

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

Lévai Dániel György

Biomérnöki, alapképzés, nappali

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet / Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Belső témavezető:

Dr. Bujna Erika, egyetemi docens, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Dr. Nguyen Duc Quang, egyetemi tanár, tanszékvezető, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

A β -galaktozidáz enzim megfelelő körülmények között hidroláz aktivitás mellett transzgalaktozidáz aktivitással is rendelkezhet, így képes prebiotikus hatású galakto-oligoszacharidok (GOS) szintézisére. A prebiotikumok olyan élelmiszerösszetevők, amelyeket a gyomor-bélrendszer felső szakaszában található emésztőenzimek nem képesek lebontani, így változatlan formában jutnak el a vastagbélig, ahol szelektíven támogatják 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 *Lactobacillus* nemzetség egyes törzsei rendelkeznek probiotikus képességgel, valamint képesek a β -galaktozidáz enzim előállítására, melynek tulajdonságait hasznosítani tudják a különféle iparágak. Az élelmiszeripar például a β -galaktozidáz hidrolitikus aktivitását használja fel a tejtermékek laktóztartalmát csökkentésére, a gyógyszeripar pedig az enzim transzgalaktozidáz aktivitását, amely során prebiotikus tulajdonságú oligoszacharidok szintetizálhatóak vele, melyekkel támogathatják a probiotikus mikroorganizmusokat.

A fentebb leírtak alapján választottam kutatási célomnak a *Limosilactobacillus fermentum* LF08 törzs β -galaktozidáz enzim termelésének vizsgálatát és az enzimmal történő oligoszacharidok szintézisének tanulmányozását.

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, mivel az enzim intracellulárisan termelődik. Az oligoszacharid szintézis vizsgálatára 7 napos biokonverziót valósítottam meg, s a meghatározott időközönként vett mintákból HPLC, illetve vékonyréteg kromatográfiás módszerek alkalmazásával detektáltam a képződött oligoszacharidok jelenlétét.

Az enzimfermentáció eredményeként megállapítottam, hogy a kétféle tápközegen termelt enzimek közül a laktózos tápközegen termelődő enzim mutatott nagyobb aktivitást. A mikroorganizmus szaporodását a tápközegek csökkenő pH értékei is bizonyítják, mely szintén a laktóz tartalmú tápközegek esetén volt kedvezőbb értékű, 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 következtettem, hogy a β -galaktozidáz termelődését a laktóz nagyobb mértékben indukálja.

A kísérleteim alatt a β -galaktozidáz enzim oligoszacharid szintetizáló képességét is tanulmányoztam. Kutattam a különböző szubsztrátumok (laktóz, laktulóz, szacharóz, maltóz) hatásait az oligoszacharid szintézisre, 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 értékek a laktózos tápközegnél, és a glükóz-galaktózos tápközegnél is hasonlóak voltak, 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 műveletével kaptam. A módszerrel megállapítottam, hogy a szacharóz szubsztrátum használatakor, a glükóz-galaktóz tartalmú tápközegben termelt enzim esetén képződött oligoszacharid, illetve a laktóz szubsztrátum esetén is megfigyeltem oligoszacharid szintetizálódást a laktóz tartalmú tápközeg enzimének használatakor. 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 mindkét enzim esetén, a szacharóz szubsztrátumnál pedig kizárólag a glükóz-galaktóz tartalmú tápközeg enziménél tapasztaltam szintézist. A nagyobb hőmérsékleteken vékonyréteg kromatográfiával nem tudtam kimutatni az oligoszacharidok jelenlétét. Ebből következően tudtam megállapítani, hogy az általam vizsgált mikroba esetén a 37°C-40°C hőmérsékletek voltak az legoptimálisabbak az oligoszacharid szintézisre.

Összegzésképpen 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.