



**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**

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 eltelté 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 sejtörmelékes szuszpenzió (3,81 U/ml) és a felülúszó (2,14 U/ml) esetén is a legnagyobb  $\beta$ -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  $\beta$ -galaktozidáz aktivitását különböző lizozim koncentráció és inkubációs idő mellett. Megállapítottam, hogy az enzimaktivásra a 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  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásra.

A diplomamunkám fő célkitűzését elértem, ugyanis sikerült egy megbízható sejtfeltérési módszert kidolgozni a 2 órás 1:2 arányú CTAB feltéráással, majd az azt követő 2 órás 6 mg/ml-es lizozimes kezeléssel. Ugyanakkor a központi elrendezésű kísérlettervezés bizonyította, hogy az enzimaktivásra 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  $\beta$ -galaktozidáz kinyerésére, ami döntő szerepet játszhat későbbi enzimmtisztítási lépésekben.