

SZAKDOLGOZAT

Lévai Dániel György

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnöki alapképzési szak

**OLIGOSZACHARID SZINTÉZIS VIZSGÁLATA *L. FERMENTUM*
EREDETŰ BÉTA-GALAKTOZIDÁZ ENZIMMEL**

Belső konzulens:	Dr. Bujna Erika egyetemi docens Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi tanár
Belső konzulens intézete/tanszéke:	Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék
Készítette:	Lévai Dániel György

Budapest

2023

TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés.....	1
2	Kísérleti célkitűzés	2
3	Irodalmi áttekintés.....	3
3.1	Probiotikumok	3
3.2	Tejsavbaktériumok.....	5
3.2.1	Szénhidrát metabolizmus.....	6
3.2.2	<i>Lactobacillus</i> nemzetség.....	8
3.3	Prebiotikumok.....	9
3.4	Oligoszacharidok	10
3.4.1	Oligoszacharid szintézis	11
3.4.2	Galakto-oligoszacharidok.....	12
3.5	Béta-galaktozidáz enzim.....	13
4	Anyagok és módszerek.....	17
4.1	Anyagok.....	17
4.1.1	Alkalmazott törzs.....	17
4.1.2	Alkalmazott tápközegek	17
4.1.3	Alkalmazott pufferek.....	18
4.2	Módszerek.....	18
4.2.1	Törzsfenntartás.....	18
4.2.2	Enzimfermentáció.....	19
4.2.3	Sejtfeltárás	19
4.2.4	Béta-galaktozidáz enzimaktivitás mérési módszer	19
4.2.5	Biokonverziós eljárások.....	20
4.2.6	HPLC vizsgálat	21
4.2.7	Vékonyréteg-kromatográfia	21
5	Kísérleti eredmények és értékelésük	23
5.1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> LF08 törzs β -galaktozidáz termelése	23
5.2	<i>L. fermentum</i> LF08 törzs β -galaktozidázzal történő oligoszacharid szintézisének kimutatása	24
5.2.1	Különböző szubsztrátumok hatása az oligoszacharid szintézisre	24
5.2.2	Különböző koncentrációjú laktóz oldatok hatása az oligoszacharid szintézisre	24

5.2.3	Különböző koncentrációjú szacharóz oldatok hatása az oligoszacharid szintézisre	29
5.2.4	A hőmérséklet hatása az oligoszacharid szintézisre.....	31
6	Összefoglalás.....	33

1 BEVEZETÉS

A tejsavbaktériumok olyan prokarióta mikroorganizmusok, melyeket az emberiség évezredek óta felhasznál élelmiszer fermentáció céljából. Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) GRAS státuszt is adott ezeknek a mikroorganizmusoknak, vagyis az élelmiszeripari felhasználásuk veszélytelen. Kiemelkedő mikroorganizmus csoport, mely β -galaktozidáz enzimaktivitással is rendelkezik.

A legkiemelkedőbb β -galaktozidáz enzim termelő baktérium csoport a *Lactobacillus* nemzetség, melyek számos biotechnológia eljárásban jelentős szereppel bír. Ilyen eljárás lehet a laktóz hidrolízise, mellyel a laktóz intoleranciában szenvedők tünetei enyhíthetőek, hiszen képes elbontani a laktózt glükózzá és galaktózzá, illetve a laktóz alapú enzimes biokonverzió, amely során előállíthatók oligoszacharidok is. A szénhidrátokat, vagy tudományos nevükön szacharidokat négy nagy csoportba oszthatjuk be a molekulaméret, valamint a polimerizáltság alapján, ezek a monoszacharidok, diszacharidok, oligoszacharidok és a poliszacharidok. Közülük az oligoszacharidokat kedvező fiziko-kémiai, fiziológiai és technológiai tulajdonságaik miatt az élelmiszeriparban széleskörűen alkalmazzák.

A β -galaktozidáz enzim megfelelő körülmények között hidroláz aktivitás mellett transzgalaktozidáz aktivitással is rendelkezhet, így szintetizálja a prebiotikus hatású galakto-oligoszacharidokat (GOS). A prebiotikumok olyan élelmiszerösszetevők, amelyeket a gyomor-bélrendszer felső szakaszában található emésztőenzimek nem képesek lebontani, így változatlan formában jutnak el a vastagbélig, ahol elősegítik a kedvező hatású baktériumok, vagyis a probiotikumok aktivitását, szaporodását. A probiotikumok egészségügyi előnyökkel járnak a gazdaszervet számára, például gátolják a kórokozó mikroorganizmusok megtelepedését, szaporodását, valamint megerősítik a szervezet védekező mechanizmusát, az immunrendszert.

A fent leírtak motiváltak arra, hogy kutatási témámnak válasszam egy probiotikus hatású *Lactobacillus* β -galaktozidáz enzimtermelésének vizsgálatát, valamint a képződött enzimmel történő oligoszacharidok előállítását.

2 KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉS

A tejsavbaktériumok, azokon belül a *Lactobacillus* nemzetség egyes törzsei probiotikus képességgel rendelkeznek, továbbá képesek a β -galaktozidáz enzim előállítására, melynek tulajdonságait hasznosítani tudják a különféle iparágak.

Az élelmiszeripar a β -galaktozidáz hidrolitikus aktivitását használja fel arra, hogy a tejtermékek laktóztartalmát csökkentse, vagyis lebontsák a tejben jelenlévő laktózt, ezáltal az intoleranciában szenvedőket támogatják. Más iparágak, mint például a gyógyszeripar az enzim transzglükóziláz aktivitását hasznosítja, mely során a β -galaktozidáz olyan oligoszacharidokat szintetizál, melyeket a probiotikus tulajdonságaik miatt előszeretettel alkalmaznak. A prebiotikumok emészthetetlen élelmiszer-összetevők, melyek javítják a szervezet immunitását, segítik az ásványi anyagok felszívódását, valamint támogatják a jótékony baktériumok szaporodását és aktivitását.

Ezen gondolatok alapján választottam célnak a probiotikus tulajdonságú, *Limosilactobacillus fermentum* LF08 β -galaktozidáz enzim termelésének vizsgálatát, valamint az enzimmel történő oligoszacharidok szintézisének tanulmányozását különböző módszerekkel.

Céljaim megvalósításához az alábbi részfeladatokat terveztem elvégezni:

- *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs β -galaktozidáz enzim termelésének vizsgálata laktóz és glükóz-galaktóz tartalmú tápközegen
- Különböző szubsztrátumok hatásának vizsgálata a β -galaktozidáz enzim oligoszacharid szintézisére
- Szubsztrátum koncentráció hatásának vizsgálata a β -galaktozidáz enzim oligoszacharid szintézisére
- Hőmérsékletek hatásának vizsgálata β -galaktozidáz enzimmel történő biokonverzió során

Méréseimet a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszékén hajtottam végre.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Probiotikumok

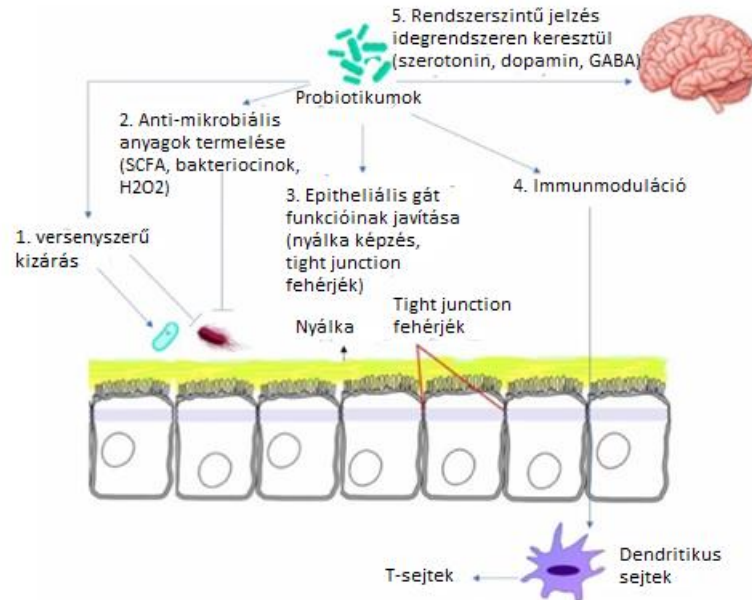
A „probiotikumok” kifejezés, olyan mikroorganizmusokra utal, amelyeket megfelelő mennyiségben fogyasztva egészségügyi előnyökkel járnak a gazdaszervezetek számára (Plaza-Diaz & munkatársai, 2019).

A probiotikum kifejezést, mely a görög nyelvből származik, és amelynek jelentése „az életért”, Lilly és Stillwell használta először 1965-ben. Munkájukban egy olyan mikroorganizmus által kiválasztott anyagot írtak le, mely egy másik mikroorganizmus növekedését serkenti, így szembeállították ezt az antibiotikum kifejezéssel. Ennek a definíciónak volt köszönhető, hogy ez a kifejezés nem sokkal később általánosabb jelentést kapott. 1971-ben Sperti használta a probiotikum kifejezést olyan szövetkivonatokra, melyek mikrobiális növekedés serkentő hatással rendelkeztek. A mai értelemben vett probiotikumot, mint kifejezést legelőször Parker alkalmazta olyan mikroorganizmusokra és anyagokra, amelyek a bélrendszer mikrobiális egyensúlyáért felelnek. Ezen állítást Fuller fejlesztette tovább, 1989-ben „élő mikrobiális takarmány-kiegészítő”-nek nevezve a probiotikumokat, melyek javítják a bélrendszer egyensúlyát. A definíciót tovább bővítette Havenaar három évvel később, s a gazdaszervezet, valamint a mikroflóra lelőhely szempontjából a probiotikumokat olyan életképes mikroorganizmusok mono- vagy vegyes kultúrájának nevezte, melyek azáltal, hogy javítják az őshonos mikroflórát, jótékony hatással vannak a gazdaszervezetekre az alkalmazásukkor. Salminen és Schaafsma tovább fejlesztették a fogalmat azáltal, hogy már nemcsak a bélmikrobiótára, hanem a gazdaszervezet egészére vonatkoztatták a a probiotikum jótékony hatásait. A mai értelemben vett „*probiotikum*” kifejezéshez legközelebb Havenaar és Huis In't Veld állt: életképes és elegendő számú mikróbát tartalmazó készítményként definiálva, mely a gazdaszervezet bélmikroflóráját úgy alakítja át, hogy jótékony hatást fejtsen ki rá (Schrezenmeir & de Verse, 2001).

Ahhoz, hogy valamely készítmény probiotikumnak minősüljön, meg kell felelnie néhány kritériumnak: a probiotikumoknak mentesnek kell lenniük a patogénitási és toxicitási faktoroktól, valamint azoktól a vektoroktól, melyek képesek az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia szállítására. Túl kell élniük az emésztőrendszerben uralkodó körülményeket (erősen savas pH érték, epesók, enzimek stb.), antagonista viselkedést kell mutatniuk a kórokozókkal szemben, stimulálniuk kell ellenük az immunrendszert, valamint a gazdaszervezetre jótékony hatást kell kifejteniük (Plaza-Diaz & munkatársai, 2019).

Hatásmechanizmus

A probiotikumok olyan mikroorganizmusok (leggyakrabban baktériumok), amelyek különféle mechanizmusokkal képesek kedvező hatást kifejteni a bélmikrobiótára, valamint az egész szervezet egészségére. Ezeket a mechanizmusokat az **1. ábra** mutatja be.



1. ábra: A probiotikumok hatásmechanizmusa (Latif & munkatársai, 2023) nyomán

Az **1. ábra** értelmezése:

- A probiotikumok versengenek a kórokozókcal a tápanyagokért, valamint versengenek a kötődésért felelős receptorokért is, melyekkel a bélnyálkahártyán képesek megtapadni.
- Antimikrobiális anyagokat termelnek (rövid láncú zsírsavakat, szerves savakat, hidrogén-peroxidot (H_2O_2), valamint bakteriocint) a kórokozók növekedésének gátlására.
- A probiotikumok fokozzák a bélnyálkahártya nyálkatermelését, ezzel megakadályozzák, hogy megtelepedjenek a kórokozók, valamint a tight junction fehérjék expresszióját, így a kórokozók nem képesek átjutni a bélből a vérbe.
- Szabályozzák a gazdaszervezet immunitását az immunsejtek (dendritikus sejtek és T-sejtek) aktivitásának növelésével.
- Neurotranszmitterekként is képesek viselkedni azáltal, hogy a szerotonin és a dopamin termelést szabályozzák.

3.2 Tejsavbaktériumok

A tejsavbaktériumok (Lactic Acid Bacteria, LAB,) Gram-pozitív, nem spóráképző baktériumok, melyek *coccus* (gömb) vagy *bacillus* (pálca) alakúak lehetnek, esetleg *coccobacillus*-ok. Mivel alapvetően aerotoleráns anaerob életmódot folytatnak, vagyis oxigén jelenlétében is képesek növekedni, így erjesztésre képesek. Elsősorban glükózt, mint szénhidrátot fermentálnak tejsavvá (Todar, 2020).

A LAB-ok természetes módon előfordulhatnak talajban, vízben, trágyában, valamint az élőlényekben is. Élőlényekben történő megjelenésüket főleg az emberek és az állatok nyálkahártyáin való megtelepedésként érthetjük, így a belek, a szájníylás, a bőr és a nemi szervek mikrobióta részét képezik, s ezáltal jótékony hatást fejtenek ki az ott lévő ökoszisztémákra (Harzallah & Belhadj, 2013).

Felhasználásukat tekintve a tejsavbaktériumok segítségével előállíthatóak fermentált élelmiszerek, például húsok, zöldségek, italok és tejtermékek. Ezek a tejsavbaktériumok GRAS státusszal rendelkeznek, vagyis ártalmatlanok a fogyasztóra nézve. Amióta felfedezték pozitív tulajdonságaikat, azóta jelentősen megnőtt a használatuk a különböző élelmiszer-tartósítási eljárásokban, főleg a biotartósításban. Ezenkívül a LAB-okat előszeretettel alkalmazzák starterkultúráként is a fermentációs folyamatok (élelmiszer- és takarmányfermentáció) során, továbbá van néhány olyan tejsavbaktérium törzs, melyek hivatalosan is megkapta a gyógyszerészeti készítmény státuszt (Harzallah & Belhadj, 2013).

Annak ellenére, hogy tejsavat rengeteg baktérium nemzetség termel, mint fő vagy másodlagos erjedési végtermék, a „tejsavbaktérium” kifejezés alapvetően a *Lactobacillales* rendbe tartozó nemzetségekre korlátozódik. Ide tartoznak a *Lactobacillus*, a *Leuconostoc*, a *Pediococcus*, a *Lactococcus* és a *Streptococcus*, valamint a *Carnobacterium*, az *Enterococcus*, az *Oenococcus* és a *Tetragenococcus* nemzetségek (Todar, 2020). Az **1. táblázat** összefoglalja a leggyakoribb probiotikumként alkalmazott mikroorganizmusokat. A *Lactobacillus*-ok és a *Bifidobacterium*-ok mellett a *Bacillus subtilis*, az *E. coli* vagy az *E. faecalis* bizonyos törzsei is probiotikumok, továbbá ide sorolhatók a *Saccharomyces boulardii* élesztőgomba is.

1. táblázat: Probiotikumként alkalmazott organizmusok (Furrie, 2005) nyomán

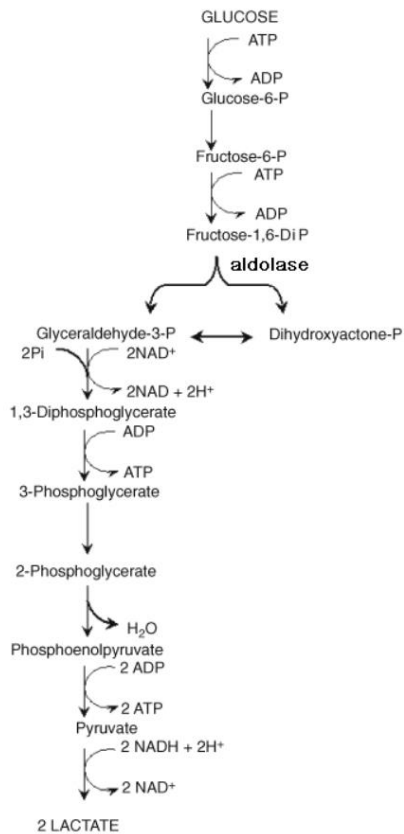
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Egyéb fajok</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. breve</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Leucnostoc mesenteroides</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. rhamosus</i>		<i>Streptococcus thermophilis</i>

3.2.1 Szénhidrát metabolizmus

A tejsavbaktériumok lebontó anyagcseréjének legfontosabb jellemzője, hogy képesek a különböző szénhidrátok fermentálására, mely szorosan össze van kapcsolva a szubsztrát-szintű foszforiláció folyamatával. A metabolizáció során képződő ATP-t (adenozin-trifoszfátot) a későbbiekben bioszintézisre használják fel a baktériumok. Bár a fermentáció végterméke általában tejsav, a LAB-ok alkalmazkodnak a környezetükhöz, és ezáltal eltérőek lehetnek az anyagcseretermékek.

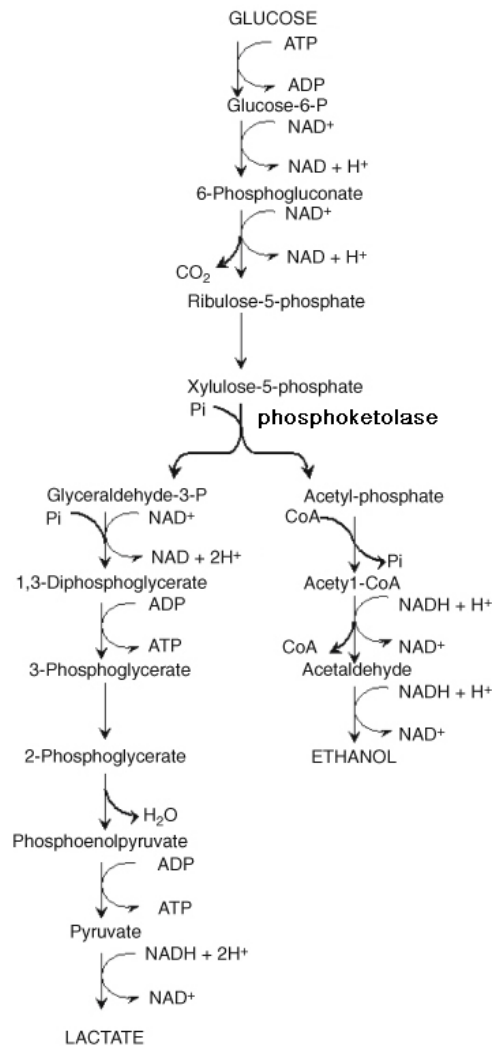
A LAB-ok szénhidrát metabolizmusának alapvetően két típusa van: homofermentatív és heterofermentatív.

Az első típus, vagyis a homofermentatív lebontás során – melyet a **2. ábra** mutat be –, a mikroorganizmusok az Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) útvonalat használják a glükóz metabolizálására. Ezen útvonalon 1 mól glükózból 2 mól piruvát képződik. A keletkezett piruvátból oxidáció során NAD jön létre, mely fenntartja az intracelluláris redox egyensúlyt. Végtermékként alapvetően tejsav képződik, azonban mellette NAD is keletkezik. Ezen folyamat során minden lebontott glükóz molekulából 2 mól ATP-t keletkezik. A leggyakoribb homofermentatív tejsavbaktériumok a *Lactobacillus*, a *Lactococcus*, az *Enterococcus*, a *Streptococcus*, valamint a *Pediococcus* fajok (Todar, 2020).



2. ábra: A homolaktikus erjedés útja a tejsavbaktériumokban (Todar, 2020)

A másik típus a heterofermentatív fermentáció, amely a pentóz-foszfát útvonalat követi a szénhidrátok lebontásához. Ezt a **3. ábra** mutatja be. A folyamat kezdetekor a glükóz-6-foszfát dehidrogenizálódik, így 6-foszfoglükonát keletkezik. A következő lépésben a 6-foszfoglükonát dekarboxileződik, mely során 1 mól CO_2 , valamint pentóz-5-foszfát is keletkezik, melyet a foszfoketoláz enzim kettéhasít. A bontás eredménye 1 mól gliceraldehyd-foszfát (GAP) és 1 mól acetyl-foszfát. A GAP a homofermentatív fermentáció folyamatának megfelelően bomlik tovább, míg végül tejsavat nem kapunk végtermékként, ezzel szemben az acetyl-foszfát az acetyl-CoA és az acetaldehyd köztitermékeken át etanollá alakul. A heterofermentatív LAB-ok közé tartozik a *Leuconostoc*, az *Oenococcus*, a *Weissella*, valamint néhány *Lactobacillus* is (Todar, 2020).



3. ábra: A heterolaktikus erjedés útja a tejsavbaktériumokban (Todar, 2020)

3.2.2 *Lactobacillus* nemzetség

A *Lactobacillus* nemzetség taxonómiaiilag a *Firmicutes* törzsbe, a *Bacillus*-ok osztályába, a *Lactobacillales* rendjébe, valamint *Lactobacillaceae* családjába tartozik. A nemzetség ismert fajainak száma folyamatosan növekszik, jelenleg több mint 120 fajt foglal magában ezek közül a cikk megírásakor sikerült valamivel több, mint 20 fajt szekvenálniuk a kutatóknak (Wells, 2011). A *Lactobacillus* egy igen változatos nemzetség, amely sokféle fajt foglal magában mind fenotípus tekintetében, mind biokémiai és fiziológiai tulajdonságok tekintetében. Bár a többségük a homofermentatív fajok közé tartozik, akadnak heterofermentatív fajok is (Todar, 2020).

A nemzetség tagjai igen nagy energiaigényűek, melyet szénhidrátok, mint energiaforrás hasznosításával, vagyis erjesztésével tudnak kielégíteni. Akár aerob, akár anaerob körülmények között képesek az erjesztésre, hiszen aerotoleráns baktériumok. Az erjesztés

eredménye maga a tejsav. Hogy életképesek tudjanak maradni, valamint, hogy képesek legyenek tovább szaporodni a tápanyagigényüknek megfelelő tápanyagokat kell elfogyasztaniuk. Ezek bizonyos aminosavak, vitaminok és nukleotidok. Ebből következően minimál táptalajon, amely nem tartalmaz mást csak glükózt és különféle szerves sókat nem képesek szaporodni (Deák & munkatársai, 2006).

Hogy ezen igényeket ki tudják elégíteni, olyan élőhelyre van szükségük, ahol ezek a komponensek elegendő mennyiségben előfordulnak. Ezzel szemben a nemzetség fellelhető sok különböző helyen, köztük a tejben, növények felületén, továbbá az emberi és állati bélrendszerben (Wells, 2011).

3.3 Prebiotikumok

A prebiotikumokra különféle definíciók léteznek a tudományos köztudatban, azonban a legjobban megfogalmazott definíció szerint a prebiotikumok, olyan nem-emészthető élelmiszer-összetevők, melyek szelektíven támogatják a jótékony baktériumok szaporodását és aktivitását a vastagbélben, ezáltal elősegítik az emberi szervezet egészségének megőrzését (Turati & munkatársai, 2023).

Hogy prebiotikumnak nevezhessünk egy adott anyagot, meg kell felelnie néhány kritériumnak:

- Ellen kell, hogy álljon a gyomorban uralkodó savas pH-jú környezetnek, valamint a belekben lévő epesóknak és hidrolizáló enzimeknek is.
- El kell jutnia a belekhez, vagyis nem szabad, hogy felszívódjon a felső gyomor-bél traktusban.
- Könnyen fermentálhatónak kell lennie a bél jótékony hatású mikroflórája által (Pandey & munkatársai, 2015)

Az emberi szervezetben a prebiotikumok különböző mechanizmusok révén fejtik ki a jótékony hatásukat, melyek a következők lehetnek:

- Növelhetik a rövid láncú zsírsavak kiválasztását, vagy megváltoztathatják az összetételüket
- Megnövelik a keletkező széklet tömegét, valamint kissé lecsökkentik a vastagbél pH-ját.
- A szénhidrát fermentáló baktériumok növekedését stimulálja azáltal, hogy a bélrendszer savas pH-ját tovább savanyítja, illetve modulálja a bélflórát.

- Csökkenti azon enzimek számát, amelyek a prokarcinogén anyagokból karcinogéneket állítanak elő, illetve a toxikus, mutagén, genotoxikus és más egyéb bakteriális metabolitok mennyiségét.
- Csökkenti a redukív enzimek, továbbá a nitrogén tartalmú végtermékek mennyiségét.
- Növeli a bélhám regenerálódását azáltal, hogy a vajsavtermelést fokozza.
- Fokozza az ásványi anyagok felszívódásához elengedhetetlen kötőfehérjék expresszióját.
- Fokozza az immunitást a mucin termelés modulálásával (Watson & Preedy, 2016.).

A prebiotikumok sok forrásból származhatnak, például az anyatejből, különféle gabonákból, mint a zab, búza, árpa, ezek a nem-emészthető oligoszacharidok. A legkiemelkedőbb emészthetetlen szénhidrát források az inulin hidrolízisének következtében kialakuló termékek, vagyis a frukto-oligoszacharidok (FOS), valamint a galakto-oligoszacharidok (GOS) (Pandey & munkatársai, 2015).

3.4 Oligoszacharidok

Az oligoszacharidok kis molekulatömegű polimerek, melyek alapvetően 2-20 monoszacharidból tevődnek össze, amelyeket glikozidkötések kapcsolnak egymáshoz.

Hatásmechanizmusukat tekintve két típusba sorolhatjuk őket: az általános oligoszacharidokba, illetve a funkcionális oligoszacharidokba (Liu & munkatársai, 2023). Az általános oligoszacharidok jellemzője, hogy a bélrendszerbe történő bekerülés után megemésztődnek, majd felszívódnak, ezzel biztosítva energiát a szervezet számára. Ide sorolhatjuk a szacharózt és a maltózt. A másik típus a funkcionális oligoszacharidok, melyek rendelkeznek különböző, hasznos biológiai funkcióval is. Ilyen például az a képesség, hogy javítják a szervezet immunitását, fenntartják a bélflóra szerkezeti homeosztázisát, segítik a bekerülő ásványi anyagok felszívódását, valamint lecsökkentik a belekben uralkodó pH értékét (Liu & munkatársai, 2023).

Hogy kihasználják a funkcionális oligoszacharidok jótékony hatású funkcióit, elkezdték őket alkalmazni takarmány-adalékanyagként is sok gazdaságban. Hatásukra javult az állatok teljesítménye, a betegségekkel szembeni ellenállása, a bélrendszerük egészsége, vagyis alapvetően lecsökkent a mortalitás az állatok közt. A funkcionális oligoszacharidok közé lehet sorolni a frukto-oligoszacharidokat (FOS), a galakto-oligoszacharidokat (GOS), a

szójaliszt oligoszacharidokat (SMO), valamint a mannán oligoszacharidokat (MOS) is (Patel, 2011.).

3.4.1 Oligoszacharid szintézis

Mivel a funkcionális oligoszacharidok utáni érdeklődés jelentősen megnőtt az utóbbi időben, mind az élelmiszer-, mind a takarmány-, mind a gyógyszeriparban, ezért elkerülhetlenné vált az ipari léptékben történő előállításuk. Az oligoszacharidok előállítására több fajta eljárást fejlesztettek ki, köztük a természetes forrásból történő kivonást, vagy a fizikai, kémiai, illetve enzimátikus módszerekkel történő szintézist. Azonban a leginkább alkalmazott technika a poliszacharidok hidrolízise, vagy a diszacharid szubsztrátumokból történő szintézis, melyet végrehajthatnak enzimátikusan vagy kémiai kezeléssel (Patel, 2011.).

A fizikai módszerrel történő oligoszacharid képzésre tökéletes példa Miyazawa és Funazukuri (2006) kísérlete, mely során guar gumit bontottak le hidrolitikusan, katalizátor nélkül, szakaszos reaktorban, így végeredménynek vízoldható mono- és oligoszacharidokat kaptak. A guar gumit egy természetesen képződő, mannózból és galaktózból álló heteropoliszacharid, melyet előszeretettel alkalmaznak különböző iparágakban -élelmiszeripar, gyógyszeripar, kozmetikai-, textil-, vagy papírgyártás- sűrítőként, stabilizátorként. A bomlás hidrotermikus körülmények mellett zajlott le 180 és 240°C közötti hőmérséklet tartományban, a reakcióidő pedig 3 és 60 perc közötti volt. A guar gumit alapvetően könnyen hidrolizálódott. A keletkező termékek főleg oligoszacharidok voltak, legnagyobb mennyiségben, 94,4%-ban a hetedik percben 200°C-on képződtek. Az oligoszacharidok hozama azonban a reakcióidő előrehaladtával csökkeni kezdett, és ennek megfelelően a monoszacharidok hozama indult növekedésnek. A 60. percben érték el a legnagyobb értéküket a 34,5%-ot, melynek 11,7%-a galaktóz és 22,8%-a mannóz volt.

A kémiai oligoszacharid szintézis módszereinek egyikére jó példa lehet Majumder és munkatársainak (2009) kísérlete, akik *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742 tejsavbaktérium alkalmazásával állítottak elő α -(1-6) kötésekből álló glükánt, amelyből miután mikrohullámú sütőbe helyezték és sósavval (HCl) hidrolizálták, végeredménynek glüko-oligoszacharidokat kaptak. Mikrohullámú sütőt már többször alkalmaztak laboratóriumi kísérletek során (ide kellenének hivatkozások, hogy kik használták), például számos kémiai manipulációban, növényi poliszacharidok metilálására, szerves és szervetlen szintézisekben stb., de ennél a kísérletnél a hidrolízis folyamatának felgyorsítására

használták. A glükánból előállított oligoszacharidok hozama 2,5%-os volt a hidrolízis második percében, mely igen gyors képződésnek minősül.

Enzimes technológiával valósítottak meg oligoszacharid szintézist Rabelo és munkatársai (2009). Kísérletükben kesudió almalevet használtak az oligoszacharid szintézis során, mint alternatív szubsztrátum, mely olcsó választásnak bizonyult. Eredményeik azt mutatták, hogy a kesudió almalé kitűnő forrása a redukáló cukroknak, illetve jól használható szubsztrátként *Leuconostoc citreum* B-742 baktériummal történő dextrán-szacharáz enzim előállítására. Az előállított enzim segítségével pedig oligoszacharidok szintetizálhatók. A dextrán-szacharáz alapvetően egy olyan enzim, mely a glükoziltranszferázok csoportjába tartozik, extracellulárisan termelődik a *Leuconostoc* nemzetség törzsei által, valamint a dextrán szintézist is segíti, ezenfelül a prebiotikus oligoszacharidok keletkezésében is részt vesz. Az enzim a termeltetésére kesudió almalé alapú tápközeget alkalmaztak, melybe élesztőkivonatot, ammónium-szulfátot, K_2HPO_4 -t, később foszfátoldatokat is (őket külön sterilizálták), valamint szacharózt raktak. Az utóbbi igen fontos, mivel magát az enzimet indukálni kell és az egyetlen ismert induktor a szacharóz. Az enzimfermentációt a kutatók orbitális rázógépből végezték el 100 ml táptalajokkal, 30 °C-on 150 rpm fordulatszámon. A keverést akkor állították le, amikor a tápközeg pH-ja a kiindulási 6,5-ről 5,5-re ért le, mivel a dextrán-szacharáz enzim képes denaturálódni a pH 5,0 alatti -értékeken. Az oligoszacharid szintézisére az erjesztett kesudió almalében jelenlévő nyers enzimet alkalmazták.

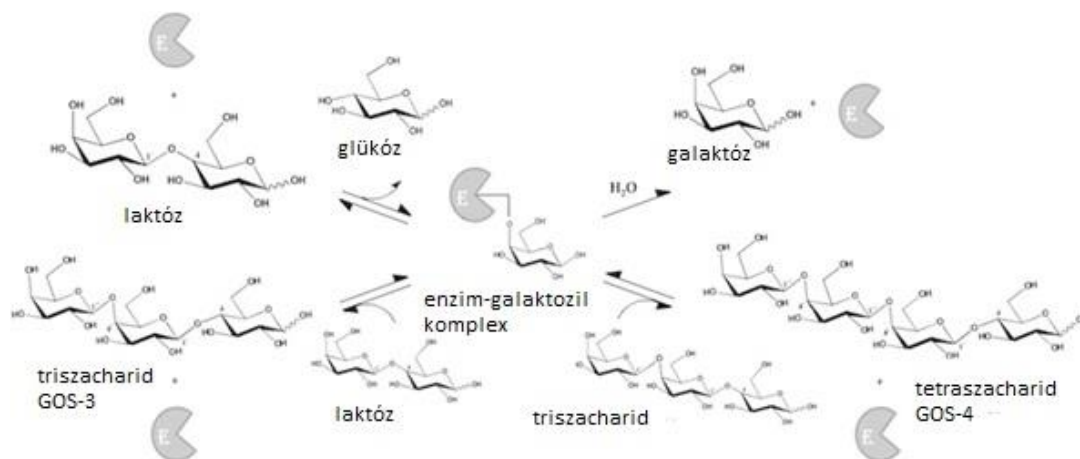
3.4.2 Galakto-oligoszacharidok

A galakto-oligoszacharidok (GOS) olyan prebiotikus hatású, funkcionális oligoszacharidok, melyek felépítésüket tekintve 2-10 galaktóz, illetve 1 terminális glükóz molekulából állnak (Macfarlane & munkatársai, 2008). A GOS-szintézis alapvetően egy olyan kinetikailag szabályozott reakció, amelynek mechanizmusa két egymást követő lépést foglal magában. Az első lépésben egy laktóz molekula, mint szubsztrátum kötődik a β -galaktozidáz enzim aktív helyéhez, és vele enzim-galaktozil komplexet képez. E lépés közben felszabadul egy molekula glükóz.

A második lépésben a keletkezett köztitermék reakcióba lép egy másik szubsztrátummal, amely lehet újból laktóz molekula vagy víz molekula is. Ha laktóz molekula, vagyis cukor molekula az akceptor, akkor a transzglykolízis folyamata zajlik le, amely során 2 galaktózból és 1 glükózból álló triszacharid (GOS-3) képződik, amely szintén képes akceptorként viselkedni az újonnan létrejövő enzim-galaktozil komplexnek, vele 3 galaktózból és 1 glükózból álló tetraszacharidot (GOS-4) képezve, és így tovább. A szintézis

gyakori célja, hogy minél nagyobb számú galaktózegységgel rendelkező galakto-oligoszacharid keletkezzen.

Azonban, ha víz molekula a reakció akceptora, akkor hidrolízis történik, vagyis az enzim-galaktozil komplex megszűnik, hisz galaktóz szabadul fel a folyamat során. Végeredménynek itt glükózt és galaktózt kaphatunk (Vera & munkatársai, 2016).

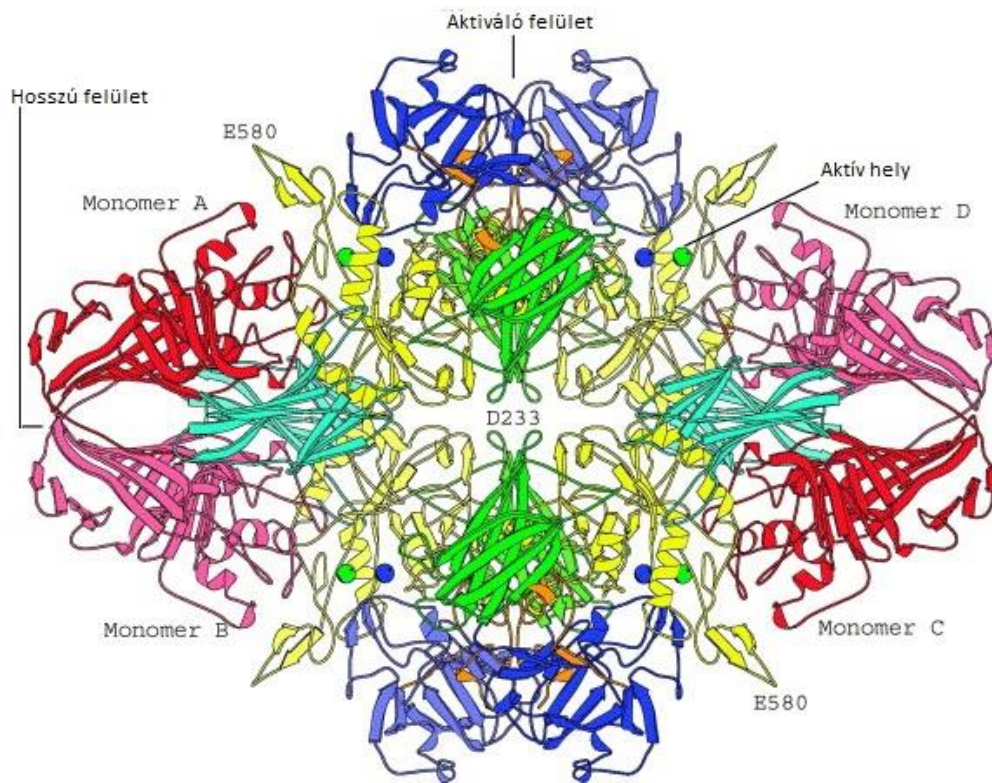


4. ábra: A GOS-szintézis mechanizmusának sematikus ábrázolása β -galaktozidázokkal történő transzgalaktoziláció révén (Vera & munkatársai, 2016) nyomán

3.5 Béta-galaktozidáz enzim

A β -galaktozidáz egy nagy csoportnak, a hidroláz enzimeknek a tagja, amelyekről ismert, hogy képesek a hidrolízis és a transzglykozilációs reakciókat is katalizálni. Míg a hidrolitikus aktivitásukat főleg a tejipar alkalmazza arra, hogy a tejtermékek laktóztartalmát csökkentsék, addig transzglykoziláz aktivitásuk GOS-szintézisre használható (Ruiz-Ramírez & Jiménez-Flores, 2023).

A β -galaktozidáz enzim egy olyan tetramer, mely négy polipeptidláncból épül fel. Ezen láncok mindegyike összesen 1023 aminosavból áll. A monomerek, vagyis a polipeptid láncok öt domént alakítottak ki magukból, amelyek segítik egymást abban, hogy aktív helyeket hozzanak létre. A gödör formájú aktív hely, a monomer különböző szegmenseiből áll össze. Például a harmadik domén szerkezeti sajátosságai (hurkok) az első és az ötödik domén segítségével készültek el, ott aktív helyet alakítottak ki így. A β -galaktozidáz szerkezetét az **5. ábra** mutatja be (Matthews, 2005).



5. ábra: A β -galaktozidáz tetramer szerkezete (Matthews, 2005) nyomán

Az eltérő színek különböző doméneket jelölnek: 1. domén = kék; 2. domén = zöld; 3. domén = citromsárga; 4. domén = cián kék; 5. domén = piros

A β -galaktozidázok különféle forrásokból származhatnak. Lehet mikrobiális, növényi és akár állati eredetű is, de az esetek nagy részében a mikroorganizmusokból (baktériumok, penészek, élesztők) származó enzimek jobb termelékenységet mutatnak. Ebből következően pedig nagyobb irántuk az érdeklődés is, mivel így költséghatékonyabbak, mint a más forrásból származó példányok. Természetesen a mikrobiális eredetű enzimek termelési és felhasználási körülményei is különbözőek, például a bakteriális forrásból származó enzim pH optimuma 2,5-5,4 közötti, míg az élesztőkből származó enzimeké 6,0-7,0 között található. A leggyakoribb β -galaktozidáz enzimet termelő mikroorganizmusokat és az optimális környezeti paramétereiket a **2. táblázat** mutatja be (Saqib & munkatársai, 2017).

A β -galaktozidáz enzimet különféle iparágakban hasznosítják, számos előnyös tulajdonsága miatt. Leginkább az élelmiszeripar alkalmazza, mivel az egyik legjelentősebb képessége, hogy a laktózt glükózzá és galaktózzá hidrolizálja. A tejtermékekben található laktóznak alapvető funkciója, hogy a vékonybélben megtelepedő, probiotikus hatású baktériumok növekedését serkenti.

2. táblázat: Mikrobiális β -galaktozidázok tulajdonságai (Saqib & munkatársai, 2017) nyomán

Mikroorganizmusok	Enzim termelődés helye	Hőmérséklet optimum (°C)	pH optimum
Baktériumok			
<i>Escherichia coli</i>	intracelluláris	40	7,2
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	intracelluláris	55	6,2
<i>Bacillus circulans</i>	intracelluláris	56	6,5
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	intracelluláris	56	6,0
Élesztők			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	intracelluláris	30-35	6,5-7,0
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	intracelluláris	30-35	6,0
Penészek			
<i>Aspergillus niger</i>	ismeretlen	55	3,5-4,5
<i>Aspergillus foetidus</i>	extracelluláris	66-67	3,5-4,0

Miután az emberek elfogyasztják a tejtermékeket, és így velük együtt a laktózt is, annak fel kell szívódnia, hogy hasznosulni tudjon a szervezetben belül, valamint, hogy ne alakuljon ki puffadás, hasmenés, illetve görcsök a túlzott emésztetlen laktóztól. A felszívódásban a laktáz enzim segítene, azonban a világ felnőtt lakosságának nagy része enzimhiányos, amelyet más néven laktóz intoleranciának hívnak. A betegségnek több típusa is létezik: elsődleges, másodlagos és veleszületett.

Az elsődleges típus kialakulására jellemző, hogy a vékonybél kefeszegélye mentén lecsökken a β -galaktozidáz enzim szintézise. A másodlagos típus akkor alakulhat ki, ha a gyomor-bél traktust már korábban érintette az alapbetegség. A veleszületett enzimhiány pedig egy genetikai rendellenesség hatására alakul ki.

Azonban, ha a tejtermékeket β -galaktozidáz enzimmel kezelik, vagyis előhidrolizálják őket, akkor lecsökkenthető bennük a laktózkoncentráció, így fogyaszthatóvá válik az intoleranciában szenvedőknek. Ennél a műveletnél a kutatók leginkább a bakteriális és a penész eredetű enzimeket alkalmazták (hivatkozás). Egy másik módszer, hogy ha az intoleráns személyek a tejtermékek elfogyasztását megelőzően β -galaktozidázt tartalmazó gyógyszereket vesznek be. Ezek a készítmények penész eredetű enzimet tartalmaznak.

Ezeken felül az enzimet alkalmazhatják más területeken is az élelmiszeriparban, például a nagy laktózkoncentráció hatására bekövetkező kikristályosodás csökkentésére is, mely főleg a jégkrémek esetén probléma (Saqib & munkatársai, 2017).

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

4.1.1 Alkalmazott törzs

A kutatásaimhoz a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 probiotikus törzset használtam fel, amely a Probiotical S.p.A. cégtől került beszerzésre.

4.1.2 Alkalmazott tápközegek

MRS tápközeg

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

A tápoldatot autoklávba helyeztem 121 °C-on 15 percre sterilizálás céljából.

4% laktóztartalmú MRS tápközeg

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

1% glükóz és 1% galaktóz tartalmú MRS tápközeg receptúrája

Glükóz	10 g
Galaktóz	10 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

4.1.3 Alkalmazott pufferek

Sorensen puffer (pH=6,5)

A kívánt pH értékű elegy elkészítéséhez 313 ml 9,078 g/liter KH_2PO_4 és 687 ml 11,876 g/liter $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oldatokat mértem össze.

McIlvaine puffer (pH=6,5)

Az elegy 272 ml 21,008 g/liter 0,1 M citromsav oldat és 728 ml 35,63 g/liter 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oldatok összemérésével készül.

4.2 Módszerek

4.2.1 Törzsfenntartás

A *Lactobacillus* törzs fenntartása céljából glükóz tartalmú MRS tápoldatot készítettem, melyet 10 ml térfogatonként kémcsövekbe pipettáztam és sterilizáltam.

A baktérium tenyészetből (*Limosilactobacillus fermentum* LF08) 0,5 ml-t oltottam át a 10 ml steril tápközegbe, melyet 24 órával később megismételtem. A törzsek tenyésztése 37 °C-on történt. Az enzimfermentációt megelőzően a baktérium átoltása 2% laktóz tartalmú MRS tápközegbe történt.

4.2.2 Enzimfermentáció

A fermentáció folyamatához a korábban előkészített, megfelelő összetételű MRS tápközegeket (600 ml 4% laktóz tartalmú tápközege, valamint 600 ml 1% glükóz - 1% galaktóz tartalmú tápközege) 1000 ml térfogatú lombikokban alkalmaztam, melyeket autoklávba helyeztem 15 percre, 121 °C-on, sterilizálás céljából. Ezt követően a felszaporított mikroba tenyészetből 5 % mennyiséget pipettáztam át a különböző szénhidrát tartalmú tápközegekbe. A fermentáció folyamata 37 °C-on, 16 órán át zajlott, majd összegyűjtöttem a sejteket.

4.2.3 Sejtfeltárás

A 16 órás fermentáció után a kétfajta tápközegekben felszaporított sejteket centrifugáltattam 10 000 rpm-es fordulatszámon, 4°C-on, 10 percen át. A centrifugálást azért végeztem el, hogy a fermentlevet és a biomasszát szétválasszam egymástól. A műveletet háromszor ismételttem meg, mindig Sorensen pufferrel (pH=6,5) történő mosást követően.

Miután végeztem a minták háromszor történő átmosásával, valamint kellő arányban sikerült elválasztani a két fázist egymástól, a sejtfeltárás műveletét hajtottam végre. Eszközüül a French Press nagynyomású homogenizátort használtam, mely a sejtfeltárás módszerein belül a mechanikai módszerek közé sorolható, azon belül is, amikor a nyírás a folyadék fázisban történik. A készülék működése azon alapszik, hogy egy dugattyú a berendezésbe beletöltött sejtuszpenziót (2 ml térfogatot) átnyomja egy furaton, vagyis egy fojtáson (homogenizáló szelep), majd a szuszpenzió ekkor nekiütődik egy fém felületnek (ütköző lemez). A szuszpenzió magas, 800 Psi nyomással nyomódik át a szelepen.

Egyszeri sejtfeltárást hajtottam végre, hogy az intracelluláris enzimet kinyerjem a sejtekből.

4.2.4 Béta-galaktozidáz enzimaktivitás mérési módszer

Az intracelluláris β -galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározása azon az elven alapszik, hogy az enzim felhasítja a p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrátum β -D kötéseit, és így p-nitrofenol vegyületet szabadít fel, melynek mennyisége spektrofotometriás mérésel meghatározható lesz. A művelethez szükséges oldatokat a **3. táblázat** alapján mértem össze.

3. táblázat: Enzimaktivitás méréséhez felhasznált reakcióelegyek és vakoldatok összetétele

	McIlvaine puffer (ml)	Desztillált víz (ml)	Szubsztrátum (ml)	Enzim oldat (ml)
Műszervak	0,3	0,7	-	-
Szubsztrátumvak	0,3	0,2	0,5	-
Enzimvak	0,3	0,5	-	0,2
Reakcióelegy	0,3	-	0,5	0,2

Az elkészült elegyeket először 5 percre 37 °C-os vízfürdőbe tettem. A megfelelő hőmérséklet elérését követően 50-szeres hígítású 0,2 ml térfogat enzimet tartalmazó mintával indítottam el a reakciót. A reakcióidő 5 perc volt, majd ezt követően 5 ml 0,1 M Na₂CO₃ oldat hozzáadásával állítottam le az enzimreakciót. A következő lépésben a műszervakra nullázott spektrofotométerrel végeztem el a reakcióelegyek abszorbanciájának meghatározását, melyet 405 nm-en mértem. Az enzimaktivitást a következő képlettel lehet kiszámolni:

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

Ahol:

A_{minta} = a reakcióelegy abszorbancia értéke

A_{EV} = az enzimvak oldat abszorbancia értéke

A_{SV} = a szubsztrátumvak oldat abszorbancia értéke

h = az enzim oldat hígítása

V_r = a reakció térfogat [ml]

V_m = a bemért enzim oldat térfogata [ml]

t = a reakció idő [perc]

2,559 – kalibrációs egyenes meredeksége

4.2.5 Biokonverziós eljárások

Szubsztrátumként 30 g/100ml koncentrációjú laktóz, laktulóz, maltóz és szacharóz oldatokat készítettem Sorensen puffer (pH=6,5) felhasználásával, amelyekből kémcsőbe mértem ki 1,5 ml mennyiségeket és 40°C-os vízfürdőbe helyeztem. A reakció elindítása céljából mind a glükóz-galaktóz tartalmú közegen termelt enzimmészítményből, mind a

laktóz tartalmú közegen termelt enzimkészítményből 0,01 U/ml mennyiségeket alkalmaztam. A biokonverzió hét napig tartott, amely során meghatározott időközönkénti mintavételezés történt (200 µl). A kivett mintákat 10 percig forraltam a reakció leállítására céljából, majd húszszoros hígítást végeztem rajtuk 0,22 µm membránnal szűrt HPLC víz felhasználásával. Végül újra centrifugáltam a mintákat, majd 200 µl mennyiséget pipettáztam át HPLC csövekbe.

A biokonverzió során képződő termékek kimutatása HPLC módszerrel és vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálattal történt.

A további biokonverziókhoz 1,5 ml térfogatban 20, 30, 40, 50 g/100 ml laktóz ill. 20, 30, 40, 50 g/100 ml szacharóz tartalmú oldatokat készítettem és 40°C-on 0,01 U/ml enzimoldattal indítottam a reakciókat.

4.2.6 HPLC vizsgálat

A méréseim során, a biokonverziós folyamatok elvégzésekor kapott termékek minőségi, valamint mennyiségi azonosítása a Thermo Scientific Corporation Surveyor HPLC berendezés segítségével történt, a következő anyagok és paraméterek alkalmazásával:

- kromatográfiás oszlop: Aminex HPX-Ca oszlop
- elválasztó eluens: desztillált víz
- injektált minta mennyisége: 15 µl
- áramlási sebesség: 0,6 ml/perc
- futtatási idő: 25 perc
- oszlop hőmérséklete: 85 °C
- detektor hőmérséklete: 45 °C

A vizsgálathoz a mintákat húszszorosan hígítottam.

4.2.7 Vékonyréteg-kromatográfia

A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok (TLC = Thin-layer chromatography) során a biokonverziós vizsgálatok alatt (a különböző napokon) kapott oldatok oligoszacharid tartalmát értékeltem ki.

Ezekhez a vizsgálatokhoz standard oldatokat készítettem, melyek 0,1g/100ml koncentrációban tartalmaztak galaktózt, glükózt, laktózt, valamint szacharózt.

Állófázisnak egy „silica gél 60” -nal fedett, 20 x 20 cm-es és 0,2 mm vastag alumínium lemezt használtam, mozgófázisnak pedig kloroform: ecetsav : desztillált víz 30:35:5 arányú oldószerkeletet használtam fel, mint puffer oldat. Miután az állófázisra cseppentettem 1-1

μ l mennyiséget a minta oldataimból és a standard oldatokból, belehelyeztem a lemezeket a pufferbe, melyben 120 percet töltöttek. A futtatási idő alatt az oldószer beszívódott a lemezbe, majd a kapilláris erők hatásainak következtében felfele irányba kezdett áramlani, egyenletesen. Az eredmény láthatósága végett festékanyaggal színeztem meg a lemezt, amely kizárólag a kívánt szénhidrát komponensekkel képez színes terméket. Ez a festékanyag 94,7 V/V%-os metanol, 5 V/V%-os tömény kénsav (H_2SO_4) és 3g/1000ml N-(1-naftil)-etilán-diamin-hidroklorid tartalmú keverék volt. Ezután 10 percre $100^\circ C$ -os szárítókamrába helyeztem a lemezt. A vizsgálat végén a kapott eredményeket a retenciósfaktor (R_f) segítségével azonosítottam be, melyet a minta oldatok és az oldószer által megtett utak hányadosával lehet kiszámolni.

$$R_f = \frac{\text{minta vándorlási távolsága [cm]}}{\text{oldószerfront távolsága [cm]}}$$

5 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs β -galaktozidáz termelése

Méréseim során a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs által termelt β -galaktozidáz enzimmel történő oligoszacharidok szintézisét terveztem vizsgálni, melyhez első lépésként az enzimfermentációt valósítottam meg. Szabó (2023) az 1%-1% glükóz és galaktóz tartalmú MRS tápközeget, míg Tóth (2019) a 4% laktóz tartalmú MRS tápközeget alkalmazta és találta a legjobb szubsztrátumnak a β -galaktozidáz termelésére, így ezeket a tápközegeket választottam a fermentációhoz. A fermentáció folyamata 37 °C-on, 16 órán át zajlott. A sejtek összegyűjtése után meghatároztam a β -galaktozidáz enzimaktivitást, s ez alapján terveztem a biokonverziós kísérleteimet. Ezenfelül kettő kiértékelési módszerrel dolgoztam: HPLC technikával, mellyel a kapott termékek minőségi, valamint mennyiségi azonosítása is végezhető, valamint vékonyréteg-kromatográfiával (VRK), mely kimutatja, hogyha az adott mintákban jelen van valamilyen oligoszacharid.

Az enzimfermentáció során az alkalmazott *Limosilactobacillus fermentum* törzs a tápközeghez hozzáadott szénhidrátokat használta fel tápanyagként. A metabolizmus során képes különféle szerves savakat például tejsavat előállítani. A glükóz és a galaktóz erjesztése következtében a tápközeg pH értékét is a savas pH felé terelték. A 16 órás fermentáció után megmértem a tápközeg pH-ját, amely pH = 4,7 volt. Mivel a kiindulási érték pH 6,5 körüli, ebből arra következtetek, hogy a baktérium sikeresen elszaporodott a közegben. A 4% laktóz tartalmú tápközegben is megvalósítottam az enzimfermentációt és megállapítottam a baktériumok erjesztési folyamatának következtében kialakult alacsony pH értéket. Az eredmény pH = 4,25 volt, mely savasabb érték, mint a glükóz-galaktóz tartalmú közegben. Ebből arra tudok következtetni, hogy a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 a laktózt jobban hasznosította.

A fermentáció után az összegyűjtött sejteket mechanikailag feltártam annak érdekében, hogy a sejten belüli, vagyis intracellulárisan elhelyezkedő enzimet kinyerjem. A kivont β -galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározásához p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrátumot használtam. A glükóz-galaktóz tápközegen keletkező enzim aktivitása 8,76 U/100 ml volt, míg a laktóz tartalmú tápközegen termelődő enzimesetében 10,89 U/100 ml enzimaktivitást kaptam.

5.2 *L. fermentum* LF08 törzs β -galaktozidázzal történő oligoszacharid szintézisének kimutatása

Méréseim során a β -galaktozidáz enzimek oligoszacharid szintetizáló képességeit is kutattam, s a kimutatásra többféle módszert alkalmaztam. A biokonverzió során a különböző szénhidrát tartalmú tápközegen (glükóz-galaktóz és laktóz) termelt, sejtfeltárás eredményeképpen kinyert, intracelluláris enzimeket használtam fel a folyamatok elindításához.

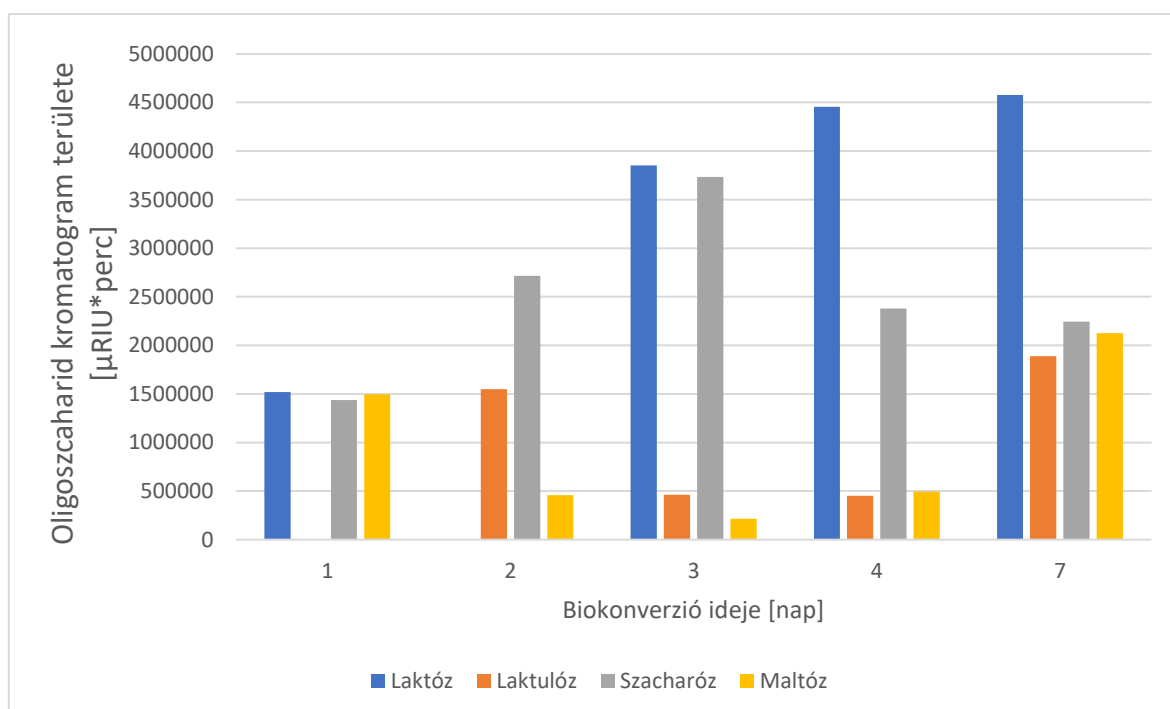
5.2.1 Különböző szubsztrátumok hatása az oligoszacharid szintézisre

A különböző szubsztrátumok oligoszacharid szintézisre gyakorolt hatásának vizsgálatához laktóz, laktulóz, szacharóz, illetve maltóz szubsztrátumokkal végeztem el a biokonverziós folyamatot. Mindegyik szénhidrátból 30g/100ml koncentrációjú oldatokat készítettem, melyhez a megfelelő pH biztosítása végett Sörensen puffert (pH = 6,5) alkalmaztam. Miután az enzimmészítményeket is az oldatokhoz adtam, 7 napra 40°C hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztem őket, s meghatározott időként mintát vettem (1., 2., 3., 4., és 7. nap) a további elemzésre.

A HPLC mérés során kapott kromatogramok csúcs alatti területeit figyelembe véve ki tudtam mutatni, hogy a glükóz-galaktóz tápközegen termelt enzim esetén minden vizsgált szubsztrátumon oligoszacharid szintézis történt. Ezt a **6. ábra** szemlélteti. Mussatto és Mancilha (2007) szerint az oligoszacharidok szintézisekor szubsztrátumként tejsavóból kinyert laktózt célszerű használni, melynek következtében a folyamat során triszacharidok (4- vagy 6-galaktozil-laktóz), illetve négyes vagy annál nagyobb polimerizáltságú oligoszacharidok képződhetnek, mint termékek. A mérésem során kapott kromatogramon azt is megfigyeltem a laktóz szubsztrátum esetében, hogy az oligoszacharid képződés a napok múlásával egyenes arányosan nőtt a 4. napig (4456496 μ RIU*perc), melyhez képest a 7. napon (4576180 μ RIU*perc) már nagy mértékű változás nem figyelhető meg. A szacharóz esetén is hasonló növekedést tapasztaltam, azonban a harmadik nap után (3735087 μ RIU*perc) csökkenni kezdtek az értékek. A csökkenés oka lehet, hogy 30%-os szacharóz koncentráció mellett még elegendő víz van jelen, hogy hidrolízis folyamatok is megvalósuljanak. A hidrolízis során a keletkező oligoszacharidok visszaalakulnak egyszerűbb cukrokká, mono- és diszacharidokká. A laktulóz szubsztrátumon a különböző időpontokban mért értékek igen változóak, amíg a második (154721 μ RIU*perc) és a hetedik napon (1889696 μ RIU*perc) kiugró értékeket kaptam, addig a többi napon

elenyészőek voltak az értékek a többi szénhidráthoz képest. A maltóz is hasonlóan viselkedett, mint a laktulóz, azonban ezen szubsztrátumon az első (1496960 μ RIU*perc) és a hetedik napon (2125995 μ RIU*perc) volt a legnagyobb az oligoszacharid tartalom.

Összességében elmondhatom, hogy a legnagyobb oligoszacharid tartalmat a laktóz szubsztrátum esetében figyeltem meg a hetedik napon, melynek értéke 4576180 μ RIU*perc volt. 3 napos biokonverzió tekintetében a szacharóz és laktóz esetében hasonló mennyiségű oligoszacharid detektálható.

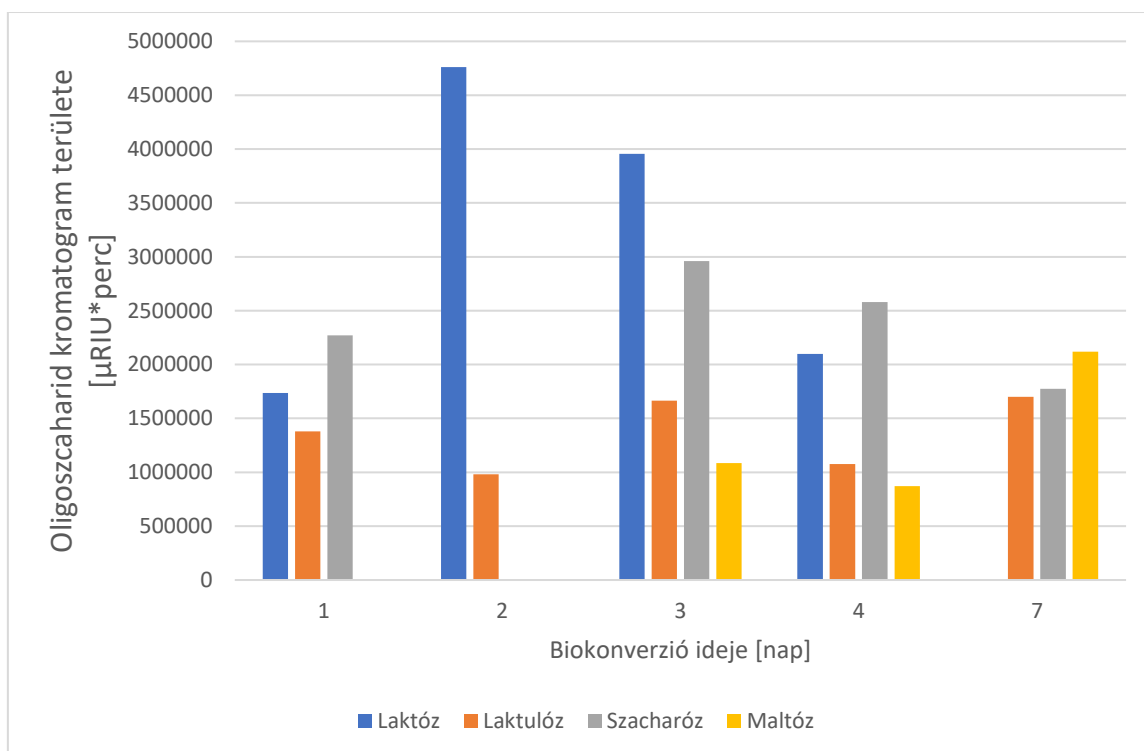


6. ábra: Oligoszacharidok összmenységének változása a különböző szubsztrátumoknál, glükóz-galaktóz tartalmú tápközegen termelt β -galaktozidáz enzimmészítmény esetében

A laktóz tartalmú tápközegen képződött β -galaktozidáz enzim oligoszacharid szintetizáló képességet a **7. ábra** mutatja be. Jól látható, hogy az oligoszacharidok eleinte minden szubsztrátum esetében növekvő ütemben képződtek, azonban a második nap után folyamatosan csökkenni kezdtek a szintetizálódó oligoszacharidok.

Ezen enzim esetében is elmondhatom, hogy a legnagyobb oligoszacharid tartalmat a laktóz szubsztrátumnál figyeltem meg (4760214 μ RIU*perc) a második napon. Őt követi a szacharóz, mely esetében a második napon technikai okok miatt nem állt rendelkezésre adatom. Szacharóz esetén a harmadik nap mérhető a maximális érték, mely 2961138

$\mu\text{RIU*perc}$ volt. A diagram azt is mutatja, hogy bár a laktulózon mért értékek elenyészőek voltak a laktózhhoz és a szacharózhhoz képest, az enzim mégis képes volt oligoszacharidokat létrehozni vele. A mennyiségeket tekintve növekedés és csökkenés figyelhető meg, a hidrolízis és a szintézis váltakozása következtében. A legnagyobb oligoszacharid tartalmat a hetedik napon mutatta, 1701704 $\mu\text{RIU*perc}$ értékkel. A maltóz szubsztrátumon oligoszacharidok a harmadik napon jelentek csak meg, a maximális érték szintén a hetedik napon mutatható ki, mely 2119852 $\mu\text{RIU*perc}$ volt.



7. ábra: Oligoszacharidok összmenységének változása a különböző szubsztrátumoknál, laktóz tartalmú tápközegen termelt β -galaktozidáz enzimekésztmény esetében

A két enzim szintetizálta oligoszacharidok mennyisége között jelentős eltérést tapasztaltam. A laktóz tartalmú tápközeg enzimekésztménye esetén az oligoszacharid tartalom eleinte nőtt, a második napon el is érve a maximális oligoszacharid mennyiséget (4760214 $\mu\text{RIU*perc}$ a laktóz szubsztrátummal), majd ezután csökkeni kezdett. Ezt a csökkenő tendenciát leginkább a laktóz szubsztrátum esetében figyeltem meg, mely annak volt köszönhető, hogy az oligoszacharid szintézissel párhuzamosan zajlott a laktóz hidrolízisének folyamata is, így csökkentve a felhasználható laktóz mennyiségét. Ezzel szemben a glükóz-galaktóz tartalmú tápközeg enzimekésztménye által szintetizált oligoszacharidok mennyisége folyamatosan nőtt egészen az utolsó napig, ahol azonban már

csak kis értékű változások történtek. Ezen enzim maximális oligoszacharid tartalmát a hetedik napi laktóz szubsztrátumnál érte el, mely 4576180 μ RIU*perc volt.

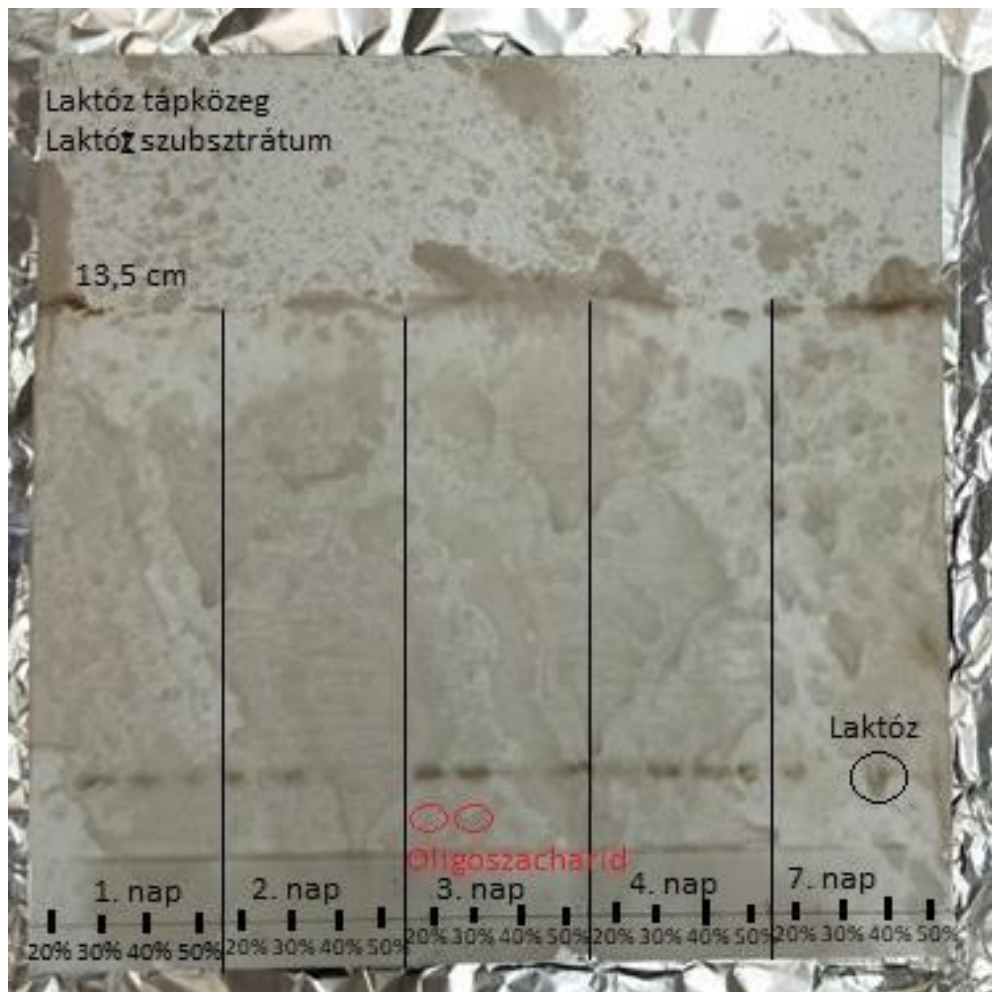
Styevkó (2015) *Bifidobacterium longum* Bb-46 eredetű β -galaktozidáz enzimpreparátumot állított elő és bizonyította transzglykozilációs reakciót katalizáló hatását laktóz, laktulóz, maltóz és szacharóz szubsztrátumokon. A biokonverzió 72 órájában a legnagyobb oligoszacharid szintézist szacharóz szubsztrátumon mutatta ki, a többi 3 szénhidrát esetén kisebb, de hasonló értékek születtek.

Mivel mindkét enzimekészítmény esetében a laktóz, illetve a szacharóz mutatott kimagasló értékeket a többi szubsztrátumhoz képest, ezért a további oligoszacharid szintetizáló vizsgálatot ezzel a két szénhidráttal folytattam.

5.2.2 Különböző koncentrációjú laktóz oldatok hatása az oligoszacharid szintézisre

A laktóz szubsztrátumot tartalmazó oldatokat különböző koncentrációkban készítettem el: 20, 30, 40, 50 g/100 ml. Ezekhez hozzáadtam a két tápközegből származó enzimekészítményeket, majd 7 napra 40°C-os vízfürdőbe tettem őket. A vékonyréteg-kromatográfia során az 1., 2., 3., 4. és 7. napi mintákat tanulmányoztam. A lemezekre 1 μ l mennyiséget pipettáztam a mintákból, majd 2 órára pufferbe helyeztem őket. A képződő oligoszacharidok jelenlétét a színezőanyaggal történő megfestés és a 100°C-os szárítás után tudtam megállapítani. A retenciós faktor (Rf) képletének használatával tudtam beazonosítani a megjelenő vegyületeket. A glükóz-galaktóz, valamint a laktóz tartalmú tápközeg enzimekészítményét használó VRK-nál a 20, 30, 40, 50 g/100 ml koncentrációjú mintákat vittem fel a lemezre naponként.

A glükóz-galaktóz tartalmú tápközeg enzimekészítménye során nem tapasztaltam oligoszacharid szintézist, vagyis nem történt változás a szénhidrát összetételében. A laktóz tartalmú tápközeg enzimekészítményét használva azonban fedeztem fel oligoszacharidok keletkezésére utaló foltokat 20 és 30% koncentrációnál ~2 cm magasan (Rf=0,1481), illetve jól látszanak a 3 cm magasan megjelenő laktózok is a **8. ábrán**, melyek retenciós faktor értéke Rf=0,222.



8. ábra: Laktóz szubsztrátum hatása a szénhidrát összetételre laktóz tápközegből származó enzimek készítmény esetében

Zhang és munkatársai (2021) *Lactobacillus plantarum* CICC 22186 mikroorganizmus által termelt β -galaktozidáz enzimmel végeztek oligoszacharid szintézist, amelyben laktózt alkalmaztak szubsztrátumként. Az optimális szintézis elérésének céljából a folyamat 35°C -on zajlott, $\text{pH}=7,0$ értéken, valamint $40\text{ g}/100\text{ ml}$ szubsztrátum koncentráció mellett. Eredményül 30%-os termelés mutatva, nagy tisztaságú galakto-oligoszacharidokat (GOS) kaptak.

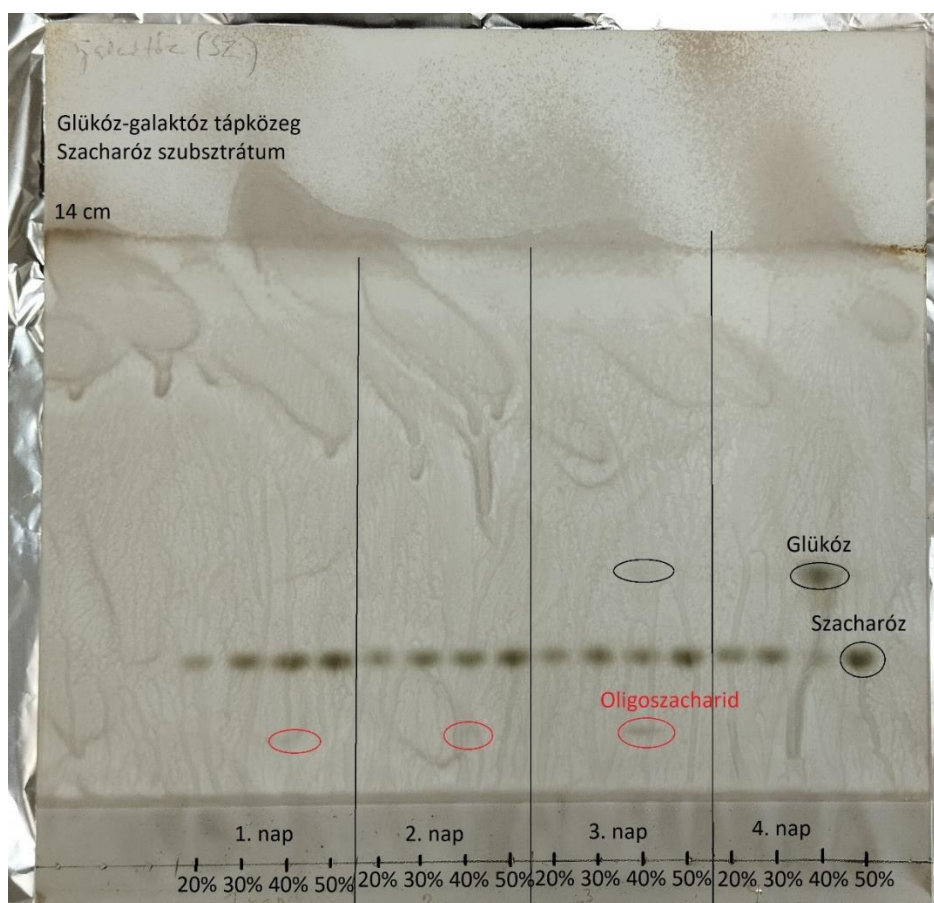
Fara és munkatársai (2020) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450 törzsszel - mely kísérleteik során a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitással rendelkezett -, termeltettek β -galaktozidáz enzimet, majd szintetizáltattak GOS-t, 41,3%-os kitermeléssel. Az oligoszacharid képzés során laktózt és laktulózt is alkalmaztak szubsztrátumként, laktóz esetében $30\text{ g}/100\text{ ml}$ koncentráció bizonyult a legalkalmasabbnak. A szintézis 45°C -os hőmérsékleten, $\text{pH}=6,5$ értéken, 24 órán át zajlott.

Duan és munkatársai (2021) *Lactobacillus bulgaricus* L3 mikroorganizmus törzs termelte β -galaktozidázzal végeztek oligoszacharid szintézist. Az oligoszacharid szintézis során 20 g/100 ml koncentrációjú tejsavót alkalmaztak szubsztrátumként, amely ~16 g/100 ml laktózt tartalmazott. A folyamat, amely 45 °C-on zajlott, körülbelül 30% GOS hozamot produkált.

Összességében látható, hogy a különböző tejsavbaktérium eredetű β -galaktozidáz enzimekkel galakto-oligoszacharidok szintetizálhatók 20-40% laktóz koncentrációjú szubsztrátumon.

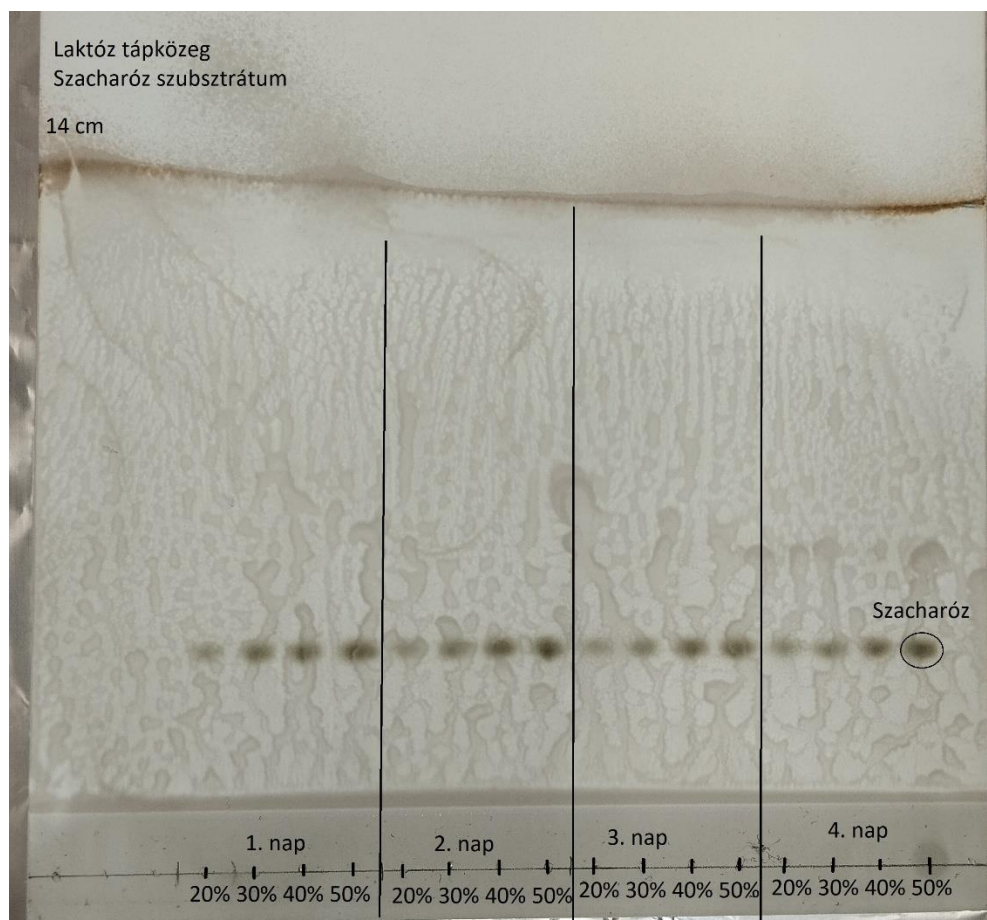
5.2.3 Különböző koncentrációjú szacharóz oldatok hatása az oligoszacharid szintézisre

Ezen módszer során szacharóz szubsztrátumot tartalmazó oldatokat készítettem különböző koncentrációkban: 20, 30, 40, 50 g/100 ml. A biokonverzió itt is 7 napon át zajlott 40°C-on, a korábban elkészített enzimek készítményekkel. A VRK során az 1., 2., 3. és 4. napos mintákat vizsgáltam oligoszacharid képződést keresve.



9. ábra: Szacharóz szubsztrátum hatására szintetizálódó oligoszacharidok, glükóz-galaktóz tápközegből származó enzimek készítmény esetében

A **9. ábrán** jól láthatóak a 4,5 cm magasan, egymást mellett megjelenő különböző szacharóz koncentrációt mutató sávok ($R_f=0,3214$), valamint 6,5 cm futási távolságnál elhelyezkedő glükóz sávok ($R_f=0,4643$). Ezeken felül oligoszacharid képződést is felfedeztem, az 1., 2. és 3. napon is 40 g/100 ml koncentráció értéknél, melyek 3 cm magasan jelentek meg, így a retenciós faktor értékük $R_f=0,2143$.



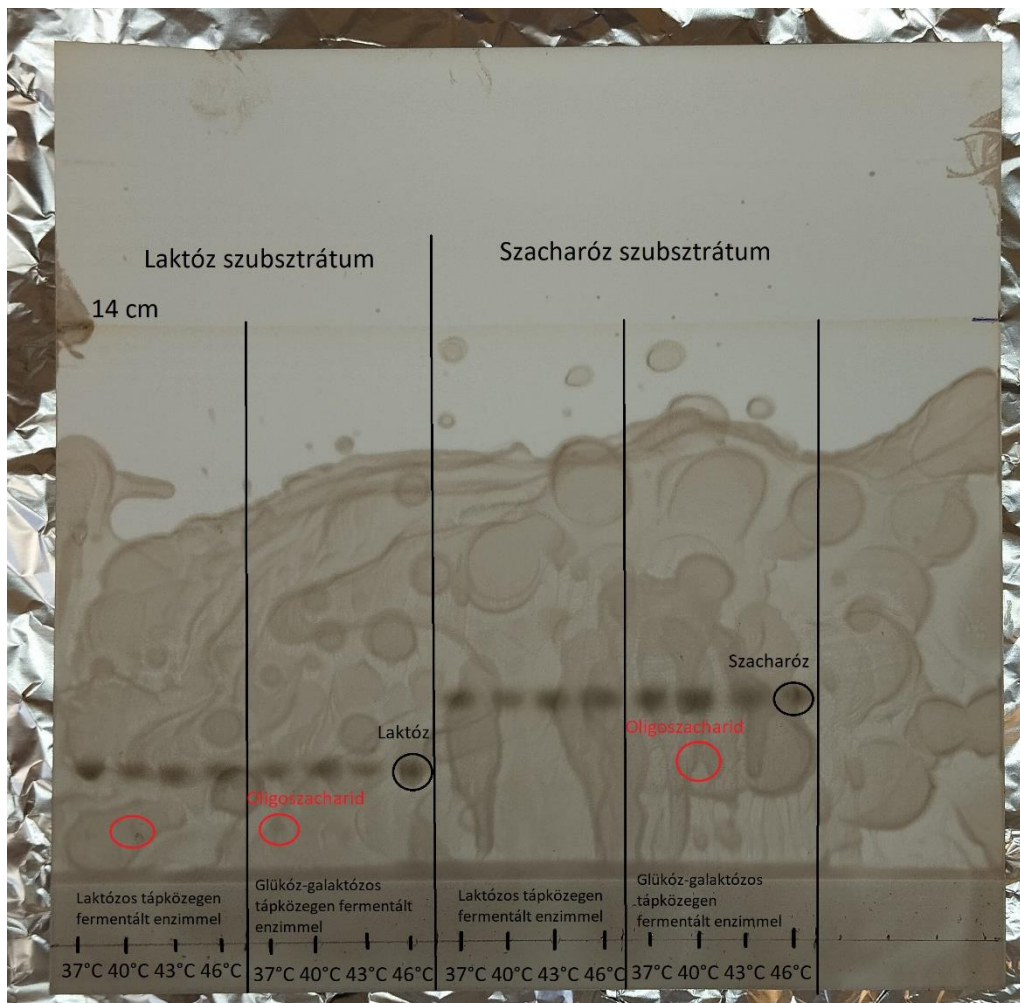
10. ábra: Szacharóz szubsztrátum hatása a szénhidrát összetételre laktóz tápközegből származó enzimekészítmény esetében

A **10. ábrán** tisztán látszanak a szacharózra utaló sávok, melyek 4,5 cm magasan helyezkednek el ($R_f=0,3214$), azonban oligoszacharid szintézis nem történt ezen vizsgálat során. Vagyis összetételbeli változást nem figyeltem meg.

Styevkó (2015) *Bifidobacterium* eredetű β -galaktozidáz enzimmel biszubsztrátumos rendszerekben is valósított meg kísérleteket, laktóz:maltóz és laktóz:szacharóz szénhidrátokon, valamint optimalta az oligoszacharidok (DP3-DP4) szintézisét az oligoszacharid tartalomra nézve. Optimális szubsztrátum koncentrációjuk és arányuk: laktóz:maltóz esetében 40 g/100ml volt és 33:67 arány, míg laktóz:szacharóznál 25 g/100ml és 61:39.

5.2.4 A hőmérséklet hatása az oligoszacharid szintézisre

Ebben a kísérletben a hőmérséklet hatását kívántam vizsgálni az oligoszacharid szintézisre. 40 g/100 ml koncentrációjú, laktóz és szacharóz szubsztrátumot tartalmazó oldatokat készítettem, melyeket miután beoltottam a kétféle enzimmészítménnyel különböző hőmérsékletű vízfürdőkbe helyeztem. A vízfürdők 37, 40, 43 és 46°C hőmérsékletűek voltak. A biokonverzió 3 napig tartott, a VRK során pedig csak az eddigi eredményeim alapján maximális értéket mutató 3. napi mintákat vizsgáltam.



11. ábra: Laktóz és szacharóz szubsztrátum esetében szintetizáló oligoszacharidok

A 11. ábrán jól látható a tagoltság az eredmények közt, ez abból következik, hogy laktóz szubsztrátum ~3 cm magasan ($R_f=0,2143$), míg a szacharóz szubsztrátum ~4,5 cm magasan ($R_f=0,3214$) helyezkedik el. Oligoszacharid képződés több ponton is megfigyelhető volt, a laktóz (2,5 cm magasan, vagyis $R_f=0,1786$) és a szacharóz szubsztrátum (3 cm magasan, vagyis $R_f=0,2143$) esetében is. A laktóz szubsztrátumnál a laktóz tartalmú tápközegből kivont enzim használatakor 40°C-on jelent meg az oligoszacharid, míg a glükóz-galaktóz

tápközeg enzime esetén 37°C-on. A szacharóz szubsztrátumnál kizárólag a glükóz-galaktóz tápközeg enzimekor szintetizálódott oligoszacharid, szintén 40°C-on. Megfigyeltem, hogy 43°C és 46°C-on nem keletkezett egyik esetben sem oligoszacharid. Ezekből arra következtetek, hogy az oligoszacharidok képződésére a legoptimálisabb hőmérséklet a 37°C-40°C.

Terveim között szerepelt a mintavételezés során kapott oldatok HPLC módszerrel történő értékelése is, és az optimális hőmérséklet pontosabb meghatározása, melyre a műszer meghibásodása végett sajnálatosan nem kerülhetett sor a szakdolgozat leadásáig.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaim során *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs β -galaktozidáz enzim termelését és az enzimmel történő oligoszacharidok szintézisét tanulmányoztam.

Enzim termelés vizsgálatakor két, különböző szénhidrát tartalmú tápközeget készítettem (4% laktóz, illetve 1-1% glükóz-galaktóz tartalmú tápközeget), melyekben a vizsgált baktérium a fermentáció során β -galaktozidáz enzimet szintetizált. Az enzimaktivitást a 16 órás fermentációt és a sejtfeltárást követően határoztam meg: a glükóz-galaktózos tápközegben 8,76 U/100 ml, míg a laktózos tápközegen termelődő enzimnek 10,89 U/100 ml volt az enzimaktivitása. A mikroorganizmus szaporodását a tápközegek csökkenő pH értékei is bizonyítják, mely a glükóz-galaktóz tartalmú tápközeg esetén pH=4,7, ezzel szemben a laktóz tartalmú tápközeg esetén pH=4,25 volt, vagyis ebben az esetben gyorsabban hasznosították a szénhidrátot a baktériumok. Mivel az enzimaktivitás és a pH mérés során is a laktóz tartalmú tápközeg értékei lettek jobbak, így ezen vizsgálatok alapján arra tudok következtetni, hogy a β -galaktozidáz termelődését a laktóz nagyobb mértékben indukálja.

A kísérleteim alatt a β -galaktozidáz enzim oligoszacharid szintetizáló képességét is tanulmányoztam 7 napos biokonverziós folyamat során. Kutattam a különböző szubsztrátumok (laktóz, laktulóz, szacharóz, maltóz) hatásait, ahol a HPLC méréssel kapott eredmények alapján megállapítottam, hogy mindkét tápközegben termelt enzim esetén képződött oligoszacharid. Mindkét esetben a 30 g/100 ml koncentrációjú laktóz szubsztrátum használata során szintetizálódott a legtöbb oligoszacharid, melyet a kapott kromatogramok területeinek értéke alapján állapítottam meg. Ezen érték 4760214 μ RIU*perc volt a laktózos tápközegnél, és 4576180 μ RIU*perc volt a glükóz-galaktózos tápközegnél, vagyis az enzimtermelésre használt tápközegeknek nem volt jelentős hatása a képződött oligoszacharidok mennyiségére. A második legnagyobb értékeket a szacharóz szubsztrátumnál tapasztaltam, míg laktulóz és maltóz szubsztrátumokon az oligoszacharid szintézis kisebb mértékű volt.

Vizsgáltam még a különböző laktóz és szacharóz szubsztrátum koncentrációk (20, 30, 40, 50 g/100 ml) hatásait az oligoszacharid szintézisre. Az eredményeket vékonyréteg-kromatográfia (VRK) műveletével kaptam. A módszerrel megállapítottam, hogy a szacharóz szubsztrátum használatakor, a glükóz-galaktóz tartalmú tápközegben termelt enzim esetén

képződött oligoszacharid az 1., 2., 3. napon 40 g/100 ml koncentrációnál, illetve a laktóz szubsztrátum esetén is megfigyeltem oligoszacharid szintetizálódást a laktóz tartalmú tápközeg enzimének használatakor a 3. napon 20 g/100 ml és 30 g/100 ml koncentráció értékeknél. A többi vizsgálatnál nem tapasztaltam szintézist, vagyis nem történt szénhidrát összetételbeli változás.

Megfigyeltem a hőmérsékletváltozás (37°C, 40°C, 43°C, 46°C) hatásait is a szintézisre, ahol szintén a laktóz és a szacharóz szubsztrátummal dolgoztam. A laktóz szubsztrátumnál mindegyik enzim esetén (laktóz tartalmú enzim esetén 40°C-on, míg glükóz-galaktóz tartalmú enzimmél 37°C-on), a szacharóz szubsztrátumnál pedig kizárólag a glükóz-galaktóz tartalmú tápközeg enziménél 40°C-on, míg a nagyobb hőmérsékleteken vékonyréteg kromatográfiával nem tudtam kimutatni oligoszacharidok jelenlétét. Ebből következően tudtam megállapítani, hogy az általam vizsgált mikroba esetén 37-40°C az optimális az oligoszacharid szintézisre.

Összegésképpen elmondhatom, hogy a probiotikus *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs β -galaktozidáz enzimével sikerült oligoszacharidot szintetizálni. A továbbiakban javasolnám egyéb paraméterek hatásának vizsgálatát, akár biszubsztrátum rendszerekben, illetve a keletkező oligoszacharidok jellemzését, valamint prebiotikus hatásuknak vizsgálatát.

Irodalomjegyzék

- Deák, T., Kiskó, G., Maráz, A., & Mohácsiné Farkas, C. (2006). Élelmiszer-mikrobiológia. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
- Duan, F., Zhao, R., Yang, J., Xiao, M., & Lu, L. (2021). Integrated Utilization of Dairy Whey in Probiotic β -Galactosidase Production and Enzymatic Synthesis of Galacto-Oligosaccharides. *Biocatalysis for Green Chemistry*, 11(6), 658.
- Fara, A., Sabater, C., Palacios, J., Requena, T., Montilla, A., & Zárata, G. (2020). Prebiotic galactooligosaccharides production from lactose and lactulose by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450. *Food & Function*, 11(197), 5875–5886.
- Furrie, E. (2005). Probiotics and allergy. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4):465-9.
- Harzallah, D., & Belhajd, H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Mucosal Barrier. In J. M. Kongo, *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (old.: 197-216.). Chapter 8. InTech.
- Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., Korma, S. A. (2023). Probiotics: mechanisms of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*. 14:1216674.
- Liu, N., Shen, H., Zhang, F., Liu, X., Xiao, Q., Jiang, Q., Tan, B., Ma, X. (2023). Applications and prospects of functional oligosaccharides in pig nutrition: A review. *Animal Nutrition*, 13:206-215.
- Macfarlane, G., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2) 305-344.

- Majumder, A., Mangtani, A., Patel, S., Shukla, R., & Goyal, A. (2009). Gluco-oligosaccharides production from glucan of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742 by microwave assisted hydrolysis. *Biotechnology and Pharmacy*, 3(4) 405-411.
- Matthews, B. W. (2005). The structure of *E. coli* β -galactosidase. *Comptes Rendus Biologies*, 328(6):549-56.
- Miyazawa, T., & Funazukuri, T. (2006). Noncatalytic hydrolysis of guar gum under hydrothermal conditions. *Carbohydrate Research*, 341(7), 870-877.
- Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68, (3), 587-597.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015.). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*. 52(12):7577-87.
- Patel, S. (2011.). Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5):1119-1128.
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019.). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10(S1):S49-S66.
- Rabelo, M. C., Fontes, C. P., & Rodrigues, S. (2009). Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. *Bioresource Technology*, 100(23):5574-80.
- Ruiz-Ramírez, S., & Jiménez-Flores, R. (2023). Properties of β -Galactosidases derived from Lactobacillaceae species and its capacity for galacto-oligosaccharides production. *Journal of Dairy Science*. In press. S0022-0302(23)00593-3.
- 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.

- Schrezenmeir, J., & de Verse, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl):361S-364S.
- Styevkó G., 2015. Reverz hidrolízis és transzglykoziláció tanulmányozása oligoszacharidok szintézisére, Doktori értekezés, Budapest
- Szabó B. I. (2023). Probiotikus *Lactobacillus fermentum* LF08 törzs intracelluláris β -galaktozidáz enzim termelésének optimalása. Szakdolgozat, Budapest
- Tóth B., 2019. Tápközeg optimalás probiotikus *Lactobacillus* törzsek intracelluláris β -galaktozidáz termelésére, Szakdolgozat, Budapest
- Turati, F., Concina, F., Bertuccio, P., Fiori, F., Parpinel, M., Garavello, W., Crispo, A., Libra, M., Negri, E., Serraino, D., Vecchia, C. L. (2023). Prebiotics and the Risk of Upper Digestive Tract and Stomach Cancers: The PrebiotiCa Study. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. S2212-2672(23)01275-3.
- Vera, C., Córdova, A., Gajardo, C. A., Guerrero, C., Suarez, S., & Illanes, A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(12):197.
- Watson, R. R., & Preedy, V. R. (2016.). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion* . Elsevier Inc.
- Wells, J. M. (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial Cell Factories*. 10 (Suppl 1), S17 (2011)
- Zhang, X., Yao, C., Wang, T., Zhao, H., & Zhang, B. (2021). Production of high-purity galacto-oligosaccharides (GOS) by *Lactobacillus*-derived β -galactosidase. *European Food Research and Technology*, 247 (3), pages 1501–1510.

Felhasznált internetes források:

Todar, K. (2020). Lactic Acid Bacteria (page 1). Forrás:
textbookofbacteriology.net: <https://textbookofbacteriology.net/lactics.html>

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani *Dr. Bujna Erika egyetemi docensnek*, amiért mindig készségesen segítségemre volt, energiát és időt szánt a támogatásomra. Szakmai tapasztalatával, hasznos információkkal és tanácsokkal segítette laboratóriumi munkámat, valamint szakdolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom *Dr. Nguyen Duc Quang egyetemi tanár, tanszékvezető, Tudományos és Innovációs Igazgatóhelyettes Úrnak*, amiért lehetővé tette a kísérletek elvégzését a Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszéken.

Köszönöm *Kristijan Hristovski PhD hallgatónak*, amiért segítette a labormunkámat.

Végül hálával tartozom *Családomnak* a támogatásukért és biztatásukért az egyetemi tanulmányaim alatt.

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Lévai Dániel György
A Hallgató Neptun kódja:	AZ4M2D
A dolgozat címe:	Oligoszacharid szintézis vizsgálata <i>L. fermentum</i> eredetű béta-galaktozidáz enzimmal
A megjelenés éve:	2023
A konzulens intézetének neve:	Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

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

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan 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 szellemitulajdon-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: 2023. év november hó 03. nap


Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Lévai Dániel György (Neptun azonosítója: AZ4M2D) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Budapest, 2023. november 3.


belső konzulens