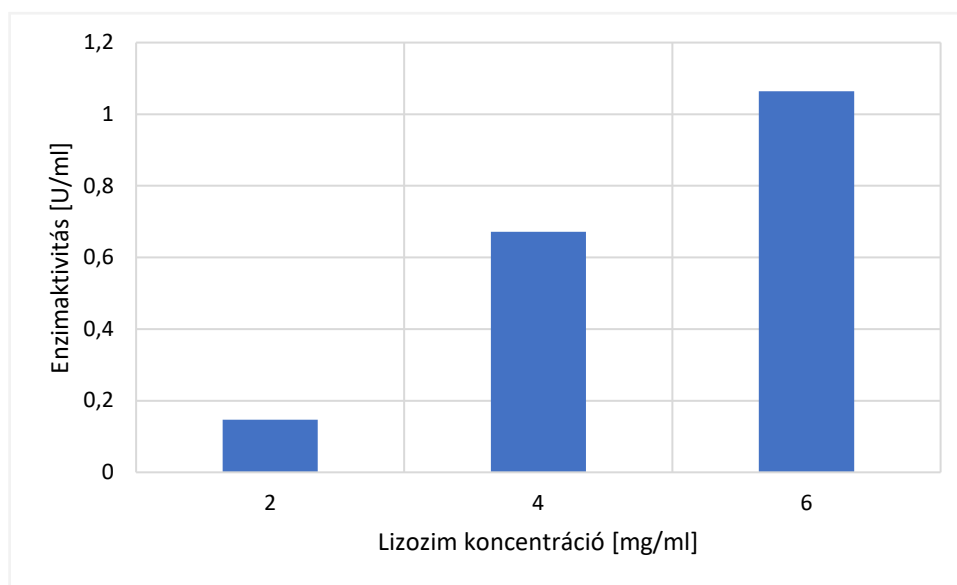
A 11. ábra azt mutatja, hogy a sejtfeltárási utáni sejtörmelékes szuszpenziók esetén a legnagyobb enzimaktivitások 30-60 perc között voltak mérhetőek 1:1 arányú CTAB használatakor. Ennél az aránynál azonban 120 perc inkubációs időnél a β -galaktozidáz aktivitás jelentősen lecsökkent 14,03 U/ml-re a sejtörmelékes szuszpenzióban, míg a felülúszóban fokozott enzimaktivitás volt ekkor megfigyelhető (0,095 U/ml). Az 1:1 arányú CTAB-s feltárási felülúszójában 30 perccél 0,063 U/ml, 60 perccél 0,071 U/ml enzimaktivitást mértem, ami jelentősen elmarad a 120 perc inkubációs időnél mértektől. A sejtekhez adagolt CTAB mennyiségének csökkentésével (1:0,5 CTAB) jelentősen nagyobb enzimaktivitást értékeket kaptam a felülúszókban, illetve 120 perc eltelté után az 1:1 aránynál hasonló β -galaktozidáz aktivitást mértem (0,090 U/ml). Orban és Patterson (2000) kutatásaikkal igazolták, hogy különböző bifidobaktériumok sejtfeltárása 0,45 mg/ml CTAB mennyiségének növelésével hatékonyabbá tehető, ezért a *Limosilactobacillus fermentum* sejteknél 1:2 CTAB arányú kezelést is végeztem. A sejtörmelékes szuszpenzióban szignifikánsan nagyobb (17,38 U/ml) enzimaktivitás értékeket kaptam a többi CTAB aránynál mértékhez képest, 120 perc inkubációs idő elteltével. A sejtekhez 1:2 arányban hozzáadott CTAB kezelés esetén csak 2 óra eltelté után mértem a felülúszóból enzimaktivitást, hiszen az előző méréseknél is ebben az időpontban tapasztaltam a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitásokat. 1:2 arányú CTAB kezelés 120 perces inkubációs idővel 0,10 U/ml enzimaktivitást eredményezett a felülúszóban, ami az összes módszer közül a leghatékonyabbnak bizonyult, de jelentősen kisebb a sejtörmeléket is tartalmazó mintákhoz képest.

A sejtörmelékes szuszpenzióban nagy enzimaktivitás értékek mérhetőek az összes alkalmazott detergens arány esetén 2 órás inkubációs időnél, ami arra enged következtetni, hogy a pusztán CTAB-val történő feltárási nem képes a sejtörmelékekhez, sejtfal részekhez kötött β -galaktozidázok mennyiségét csökkenteni. Ezen kötéseket felbontására a továbbiakban lizozim enzimet használtam, ami a sejtfalat alkotó vastag peptidoglikán réteget képes roncsolni (Alimolaei & Golchin, 2016). A továbbiakban 1:2 arányban adagoltam 0,45 mg/ml CTAB reagenst a kémiai kezeléseknél és 2 órán keresztül végeztem az inkubációt.

4.4. Enzimes feltárási

Hristovski (2020) vizsgálta a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 baktérium sejtfeltárásiához szükséges lizozim koncentrációt, melynek során 40 mg/ml-nél mérte a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitást. Ennek alapján az enzimes kezeléshez 40 mg/ml koncentrációs értéket és 2 órás 37 °C-on történő inkubálást alkalmaztam.

A 2 ml lizátum mintákhoz először 100, 200 és 300 μ l (2, 4 és 6 mg/ml) mennyiségben adagoltam 40 mg/ml enzimet, annak érdekében, hogy megállapítsam a feltáráshoz szükséges lizozim mennyiségét. A CTAB-s kezeléshez hasonlóan, ebben az esetben is a 2 óra eltelte után centrifugálással elválasztott felülúszóból mértem a béta-galaktozidáz enzim aktivitását. A kapott eredményeket a 13. ábra mutatja.



13. ábra: **Különböző lizozim koncentrációknál mért a β -galaktozidáz enzimaktivitások**

A mért adatok alapján megállapítható, hogy a 6 mg/ml-es lizozim koncentráció váltott ki legnagyobb növekedést (1,064 U/ml) az enzimaktivitásban, így a további enzimes kezeléseknél ezt a koncentrációt alkalmaztam. 4 mg/ml lizozim esetén 0,672 U/ml enzimaktivitás értéket mértem, míg 2 mg/ml enzim hozzáadása jelentősen alacsonyabb β -galaktozidáz aktivitást eredményezett 0,147 U/ml értékkel, azonban ez az enzimaktivitás is nagyobb, mint a leghatékonyabbnak bizonyult 1:2 arányú CTAB-s feltárásnál mért.

4.5. Kémiai és enzimes sejtfeltárás kombinálása

Choonia és munkatársai (2013) a sejtfeltárást követő enzim lokalizáció meghatározási módszerüknél azt állapították meg, hogy a β -galaktozidáz legnagyobb koncentrációja a citoplazmában (49%), míg 29,3%-a sejtmembránhoz kötött frakcióban volt. A maradék 20,6%-os enzim koncentrációt pedig a periplazmatikus részben mérték. Az imént leírt tényekre támaszkodva a kémiai módszeres feltárást (0,45 mg/ml CTAB) kombináltam lizozimes kezeléssel, megcélözva ezáltal a sejtfalhoz kötött β -galaktozidáz mennyiségének csökkentését. A CTAB kationos detergensként hozzájárul a sejtfal lipopoliszacharidjainak és fehérjéinek

denaturáláshoz, míg a lizozim enzim a peptidoglikán gerincét alkotó N-acetil-glükózamin és N-acetilmurámsav közötti $\beta(1,4)$ -glikozid kötést képes hidrolizálni, előidézve ezzel a Gram-pozitív baktériumok lízisét. Az enzimes reakció során a GLU-35 savmaradék protonokat ad a glikozid kötéshez, így savként viselkedik. A protonálódás oxóniumiont eredményez, amely stabil kovalens kötéssel kapcsolódik az Asp-52 maradékhoz. Egy vízmolekula hatására a hidrolízis végbemegy és a Glu-35 újra protonálódik, újrateremtve az eredeti reakcióképes állapotot (Primo et al., 2018).

A 6 mg/ml-es lizozim enzimes kezelés és a kombinált feltárási módszerek két beállítása során kapott eredményeket a 7. táblázat szemlélteti.

7. táblázat: **Kombinált sejtfeltárási módszerek β -galaktozidáz enzim kinyerésére**

Módszer	CTAB [mg/ml]	Lizozim [mg/ml]	Inkubációs idő [perc]	Enzimaktivitás [U/ml]	
				Sejttörmelékes szuszpenzió	Felülúszó
Lizozim	-	6	120	-	1,06
CTAB és lizozim kezelés egy időben	0,45	6	120	3,11	0,31
CTAB után lizozim kezelés	0,45	6	120 perc CTAB majd 120 perc lizozim	3,81	2,14

A táblázat alapján elmondható, hogy csak a lizozimmal történő sejtfeltárást nem eredményezett elegendően magas enzimaktivitás értékeket a felülúszóban (1,06 U/ml). Alimolaei és Golchin (2015) a *Lacticaseibacillus casei* baktérium DNS-ének izolálása során szintén arra a megállapításra jutott, hogy a lizozimes kezeléseket különböző kémiai komponensekkel szükséges kiegészíteni a magasabb DNS kihozatal érdekében. A lizozimes kezelést EDTA és Triton X-100 kémiai vegyületekkel egészítették ki és érték el hatékony sejtfeltárást a szintén tejsavbaktériumok közé tartozó *Lacticaseibacillus casei* baktérium esetén. Hristovski (2020) bizonyította, hogy a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs enzimes sejtfeltárása 2 mM EDTA-val, 20 mM Tris-HCl oldattal, illetve Triton X 100 kémiai reagenssel nem eredményez nagy β -galaktozidáz aktivitást a felülúszóban. Szintén kísérletekkel alátámasztotta azt a tényt, hogy a pusztán kémiai kezelés nem elegendő a *Limosilactobacillus fermentum* sejtek feltáráshoz, ugyanis 5 mM EDTA-val és 5 M lítium-kloriddal végzett kezelésnél sem tapasztalt béta-galaktozidáz aktivitást a felülúszóban (Hristovski, 2020). A 6 mg/ml-es lizozimes

sejtfeltárást a *Limosilactobacillus fermentum* F08 törzs esetén az imént, illetve 4.3 fejezetben kifejtett okok miatt 1:2 arányú CTAB kezeléssel egészítettem ki. A kombinált feltárási módszerek közül a baktérium sejteket CTAB detergenssel és lizozim enzimmel együtt inkubáltam 2 órán át 37 °C-on. A sejtfeltárást követően centrifugálással elválasztottam a sejttörmeléket és a minták felülúszójából meghatároztam az enzimaktivitást. Második esetben pedig 2 óra CTAB-val (szobahőmérsékleten) történő feltárást követte a 6 mg/ml-es lizozimes kezelés. Az enzimes roncsolás szintén 2 órán keresztül történt 37 °C hőmérsékleten.

A sejttörmelékes szuszpenzió (3,81 U/ml) és a felülúszó (2,14 U/ml) esetén is a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitásokat a 2 órás CTAB-val, majd az azt követő 2 órás lizozimes kezelésnél mértem. Ezzel szemben a felülúszóban csak 0,31 U/ml enzimaktivitást mutattam ki akkor, amikor a mintákat egyszerre kezeltem CTAB-val és lizozim enzimmel. A továbbiakban ezen módszer mérési beállításait optimalizáltam úgy, hogy vizsgáltam az enzimes sejtfeltárást a koncentráció és az inkubációs idő hatását.

4.5.1. Koncentráció és inkubációs idő hatása

A *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs kombinált enzimes és kémiai sejtfeltárási optimalizálására két faktoros központi elrendezésű kísérlettervezést végeztem. Ezt a fajta kísérlettervezést jellemzi, hogy minimális a kísérletek száma a főhatások és a kvadratus hatás becslésére, tehát kevesebb kísérletet igényel. Az általam választott független változók a lizozim enzim koncentrációja (mg/ml) és az inkubációs idő (perc) volt, amelyek függvényében vizsgáltam a β -galaktozidáz aktivitást (U/ml). Léptéktényezőnek 30 mg/ml-t választottam az enzim mennyisége esetén, míg az inkubációs időnél 90 percet. A kísérlet során kilenc különböző beállítást vizsgáltam, megerősítésként a központi ponton 5 enzimaktivitás mérést is végeztem. A kísérleti elrendezés központi pontja az 50 mg/ml lizozim koncentráció és a 150 perc inkubációs idő volt. A meghatározott tartományokon belül, a 8. táblázat szerinti beállításoknak megfelelően végeztem el a kísérletet és mértem az egyes pontok β -galaktozidáz aktivitását.

8. táblázat: Központi elrendezésű kísérlet mérési beállításai

Mérés sorszama	Lizozim koncentráció szint	Lizozim koncentráció [mg/ml]	Inkubációs idő szint	Inkubációs idő [perc]	Enzimaktivitás [U/ml]
1.	0	50,0	$-\sqrt{2}$	277	5,33
2.	1	20,0	-1	240	4,56
3.	0	50,0	$\sqrt{2}$	22	0,08
4.	0	50,0	0	150	1,83
5.	0	50,0	0	150	2,53
6.	-1	80,0	-1	240	3,77
7.	0	50,0	0	150	2,40
8.	1	20,0	1	60	0,85
9.	0	50,0	0	150	2,87
10.	$-\sqrt{2}$	92,4	0	150	1,96
11.	0	50,0	0	150	2,58
12.	-1	80,0	1	60	1,24
13.	$\sqrt{2}$	7,5	0	150	1,92

13 db mérést végeztem, amelynek során 7,5 mg/ml volt a legalacsonyabb és 92,4 mg/ml pedig a legnagyobb alkalmazott lizozim koncentráció. Az inkubációs idő tartománya 22-277 perc között alakult. A hőmérsékletet minden egyes mérési beállításnál konstans 37 °C-on tartottam és az enzimaktivásokat a sejtfeltárás után a sejtörmelékmentes felülúszóból mértem.

A mérés során kapott aktivitás eredmények alapján a MiniTab program segítségével meghatározható a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 várható β -galaktozidáz aktivitása különböző lizozim koncentrációjú és inkubációs idejű sejtfeltárási beállításoknál, ezt mutatja be a 14. ábra.

A várható aktivitás értékek becslése a program alapján az alábbi egyenlettel írható le:

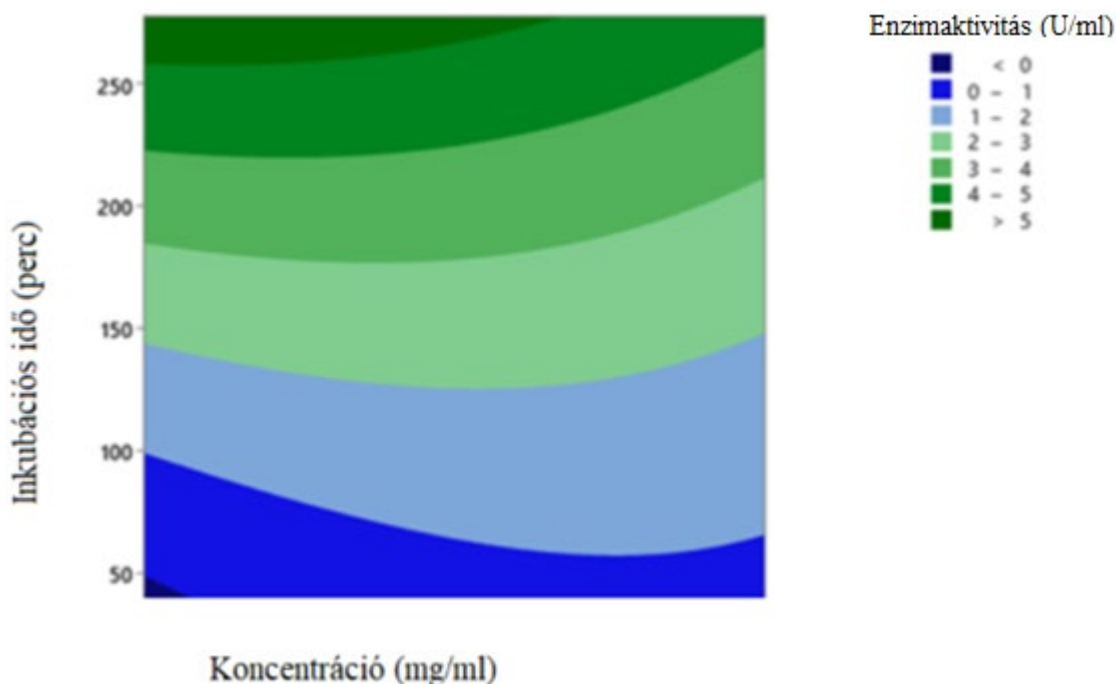
$$Y = -1,132 + 0,0359X_1 + 0,01717 X_2 - 0,000204X_1^2 + 0,000025X_2^2 - 0,000112X_1X_2$$

Ahol: Y = β -galaktozidáz enzimaktivitás [U/ml]

X₁ = lizozim koncentráció [mg/ml]

X₂ = inkubációs idő [perc]

Az R^2 érték 96,31%-nak adódott, ami azt mutatja, hogy az alkalmazott modell jól illeszkedett a tényleges adatokhoz.



14. ábra: **Kontúr diagram az enzimaktivitás alakulásáról [x tengely: lizozim koncentráció (mg/ml); y tengely: inkubációs idő (perc)]**

Az ábrán a kontúrvonalak segítségével lehet látni, hogy hogyan változik az enzimaktivitás az inkubációs idő és a koncentráció függvényében.

Ennek alapján megállapítható, hogy a legnagyobb enzimaktivitás 277 percnél mérhető és az enzim mennyiségének nincs igazán hatása a β -galaktozidáz aktivitására. 10 mg/ml ugyanolyan aktivitás értéket ad 277 perccel, mint 50 mg/ml lizozim koncentráció. 240 percnél 4-5 U/ml értékeket mértem. 150 perc eltelte után 2-3 U/ml enzimaktivitást tapasztaltam 7,5 és 92,4 mg/ml közötti lizozim koncentrációk mellett. 150 perc inkubációs idő alatt csak nagyon csekély mennyiségű β -galaktozidáz aktivitás volt tapasztalható, azonban az 1:2 arányú CTAB-s feltáráshoz képest már 50-szeres enzimaktivitás növekedést értem el a felülúszóban.

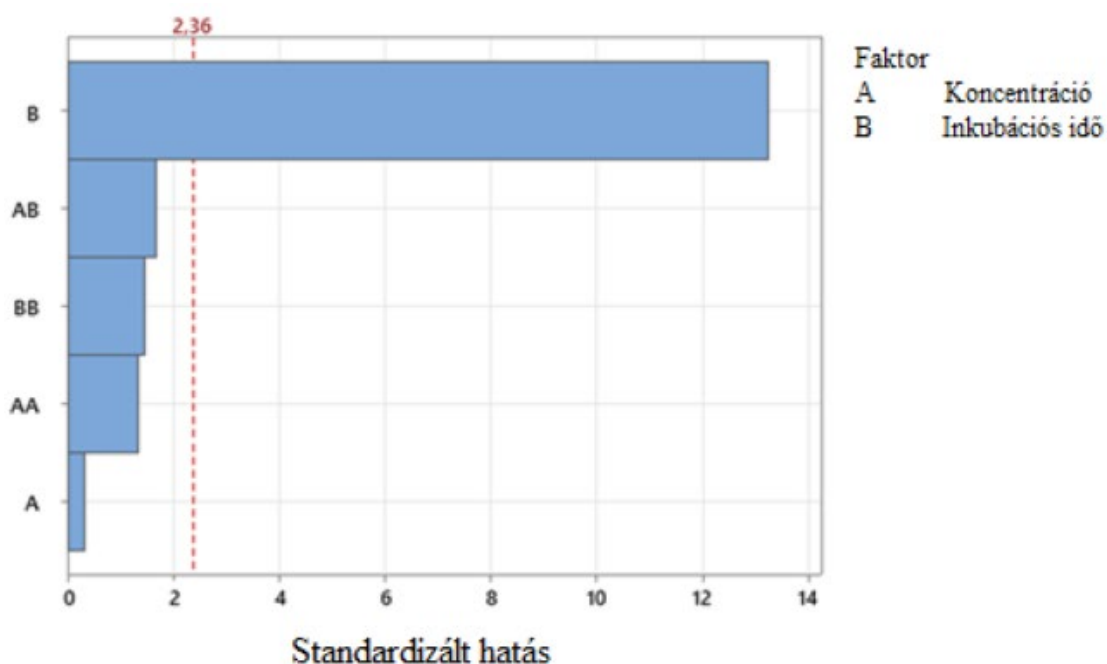
A kapott enzimaktivitás értékek hasonló tendenciát mutatnak korábban végrehajtott vizsgálatokkal, ahol 30 percről 120 percre növelve az inkubációs időt megnégyszereződtek az enzimaktivitás értékek (Hristovski, 2020).

A MiniTab szoftverrel varianciaanalízist is végeztem, 95%-os konfidencia intervallum mellett. A 9. táblázatban bemutatott eredmények alapján látható, hogy csak a sejtfeltárási lineáris inkubációs idejének van számottevő hatása a β -galaktozidáz aktivitásra.

9. táblázat: **Varianciaanalízis eredményei**

Faktorok	SS	df	MS	F	P
Lineáris	23,4665	2	11,7332	87,67	0,00
<i>Lizozim koncentráció</i>	0,0134	1	0,0134	0,10	0,761
<i>Inkubációs idő</i>	23,4530	1	23,4530	175,25	0,00
Négyzetes	0,5944	2	0,2972	2,22	0,179
<i>Koncentráció*koncentráció</i>	0,2340	1	0,2340	1,75	0,228
<i>Inkubációs idő*inkubációs idő</i>	0,2831	1	0,2831	2,12	0,189
Interakció	0,3677	1	0,3677	2,75	0,141
Hiba	0,9368	7	0,1338	-	-
Teljes SS	25,3653	12	-	-	-

MiniTab szoftverrel készítettem Pareto diagramot, annak érdekében, hogy a koncentráció, inkubációs idő és azok különböző interakcióinak hatását vizsgáljam az enzimaktivitásra. Ezt a diagramot mutatja be a 15. ábra.



15. ábra: **Enzimaktivitás standardizált hatásainak elemzése (A: koncentráció; B: inkubációs idő)**

Vizsgálataim alapján a lizozim koncentrációja tekinthető a legkevésbé befolyásoló tényezőnek, ami megegyezik Chassy és Giuffrida (1980) által publikáltakkal. Kutatásuk során különböző mikroorganizmusok, köztük *Lactobacillus* törzsek lizozim enzim kezelését tanulmányozták,

amely szerint a lizozim koncentrációnak elhanyagolható hatása van más mérési faktorokhoz képest. Számos egyéb lizozim működését befolyásoló tényezőt határoztak meg, mint például a tenyésztési tápközegek kiegészítése különböző aminosavakkal. Ilyen aminosavak lehetnek az L-treonin és az L-lizin. A treonin hatása magyarázható azzal, hogy a sejtfal keresztkötéseivel képes kölcsönhatásba lépni, amelyek elengedhetetlenek a baktériumsejt integritásának fenntartásához és stabilizálásához. Ezen aminosav kapcsolódása a sejtfal szerkezetének gyengüléséhez és instabilitásához vezet, elősegítve ezzel a lízist (Chassy & Giuffrida, 1980). Összeségében elmondható, hogy az enzimaktivitásra a legnagyobb hatást az inkubációs idő fejti ki, míg az összes interakció, faktor közül a koncentráció gyakorolja a legkisebb hatást a β -galaktozidáz enzim aktivitására a sejteltávolítás során.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A kutatási munkám a kereskedelmi forgalomban kapható, probiotikus *Limosilactobacillus fermentum* LF08 baktérium sejtek feltárására fókuszált, hogy ezt követően nagy enzimaktivitással lehessen belőlük kinyerni az intracelluláris β -galaktozidáz enzimet. A munkám során kapott eredményeim alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- A French Press nagynyomású homogenizátorral végrehajtott mechanikai feltárás nem eredményezte az enzim-sejtfal komplex megbontását, így ez a módszer nem használható ezen *Lactobacillus* sejtek hatékony feltárására.
- A pusztán kémiai feltárás (1:0,5; 1:1; 1:2 sejt:CTAB arány) sem eredményezett a centrifugálással elválasztott felülúszóban jelentősen megnövekedett enzimaktivitást, nem bontotta fel a sejtfal rész és a β -galaktozidáz enzim közötti erős kölcsönhatást. Ennek alapján a továbbiakban érdemes a CTAB-s feltárást kiegészíteni a $\beta(1,4)$ -glikozid kötést hidrolizáló, kereskedelmileg is kapható lizozim enzimmel.
- A kísérleti munkám elején kitűzött célokat elértem azzal, hogy a β -galaktozidázt eltávolítottam a lizozim enzimmel a sejtfalról úgy, hogy az enzimaktivitás csökkenést optimálisan alacsony szinten tartottam.
- Összeségében sikerült egy megbízható sejtfeltárási módszert kidolgozni a lehető legnagyobb enzimaktivitással. A sejtekhez 1:2 arányban hozzáadott 0,45 mg/ml CTAB detergens, majd az azt követő 6 mg/ml lizozimes feltárás kulcsfontosságú művelet lehet az enzim tisztítási folyamatok előtt.
- A lizozim enzimes feltárás inkubációs ideje, mint az enzimaktivitást legjobban befolyásoló tényező, további optimalásra, tanulmányozásra szorul, akár több *Lactobacillus* törzsön elvégezve különböző mérési beállításokat. Ezen az úton haladva lehetőség nyílna nagy enzimaktivitással rendelkező β -galaktozidáz kinyerésére, ami kulcsfontosságú lehet a gyakran aktivitás veszteséssel járó enzimmtisztítási lépésekhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt évtizedekben a biokatalizátorokkal, enzimekkel kapcsolatos kutatások egyre nagyobb hangsúlyt kaptak mind a tudományos életben, mind ipari vonatkozásban. Ilyen élelmiszeriparban is kiemelt szerepet játszó biokatalizátor a β -galaktozidáz enzim, amely a tejben lévő laktózt képes hidrolizálni. A bakteriális eredetű béta-galaktozidáz intracellulárisan termelődik, így ennek az enzimnek a vizsgálatára csak különböző mechanikai, illetve nem mechanikai sejtfeltárás útján nyílik lehetőség.

Diplomamunkám központi célkitűzése a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 baktérium optimális sejtfeltárási eljárásának kidolgozása volt, amely módszer után az intracellulárisan termelődő β -galaktozidáz enzim a sejttörmeléktől elválasztva is nagy enzimaktivitással rendelkezik.

Az enzimfermentációt már meglévő kísérleti eredményekre alapozva végeztem el. Tóth (2019) által a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 β -galaktozidázának termeléséhez szükséges optimális körülményeket alkalmaztam, ami 16 óráig tartó fermentációt jelent, 37 °C-on, 4% laktóz tartalmú MRS tápközegen.

A mechanikai sejtfeltárás megvalósításához nagynyomású homogenizátort, French Press készüléket használtam. A felülúszóból és a sejttörmeléből is β -galaktozidáz aktivitást mértem a feltárás után, annak megállapítására, hogy az enzim sejtfalhoz kötötten nyerhető-e ki. A felülúszóban alacsony enzimaktivitás volt mérhető, míg ennek ötszörösét tapasztaltam a sejttörmelékeket tartalmazó minták esetén. A felülúszóban mért alacsony enzimaktivitások arra engednek következtetni, hogy a módszer nem alkalmas a sejtfal-enzim komplex megbontására, az enzim nagy része sejtfalhoz kötötten maradt. Benov és munkatársai (2002) a French Press során több enzim hő általi denaturálódását állapították meg, ami szintén magyarázhatja az alacsony enzimaktivitás értékeket.

A kémiai sejtfeltárási művelet kidolgozása során 0,45 mg/ml CTAB detergenst adagoltam 1:0,5; 1:1 és 1:2 arányban a sejtekhez. Különböző időpontokban (10 – 120 perc között) mértem a β -galaktozidáz aktivitást a felülúszóban, illetve a sejttörmelékes mintában, hogy megállapítsam a sejtfeltáráshoz ideális kezelési időt. A hatékony sejtfeltáráshoz szükséges CTAB mennyiségnek az 1:2 arány adódott, illetve a legmagasabb enzimaktivitásokat minden esetben 120 perc idő eltelte után mértem a felülúszóban. A sejttörmelékes szuszpenzióban nagy enzimaktivitási értékeket mértem minden alkalmazott detergens arány esetén 2 órás inkubációs idő után. Ez azt jelzi, hogy a CTAB egyedüli használata nem elegendő ahhoz, hogy a sejttörmelékekhez és a sejtfal részeihez kötött β -galaktozidázok mennyisége csökkenjen.

Sejtfal-enzim komplex felbontására a továbbiakban lizozim enzimet használtam, ami a sejtfalat alkotó vastag peptidoglikán réteget képes megbontani. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a 6 mg/ml-es lizozim koncentráció váltotta ki a legnagyobb növekedést a felülúszóban lévő enzimaktivitásban (1,064 U/ml), így a további enzimes kezeléseknél ezt a koncentrációt alkalmaztam. A 2 mg/ml enzim hozzáadása jelentősen alacsonyabb β -galaktozidáz aktivitást eredményezett (0,147 U/ml), azonban ez is magasabbnak tekinthető az 1:2 arányú 2 órás CTAB kezeléshez képest (0,100 U/ml).

A kémiai és enzimes sejtfeltárás kombinálása esetén az enzimaktivitás értékek számottevő növekedését tapasztaltam a felülúszóban. A sejteket 1:2 arányban CTAB-val inkubáltam 2 órán keresztül, ezt követte a 6 mg/ml lizozim enzimes kezelés 37 °C-on 2 órán keresztül. Szintén tanulmányoztam azt az esetet, amikor a CTAB-val és a lizozim enzimmel együtt inkubáltam a sejteket 2 órán keresztül 37 °C-on. A sejttörmelékes szuszpenzió (3,81 U/ml) és a felülúszó (2,14 U/ml) esetén is a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitásokat a 2 órás 1:2 CTAB-val, majd az azt követő 2 órás lizozimes kezelést követően mértem.

A *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs kombinált enzimes és kémiai sejtfeltárásának optimalizálására két faktoros központi elrendezésű kísérlettervezést hajtottam végre, amely során a lizozim koncentrációt és az inkubációs időt választottam független változóknak. A kísérlet során kilenc különböző mérési beállításnál vizsgáltam a sejtfeltárás utáni enzimaktivitást a felülúszóban, illetve megerősítésként a központi ponton öt ismétlődő mérést is végeztem. 7,5 mg/ml volt a legalacsonyabb és 92,4 mg/ml pedig a legnagyobb alkalmazott lizozim koncentráció, míg az inkubációs idő tartománya 22-277 perc között alakult. A kapott eredményekből MiniTab program segítségével meghatároztam a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 várható β -galaktozidáz aktivitását különböző lizozim koncentráció és inkubációs idő mellett. Megállapítottam, hogy a β -galaktozidáz aktivitásra legnagyobb hatást az inkubációs idő fejt ki, míg az összes faktor közül a koncentráció gyakorolja a legkisebb hatást a sejtfeltárás során. Varianciaanalízist is végeztem, 95%-os konfidencia intervallum mellett, amely alapján szintén megállapítható, hogy csak a sejtfeltárás lineáris inkubációs idejének van számottevő hatása a β -galaktozidáz aktivitásra.

A diplomamunkám fő célkitűzését elértem, ugyanis sikerült egy megbízható sejtfeltárási módszert kidolgozni a 2 órás 1:2 arányú CTAB feltárással, majd az azt követő 2 órás 6 mg/ml-es lizozimes kezeléssel. Ugyanakkor a központi elrendezésű kísérlettervezés bizonyította, hogy az enzimaktivitásra legjelentősebb hatással az inkubációs idő van, így a jövőben szükséges ezen faktor figyelembevételével több mérési beállítást is végezni. A kísérleti munka folytatása során

törekedni kell nagy enzimaktivitással rendelkező β -galaktozidáz kinyerésére, ami döntő szerepet játszhat későbbi enzimsztítási lépésekben.

7. IRODALMI HIVATKOZÁS

- Albadran, H. A., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2018). Development of surfactant-coated alginate capsules containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 82, 490-499. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.04.035
- Alimolaei, M., & Golchin, M. (2016). An Efficient DNA Extraction Method for *Lactobacillus casei*, a Difficult-to-Lyse Bacterium. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(1), e32472. doi:10.17795/ijep32472
- Anisha, G. S. (2017). β -Galactosidases. In S. N. A.. Panday, & S. C. Ricardo (szerk.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (old.: 395-421). Elsevier.
- Benov, L., & Al-Ibraheem, J. (2002). Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of methods. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 428-431. doi:10.5483/bmbrep.2002.35.4.428
- Bhalla TC. (2015). β -Galactosidase from *Lactobacillus brevis* PLA28: Purification, Characterization and Synthesis of Galacto-oligosaccharides. *Journal of Food & Industrial Microbiology*, 1(1), 1-5.
- Bhavini, K., & Sudeepa, E. (2020). Review On Lactobacillus fermentum Article in International Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education. *International Journal Of Advance Research And Innovative Ideas In Education*, 6(3), 2395-4396.
- Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., & Valtonen, V. (2003). Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria. 36, 775-80.
- Bury, D., Jelen, P., & Kalab, M. (2001). Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(1), 23-29.
- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(1), D233-D238. doi:10.1093/nar/gkn663

- Carević, M., Vukašinović-Sekulić, M., Grbavčić, S., Stojanović, M., Mihailović, M., Dimitrijević, A., & Bezbradica, D. (2015). Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hemjska Industrija*, 69(3), 305-312. doi:10.2298/HEMIND140303044C
- Chandel, H., & Sharma, N. (2020). Optimization of B-Galactosidase Produced by a Potential Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus casei* MB2 Isolated from Traditional Dairy Product of Himachal Pradesh. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(6), 2819-2832. doi:10.20546/ijcmas.2020.906.341
- Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 59. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S9
- Chassy, B. M., & Giuffrida, A. (1980). Method for the Lysis of Gram-Positive, Asporogenous Bacteria with Lysozyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(1), 153-158.
- Chen, Y.-B., Lan, D.-L., Tang, C., & Yang, X.-N. (2015). Effect of DNA Extraction Methods on the Apparent Structure of Yak Rumen Microbial Communities as Revealed by 16S rDNA Sequencing. *Polish Journal of Microbiology*, 64(1), 29-36. doi:10.33073/pjm-2015-004
- Choonia, H. S., Saptarshi, S. D., & Lele, S. S. (2013). Release of intracellular β -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* and L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* by high-pressure homogenization. *Chemical Engineering Communications*, 200(11), 1415-1424. doi:10.1080/00986445.2012.751376
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2021). Microalgae biomolecules: Extraction, separation and purification methods. *Processes*, 9(1), 1-40. doi:10.3390/pr9010010
- Czeizel, A., Czeizel, A., & Flatz, S. D. (1983). Prevalence of primary adult lactose malabsorption in Hungary. *Human Genetics*, 64(4), 398-401. doi:10.1007/BF00292375
- Deák, T. (2006). *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda Kiadó Kft.

- Devi Charitha, M., Meera, N. S., Charan Theja, P., & Sai Gopal, D. V. (2011). Production and optimization of β -galactosidase enzyme from probiotic *Lactobacillus* sps. *BioTechnology: An Indian Journal*, 5(3), 153-159.
- Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
- Garro, M. S., de Giori, G. S., de Valdez, G. F., & Oliver, G. (1993). Characterization of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(5), 485-488. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02805.x
- Geciova, J., Bury, D., & Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. *International Dairy Journal*, 12(6), 541-553. doi:10.1016/S0958-6946(02)00038-9
- Glauche, F., Pilarek, M., Bournazou, M. N., Grunzel, P., & Neubauer, P. (2017). Design of experiments-based high-throughput strategy for development and optimization of efficient cell disruption protocols. *Engineering in Life Sciences*, 17(11), 1166-1172. doi:10.1002/elsc.201600030
- Gomaa, E. Z. (2018). β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus reuteri*: Optimization, characterization and formation of galactooligosaccharides. *Indian Journal of Biotechnology*, 17, 407-415.
- Gomes, T. A., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2020). An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(7), 635-654. doi:10.1080/10826068.2020.1728696
- Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2009). A novel α -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties: Gene molecular cloning and heterologous expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 471-477. doi:10.1007/s00253-008-1750-5
- Havas, P. (2014). *Kereskedelmi forgalomban kapható probiotikus baktériumok galaktozidáz enzimeinek tanulmányozása*. Doktori értekezés. Budapest. doi:10.14267/phd.2015005

- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365S-373S. doi:10.1093/ajcn/73.2.365s.
- Hristovski, K. (2020). *Purification of β -Galactosidase enzyme from probiotic Lactobacillus fermentum*. Diplomamunka. Budapest
- Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41-62. doi:10.3109/07388550903330497
- Iqbal, S., Nguyen, T. H., Nguyen, H. A., Nguyen, T. T., Maischberger, T., Kittl, R., & Haltrich, D. (2011). Characterization of a heterodimeric GH2 β -galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3803-3811. doi:10.1021/jf103832q
- Islam, M. S., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*, 8(3), 83. doi:10.3390/mi8030083
- Kang, C. H., Han, S. H., Kim, J. S., Kim, Y., Jeong, Y., Park, H. M., & Paek, N. S. (2019). Inhibition of nitric oxide production, oxidative stress prevention, and probiotic activity of lactic acid bacteria isolated from the human vagina and fermented food. *Microorganisms*, 7(4), 109.
- Kenneth, T. (2020). *Todar's Online Textbook Of Bacteriology*. Letöltés dátuma: 2024. 03 05, forrás: www.textbookofbacteriology.net
- Khusniati, T., Aditya, A. T., Choliq, A., & Sulistiani. (2015). Characterization and Identification of the Best Screened Indigenous Lactic Acid Bacteria Producing β -galactosidase. *KnE Life Sciences*, 2(1), 439. doi:10.18502/kls.v2i1.189
- Kim, D., Choi, Y., Kim, S., Ha, J., Oh, H., Lee, Y., Kim X., Seo Y., Park E., Kang J., Yoo Y., Lee S., Lee H., Yoon, Y. (2021). *Lactobacillus fermentum* smfm2017-nk4 isolated from kimchi can prevent obesity by inhibiting fat accumulation. *Foods*, 10(4), 772.
- Kim, J., Kim, M. Y., Lebaka, V. R., & Wee, Y. J. (2022). Lactic Acid for Green Chemical Industry: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology,

Recovery, and Applications. *Fermentation*, 8(11), 609.
doi:10.3390/fermentation8110609

- Kittibunchakul, S., Pham, M.-L., Tran, A.-M., & Nguyen, T.-H. (2019). β -galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: Biochemical characterization and recombinant expression for applications in dairy industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 947. doi:10.3390/ijms20040947
- Lai, Y. J., Zhou, Y., Eustance, E., Straka, L., Wang, Z., & Rittmann, B. E. (2018). Cell disruption by cationic surfactants affects bioproduct recovery from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Algal Research*, 34, 250-255. doi:10.1016/j.algal.2018.08.010
- Lee, B. H. (2008). Structure, Function and Applications of Microbial β -galactosidase (Lactase). In P. K.-H. (Szerk.), *Carbohydrate-Active Enzymes* (old.: 77-110). Elsevier. doi:10.1533/9781845695750.1.77
- Liu, G. X., Kong, J., Lu, W. W., Kong, W. T., Tian, H., Tian, X. Y., & Huo, G. C. (2011). β -Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5811-5820. doi:10.3168/jds.2011-4479
- Liu, R., Li, S., Yang, B., Chen, L., Ge, Q., Xiong, G., Guoyuan X., Yu H., Wu M., Zhang, W. (2021). Investigation of the antioxidant capacity of cell-free extracts from *Lactobacillus plantarum* NJAU-01 obtained by different cell disruption methods. *LWT - Food Science and Technology*, 152(2), 112393. doi:10.1016/j.lwt.2021.112393
- Lu, Y., Xing, S., He, L., Li, C., Wang, X., Zeng, X., & Dai, Y. (2022). Characterization, High-Density Fermentation, and the Production of a Directed Vat Set Starter of Lactobacilli Used in the Food Industry: A Review. *Foods*, 11(9), 3063. doi:10.3390/foods11193063
- Mahadevaiah, S., Basavaiah, R., Parida, M., & Batra, H. V. (2020). Optimal production of β -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides (GOs). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(4), 2769-2780. doi:10.22207/JPAM.14.4.53
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E. J., Hutkins R. (2017). Health benefits of fermented

- foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94-102. doi:10.1016/j.copbio.2016.11.010
- Matthews, B. W. (2005). The structure of *E. coli* β -galactosidase. *Comptes Rendus - Biologies*, 328(6), 549-556. doi:Comptes Rendus - Biologies
- Mlichova, Z., & Rosenberg, M. (2006). Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(2), 47-54.
- Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Bendali, F., Spano, G., Seal, B. S., & Drider, D. (2019). *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(20), 3387-3399. doi:10.1080/10408398.2019.1688250
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., & Linke, B. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1835-1850. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03949.x
- Nguyen, T. T., Nguyen, H. A., Arreola, S. L., Mlynek, G., Djinović-Carugo, K., Mathiesen, G., Nguyen T. H., Haltrich, D. (2012). Homodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7), 1713-1721. doi:10.1021/jf203909e
- Orban, J. I., & Patterson, J. A. (2000). Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *Journal of Microbiology Methods*, 40(3), 221-224. doi:10.1016/S0167-7012(00)00133-0
- Pakroo, S., Tarrah, A., Takur, R., Wu, M., Corich, V., & Giacomini, A. (2022). *Limosilactobacillus fermentum* ING8, a Potential Multifunctional Non-Starter Strain with Relevant Technological Properties and Antimicrobial Activity. *Foods*, 11(5), 703. doi:10.3390/foods11050703
- Pázmándi, M. (2020). *Savó permeátum enzimes és mikrobiológiai konverziója hozzáadott értéket képviselő termékek előállítására céljából*. Doktori értekezés. Budapest

- Pécs, M. (2012). *Fermentációs feldolgozási műveletek*. Budapest: Typotex Kiadó.
- Premi, L., Sandine, W. E., Elliker, P. R., & De Klerk, H. C. (1972). Lactose-Hydrolyzing Enzymes of *Lactobacillus* Species'. *Applied Microbiology*, 24(1), 51-57.
- Primo, E. D., Otero, L. H., Ruiz, F., Klinke, S., & Giordano, W. (2018). The disruptive effect of lysozyme on the bacterial cell wall explored by an in-silico structural outlook. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(1), 83-90. doi:10.1002/bmb.21092
- Rossi, F., Amadoro, C., & Colavita, G. (2019). Members of the lactobacillus genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: A review. *Microorganisms*, 7(5), 126.
- Ruiz-Ramírez, S., & Jiménez-Flores, R. (2023). Invited review: Properties of β -galactosidases derived from *Lactobacillaceae* species and their capacity for galacto-oligosaccharide production. *Journal of Dairy Science*, 106(12), 8193-8206. doi:10.3168/jds.2023-23392
- Salveti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 217-226. doi:10.1007/s12602-012-9117-8
- Sangwan, V., Tomar, S. K., Ali, B., Singh, R. R., & Singh, A. K. (2015). Production of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* for galactooligosaccharides synthesis. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4206-4215. doi:10.1007/s13197-014-1486-4
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Mata-Haro, V., Vallejo-Córdoba, B., Wall-Medrano, A., Astiazarán-García, H., Estrada-Montoya C. M., González-Córdova, A. F. (2018). Effect of milk fermented with *Lactobacillus fermentum* on the inflammatory response in mice. *Nutrients*, 10(8), 1039. doi:10.3390/nu10081039
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, 7(1), 79. doi:10.1007/s13205-017-0645-5
- Schär-Zammaretti, P., & Ubbink, J. (2003). The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophysical Journal*, 85(6), 4076-4092. doi:10.1016/S0006-3495(03)74820-6
- Sharma, S., & Singh, P. (2014). Isolation and Characterization of β -Galactosidase Enzyme Producing Microbe and Optimization of its Enzyme Activity under different culture

- condition Isolation and Characterization of β -Galactosidase Enzyme Producing Microbe and Optimization of its Enzyme. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(7), 148-155.
- Szekér, K. (2007). *Tejsavbaktériumok és élelmiszer-eredetű romlás- és kórokozó baktériumok versengő kölcsönhatásának vizsgálata*. Doktori értekezés. Budapest
- Malik, T. A. F., & Panuganti K. K. (2018). *Lactose Intolerance*. StatPearls.
- Tóth, B. (2019). *Tápközeg optimalás probiotikus Lactobacillus törzsek intracelluláris β -galaktozidáz termelésére*. OTDK. Budapest
- Üstök, F. I. (2007). *Production of β -galactosidase using lactic acid bacteria and optimisation of fermentation parameters*. Izmir: Izmir Institute of Technology.
- Üstün-Aytekin, Ö., Arisoy, S., Aytekin, A. Ö., & Yildiz, E. (2016). Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 163-171. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.09.010
- Venkateswarulu, T. C., Prabhakar, K. V., & Kumar, R. B. (2017). Optimization of nutritional components of medium by response surface methodology for enhanced production of lactase. *3 Biotech*, 7(202), 1-9. doi:10.1007/s13205-017-0805-7
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai X., Xie J., Wang Y., Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(612285), 1-19. doi:10.3389/fbioe.2021.612285
- Wattana, S., Kridsada, U., Hisashi, A., Kenji, Y., & Chartchai, K. (2012). Medium component improvement for β -galactosidase production by a probiotic strain *Lactobacillus fermentum* CM33. *African Journal of Biotechnology*, 11(51), 11242-11251. doi:10.5897/AJB11.3771
- Wright, A. (2005). Regulating the Safety of Probiotics - The European Approach. *Current Pharmaceutical Design*, 11(1), 17-23. doi:10.2174/1381612053382322

- Ya-Bing, C., Dao-Liang, L., Cheng, T., Xiao-nong, Y., & Jian, L. (2015). Effect of DNA Extraction Methods on the Apparent Structure. *Polish Journal of Microbiology*, 64(1), 29-36. doi:10.33073/pjm-2015-004
- Zalán, Z. (2008). *Tejsavbaktériumok szelektálása romlást okozó élesztők szaporodásának gátlására*. Doktori értekezés. Budapest
- Zhang, Y., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H., & Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2080-2091. doi:10.5897/AJB10.539
- Zhao, Y., Hong, K., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. *Journal of Functional Foods*, 56, 21-32. doi:10.1016/j.jff.2019.02.044
- Zhou, Q. Z., & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 33-40.
- Zhu, J., Sun, J., Tang, Y. J., Xie, J., & Wei, D. (2020). Expression, characterization and structural profile of a heterodimeric β -galactosidase from the novel strain *Lactobacillus curieae*. *Process Biochemistry*, 97, 87-95. doi:10.1016/j.procbio.2020.06.025

8. ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra: Különböző tejsavbaktériumokról pásztázó elektronmikroszkóppal készült képek (Kang et al., 2019). (A) <i>Lactocaseibacillus plantarum</i> MG4221; (B) <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MG4231; (C) <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MG4261; (D) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MG4270	5
2. ábra: Tejsavbaktériumok anyagcsere útvonalai (Kim et al., 2022). A: homofermentatív útvonal; B: heterofermentatív útvonal. P: foszfát; ADP: adenzin 5'-difoszfát; ATP: adenzin 5'-trifoszfát; NAD ⁺ : nikotinamid adenin dinukleotid (oxidált forma); NADH: nikotinamid adenin dinukleotid (redukált forma); E1: laktát-dehidrogenáz; E2: alkohol-dehidrogenáz	7
3. ábra: <i>L. lactis</i> peptidoglikánjának sematikus felépítése (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014). A peptidoglikán szerkezetének lehetséges módosításai, mint az O-acetilzés (O-Ac), N-deacetilzés, amidálás (NH ₂), piros színnel jelölve. A különböző PG hidrolázok hasítási helyeit a nyilak jelölik	9
4. ábra: <i>Escherichia coli</i> eredetű β-galaktozidáz térbeli szerkezete (Matthews, 2005).....	14
5. ábra: Laktóz hidrolízise β-galaktozidáz enzim által (Zhou & Chen, 2001).....	15
6. ábra: Sejtfeltárási módszerek csoportosítása (Pécs, 2012).....	17
7. ábra: <i>Bifidobaktérium</i> törzsek optikai sűrűsége (OD) 450 μg/ml CTAB oldat koncentrációjának növelésével (Orban & Patterson, 2000). <i>B. bifidum</i> ♦, <i>B. adolescentis</i> 15704 ■, <i>B. breve</i> ▲, <i>B. adolescentis</i> 15703 ×, <i>B. infantis</i> *, <i>B. longum</i> ●, <i>Lactocaseibacillus casei</i> 4646 ○.....	19
8. ábra Para-nitrofenol mennyiségi meghatározására szolgáló kalibrációs egyenes	25
9. ábra: Központi elrendezésű kísérlettervezés pontjai kétdimenziós koordináta rendszerben	26
10. ábra: French Press után mért enzimaktivitások a sejttörmelékes szuszpenzióban és felülúszóban	30
11. ábra: Különböző sejttörmelék:CTAB arányú sejtfeltárási utáni β-galaktozidáz aktivitások a sejttörmelékes szuszpenzióban	32
12. ábra: Különböző sejttörmelék:CTAB arányú sejtfeltárási utáni β-galaktozidáz aktivitások a felülúszóban	32
13. ábra: Különböző lizozim koncentrációknál mért a β-galaktozidáz enzimaktivitások	34
14. ábra: Kontúr diagram az enzimaktivitás alakulásáról [x tengely: lizozim koncentráció (mg/ml); y tengely: inkubációs idő (perc)]	38

15. ábra: **Enzimaktivitás standardizált hatásainak elemzése (A: koncentráció; B: inkubációs idő)**.....39

9. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat: Különböző <i>Lactobacillus</i> fajok előfordulása és élelmiszeripari felhasználása (Rossi et al., 2019).....	8
2. táblázat: Különböző mikroorganizmus fajok enzimtermelési tulajdonságai, optimális körülményei (Mlichova & Rosenberg, 2006)	12
3. táblázat: 2% laktózt tartalmazó MRS tápközeg összetétele	21
4. táblázat: 4% laktózt tartalmazó MRS tápközeg összetétele	22
5. táblázat: Enzimaktivitás mérés reakcióelegyeinek és vak mintáinak összetétele	24
6. táblázat: Kísérlet elrendezési szintjei	27
7. táblázat: Kombinált sejtfeltárási módszerek β-galaktozidáz enzim kinyerésére	35
8. táblázat: Központi elrendezésű kísérlet mérési beállításai	37
9. táblázat: Varianciaanalízis eredményei	39

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni belső konzulensemnek, dr. Bujna Erikának, hogy lehetőséget adott a kutatócsoport munkájában való részvételre. Bármilyen problémával, kérdéssel fordultam hozzá, mindig segítőkész és türelmes volt. Köszönöm Kristijan Hristovskinak, hogy minden kérdésemre válaszolt, hasznos tanácsaival segítette a laboratóriumi munkámat, diplomadolgozatom elkészülését.

Köszönet illeti Kovács Zoltánt, aki segített a diplomamunka témám megtalálásában.

Hálás vagyok családomnak, amiért tanulmányaim során is támogattak.

NYILATKOZAT

diplomadolgozat

A hallgató neve: Csányi Boglárka
A Hallgató Neptun kódja: RFDA20
A dolgozat címe: Különböző sejtfeltárási módszerek alkalmazása *Limosilactobacillus fermentum* LF08 intracelluláris β -galaktozidáz enzim kinyerésének optimalására
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológia Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

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

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

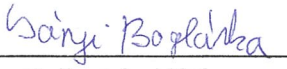
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

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

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

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2024.04.15.


Hallgató aláírása

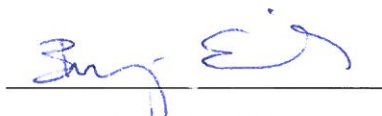
NYILATKOZAT

Csányi Boglárka (Neptun kód: RFDA20) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

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

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen **nem**

Kelt: Budapest, 2024.04.15.



Dr. Bujna Erika

belső konzulens