



Mikrobiális fitáz enzim előállítása és jellemzése

Doktori értekezés tézisei

BUJNA ERIKA

**Budapest
2014**

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Felföldi József,
egyetemi tanár, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Rezessyné Dr. Szabó Judit,
egyetemi magántanár, PhD
Sör- és Szeszipari Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1 A munka előzményei és célkitűzései

A biogén elemek közül, talán a foszfor az ötödik legnagyobb mennyiségben található elem a szén, a hidrogén, az oxigén és a nitrogén után. A kén és a foszfor különösen fontos szerepet tölt be az energiaforgalomban, valamint az állati és az emberi szervezet csontosodási folyamataiban. A foszfor nélkülözhetetlen alkotóeleme a nukleinsavaknak, az ATP-nak, a foszfolipideknek, továbbá hatása van az élő szervezetek növekedésére és csontjainak állapotára, sőt egyes állatoknál pl. baromfiknál a csőr egészségére és a tojás minőségére is. Az állatok a foszforhoz részben a foszfortartalmú vízből, részben a növényi táplálékból jutnak. A növényekben fontos foszfor raktározó vegyületként a fitátok szolgálnak, amelyek különböző mennyiségben találhatók meg. A gabonafélék, hüvelyesek és olajos magvúak termésében nagy mennyiségű fitinsav található és általában a növényi eredetű takarmányokban a foszfor 60-90%-ban fitát formájában van jelen. A fitinsav és sói antinutritív jellegű vegyületek, hiszen komplexet képezve a kétvegyértékű kationokkal meggátolják a szervezet számára nélkülözhetetlen ásványi anyagok felszívódását és hasznosulását. Ezen túlmenően a fitátok csökkentik a fehérjék, a keményítő és a lipidek emészthetőségét is, továbbá gátolják bizonyos enzimek - különösen az emésztőenzimek - működését. A szerves foszfor forrás nehezen hozzáférhető az egygyomrú állatok (pl. baromfi, sertés) számára, mivel bélrendszerükből – az emberhez hasonlóan - hiányzik vagy csekély mértékben van jelen a fitinsav bontását végző fitáz enzim, így a megfelelő foszforellátás érdekében szerves foszfort adagolnak a takarmányokhoz. Ennek következtében jelentős mennyiségű nem hasznosult szerves foszfor jelen lévő szerves foszfor is ürítésre kerül. Mindezen tényezők miatt az intenzív állattartás a környezet megnövekedett foszfor terheléséhez vezet, mely a vizek eutrofizációját is okozza.

A fitinsav tartalom csökkentésére és az értékes szerves foszfor forrás felszabadítására a takarmányokon túl az élelmiszerekben is a fitáz enzimmel történő hidrolízis a legmegfelelőbb. A fitáz enzimnek az állatok takarmányozásában való alkalmazása már világszerte elfogadott és elterjedt, hiszen ezzel javítható a szerves foszfor hozzáférhetősége, így csökkenthető a foszfor környezetbe való kibocsátása. Számos ipari enzimgyártó cég is rendelkezik takarmányozási célra előállított fitáz enzimművel. A humán táplálkozásnál szintén fontos szerepet tölthet be az enzim, amely segítségével csökkenthető az ásványi anyagok hiányából adódó betegségek kialakulásának kockázata azon célcsoportoknál - pl. vegetáriánusok, illetve a fejlődő országok lakói – akik az átlagosnál nagyobb mennyiségű fitát tartalmú növényt fogyasztanak.

Az utóbbi évtizedben felismerték, hogy a fitinsav részleges hidrolízisével olyan meghatározott összetételű egészségmegőrző hatással rendelkező mioinozit-foszfátok állíthatók elő, melyek funkcionális élelmiszer-összetevőként alkalmazhatók. Ezen vegyületek csökkentik a bélrák kockázatát, a szérum koleszterin szintet és a triglicerid szintet kísérleti állatokban, valamint szerepet játszanak a lipid peroxidáció csökkentésében és antioxidáns hatásuk is jelentős. A mioinozit-foszfátok létrehozása kizárólag enzimes technológiával valósítható meg. Az enzimes technológiák további előnye, hogy kíméletes körülmények között, a környezetterhelés minimalásával, az adott reakcióra specifikusan valósítható meg a folyamat.

A fitáz enzim széleskörű előfordulása lehetőséget nyújt különböző eredetű enzimek előállítására. A termelő organizmustól függően az enzim hatásmechanizmusa, optimális működési körülményei, szubsztrátum specifitása, stabilitása eltérő lehet, melyek ismerete feltétele az ipari alkalmazhatóságának. Általában a termofil organizmus eredetű enzimek jobb hőtürési képességet mutatnak, mint a mezofil vagy növényi eredetűek. A fonalgombákból kinyert fitázok glükoprotein jellegűek és eltérő módon katalizálják a fitinsav bontását. Megállapítható, hogy az egyes enzimek tulajdonságai fajról fajra vagy akár törzsről törzsre is változhatnak. Mindezekből kifolyólag a PhD kutató munkámban különböző fonalgomba eredetű fitáz enzimek előállításának és jellemzésének megvalósítását terveztem, melyekhez a mezofil *Aspergillus* és a termofil *Thermomyces lanuginosus* mikrobákat választottam.

Kutatómunkám célkitűzései:

1. *Thermomyces lanuginosus* és *Aspergillus* törzsek szelektálása fitáz enzim termelésre
2. Az enzim fermentáció fejlesztése
 - 2.1 Inokulálási technológia kidolgozása
 - 2.2 Tápközeg összetétel optimalás
 - 2.2.1. Szén, nitrogén forrás minőségi és mennyiségi beállítása
 - 2.2.2. Felületaktív anyagok hatásának vizsgálata
3. Az enzimek homogenitásig történő tisztítása
4. Az előállított fitáz enzimek jellemzése
 - 4.1 Molekulatömeg
 - 4.2 Optimális működési paraméterek
 - 4.3 Fémionok hatásának vizsgálata az enzimaktivitásra
 - 4.4 Kinetikai paraméterek meghatározása

2 Anyagok és módszerek

A fitáz enzim előállítására különböző törzsgyűjteményekből származó *Aspergillus* és *Thermomyces lanuginosus* fonalas gomba törzseket használtam.

A fermentációs kísérleteket rázatott lombikos technológiával valósítottam meg. A fermentáció a gombáknak megfelelő hőmérsékleten (*A. niger* 28°C, *T. lanuginosus* 47°C) 220 fordulat/perc rázó sebességen 4-7 napig történt különböző fitinsav tartalmú szubsztrátumokon. Naponkénti mintavételezéssel, s az enzimaktivitás, valamint a pH mérésével követtem a fermentációs folyamatot.

Az enzimaktivitás mérése a Na-fitát szubsztrátumból felszabadult szerves foszfor mennyiségének meghatározásán alapul. Az enzimreakció leállítására szolgáló oldatban lévő ammónium-molibdenát jelenlétében a reakciótermék sárga színű komplexet képez, melynek mennyisége fotometriásan 415 nm-en meghatározható. Egy fitáz egység (U) az az enzim mennyiség, ami Na-fitát szubsztrátumból 1 µmol szerves foszfátot szabadít fel 1 perc alatt, a reakció körülményei között.

Az optimalizációs feladatokhoz a klasszikus egy-faktor-az-időben technika mellett, központi elrendezésű kísérlettervezési módszert is alkalmaztam. Munkám során a fehérjék tisztítása, FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) berendezéshez csatlakoztatott különböző kromatográfiás oszlopok alkalmazásával, 4 °C-on történt.

A fehérjekoncentráció meghatározására Bradford módszert és 280 nm-en történő fényelnyelést alkalmaztam.

Az enzimek molekulatömegének meghatározása SDS poliakrilamid gélelektroforézissel történt.

3. Az eredmények összefoglalása

Kutatómunkám során elvégeztem tizennégy *Thermomyces lanuginosus* és tizenegy *Aspergillus* törzs rangsorolását fitáz aktivitásuk alapján. A legjobb fitáz termelő törzsek alkalmazásával fermentációs technológiát dolgoztam ki, majd az enzimek homogenitásig történő tisztítását követően meghatároztam az enzimek jellemző tulajdonságait.

***Thermomyces lanuginosus* eredetű fitáz enzim előállítása és jellemzése**

A rendelkezésre álló *Thermomyces lanuginosus* törzsek rangsorolása után, a legígéretesebbnek talált ***Thermomyces lanuginosus* IMI 096218** törzsszel tápközeg optimalizációs kísérletekkel az enzimtermelés fokozását megvalósítottam. A tápközeg pH=7,5 értékű

TRIS-maleát/NaOH pufferrel készítve az enzimaktivitás megnövekedett. Különböző fitinsav tartalmú anyagok - szójaliszt, búzakorpa, kukoricaliszt, rizsliszt - szubsztrátumként való alkalmazása eredményeként rizsliszten kaptam a legnagyobb fitáz aktivitást, melyen az iparban széleskörűen alkalmazott búzakorpához képest 30-szoros fitáz aktivitást értem el szubmerz fermentáció során. A legnagyobb enzimaktivitást 5 %-os rizsliszt koncentráció alkalmazásánál határoztam meg. Különböző rázatási sebességgel végzett fermentációk során megállapítottam, hogy 220 rpm alkalmazásával a gomba enzimtermelése időben gyorsabb, a 4. napon éri el a maximumát, míg 120 rpm esetén a fermentáció 7. napján volt maximális az enzimtermelés.

Megvizsgáltam a Tween-80, valamint az élesztőkivonat és a citromsav hatását 0,1% koncentrációban az enzimaktivitás alakulására, mind önmagunkban, mind az összes lehetséges kombinációban. Kimutattam, hogy a kontrollhoz képest a citromsav egyértelműen gátolja a fitáz enzim termelését, az aktivitás közel 90%-kal csökkent alkalmazása esetén. A Tween 80 felületaktív anyag jelenlétében tapasztaltam a legnagyobb mértékű aktivitás növekedést. A Tween sorozat további tagjainak (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 65, Tween 80 és Tween 85) aktivitás növelő hatását is megvizsgáltam 0,1 % koncentrációban, s a legjobbnak talált Tween 20 és Tween 40 esetében a megfelelő koncentráció meghatározását is elvégeztem. Megállapítottam, hogy leggazdaságosabban 0,1 % Tween 40 felületaktív anyag alkalmazásával érhető el a maximális enzimkihozatal. Az inokulálási technikát optimalva, a 40 órás 5% mennyiséggel történő beoltás eredményezte a legmagasabb fitáz aktivitást. Ezen paraméterek alkalmazásával a maximális aktivitás eléréséhez szükséges fermentációs idő 2 nap. Az optimalizációs folyamatok eredményeként az enzimaktivitás több mint 50-szeres növelését sikerült megvalósítani (1400-2000U/l). Összegezve az eredményeket megállapítható, hogy a *T. lanuginosus* IMI 096218 törzs fitáz termeléséhez az optimalizációs kísérletek alapján a következő tápközeg összetétel ajánlható: rizsliszt 50 g/l, MgSO₄*7H₂O 0,5 g/l, KCl 0,5 g/l, FeSO₄ 0,1 g/l, NaNO₃ 8,6 g/l, Tween-40 1 g/l, TRIS-maleát/NaOH pufferben (pH=7,5).

A *T. lanuginosus* IMI 096218 törzssel optimalt körülmények között megvalósított fermentáció tenyészlevéből a fitáz enzim tisztítását ammónium-szulfátos kicsapást követően kromatográfiás eljárások kombinációjával valósítottam meg. A tisztítás során 9,1 tisztulási faktor mellett 5,1 % kitermelést értem el. A kinyert fitáz aktivitást mutató fehérje homogenitását SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőrizve, egy 60 kDa körüli, s egy 90 kDa körüli molekulatömegű sáv különült el.

A fitáz enzim optimális pH-ja: pH=5,5 és pH=7,5, s a maximális aktivitást 70 °C-on mutatja. A *T. lanuginosus* IMI 096218 törzs fitáz enzimének kinetikai paramétereit Na-fitát szubsztrátum alkalmazásával a Lineweaver-Burk féle linearizálási módszerrel: $K_M=0,285$ mM, $v_{max}=0,126$ mM/perc, míg a Hanes-Woolf féle linearizálási módszerrel: $K_M=0,312$ mM, $v_{max}=0,132$ mM/perc. Az enzim 54-58 °C között, pH=5,0-7,5 tartományban a legstabilabb, felezési ideje több mint 100 perc.

A különböző fémionok enzimaktivitást befolyásoló hatásának vizsgálatánál megállapítottam, hogy a Fe^{2+} , a Fe^{3+} 1 mM koncentrációban, a K^+ , a Ca^{2+} , és a Mg^{2+} ionok 5 mM koncentrációban való alkalmazása az aktivitás értékek 13-22%-os növekedését eredményezték, tehát ezek az ionok fokozzák az enzim működését. Gátló hatást a Cu^{2+} , a Zn^{2+} , az Ag^+ és a Co^{2+} ionok esetén tapasztaltam 5 mM koncentrációban, jelenlétükben a maradék aktivitás 34-55% volt.

***Aspergillus niger* eredetű fitáz enzim előállítása és jellemzése**

A rendelkezésre álló mezofil *Aspergillus* fajok törzsei közül az *Aspergillus niger* **F00735** törzs mutatta a legnagyobb fitáz aktivitást. Különböző természetes szubsztrátumok – rizsliszt, borsóliszt, kukoricaliszt, kukoricakeményítő, kukoricadara, szójaliszt, búzaliszt és búzadara – vizsgálatával megállapítottam, hogy a rizsliszt tartalmú tápközegben megvalósított szubmerz fermentációval érhető el a legjobb enzimtermelés. Különböző szerves - nátrium-nitrát, ammónium-acetát, ammónium-szulfát - illetve egy szerves nitrogén forrás, a karbamid enzimtermelést befolyásoló hatását is megvizsgáltam. A legkedvezőbb nitrogénforrásnak a nátrium-nitrát bizonyult. A nátrium-nitrát, valamint a rizsliszt optimális koncentrációjának meghatározásához központi elrendezésű kísérlettervezési módszert használtam. A fermentáció 6. napján elért eredmények alapján a következő modellel írható le az enzimtermelés:

$$z = -846 - 634x + 50x^2 + 7712y - 5510y^2 + 273xy$$

ahol z : a fitáz aktivitás [U/l]

x : a rizsliszt koncentráció [(w/v)%]

y : a nátrium-nitrát koncentráció [(w/v)%].

A két faktorról, valamint együttes hatásukról is elmondható, hogy legalább 95%-os biztonsági szinten enzimtermelést befolyásoló hatásuk van. Összességében 7,1 (w/v)% körüli rizsliszt és 0,86 (w/v)% Na-nitrát javasolható az adott törzssel fitáz termelésre, s a maximális aktivitás a fermentáció 6. napján érhető el. Bár a rizsliszt koncentrációjának növelése az optimális $NaNO_3$ koncentráció mellett az aktivitás növekedését eredményezné, azonban azt

tapasztaltam, hogy szubmerz körülmények között a további emelés nem megvalósítható a közeg erősen viszkózus volta miatt.

Különböző kiindulási pH-jú tápközegekben megvalósított fermentációk eredményei alapján megállapítottam, hogy a pH beállítás nem gyakorolt szignifikáns hatást az enzimtermelésre, ezért a továbbiakban desztillált vízzel készítettem a fermentációs tápközegeket. Vizsgáltam az inokulum mennyiségének, valamint a fermentációs tápközeg mennyiségének és a névleges térfogat arányának hatását az enzim termelés alakulására, s megállapítottam, hogy 5 tf% inokulummal 1000 ml-es lombikban 150 ml fermentációs tápközeget beoltva érhető el a legnagyobb fitáz aktivitás.

Annak ellenére, hogy a felületaktív anyagok általában elősegítik az enzimek kiválasztását megfelelő koncentrációban alkalmazva, az *Aspergillus niger* F00735 törzs esetén ez a hatás nem jelentős, és a koncentráció növelése gátlólag hat az enzim aktivitására. Eredményeim alapján tehát e törzs fitáz fermentációja során felületaktív anyag kiegészítésre nincs szükség.

Az enzim tisztítását fracionált ammónium-szulfátos kicsapást követően kromatográfiás eljárások kombinációjával valósítottam meg, melynek eredményeként két enzimet kaptam, a fitáz I-t 10,5 %-ban és a fitáz II-t 4,8 %-ban sikerült kinyerni, 21-szeres illetve 4,7-szeres tisztulást elérve. A fitáz I molekulatömege 117-120 kDa körüli, míg a fitáz II molekulatömege 65-67 kDa. A fitáz I esetén az *Aspergillus* fajokra gyakran jellemző pH=5,0, míg fitáz II-nél erősen savas közegben (pH=2,5-3,5 értéknél) mérhető a maximális aktivitás. Mindkét fitáz enzim 60°C-on mutatta a legnagyobb aktivitást. Ezen a hőmérsékleten a fitáz I 1,5 óráig, míg a fitáz II 54 óráig megőrizte aktivitásának 50%-át. 50 °C-os hőmérsékleten a fitáz II aktivitása 2 hónap elteltével sem csökkent 50 % alá.

A fémionok aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata során megállapítottam, hogy a fitáz II enzimaktivitását kevésbé módosították a fémionok, mint a fitáz I enzimét. A fitáz I-re a legkedvezőbb hatással a Mg²⁺ és a Mn²⁺ voltak 5 mM koncentrációban, mely ionok jelenlétében az aktivitás több mint 2,5-szeresére nőtt. 5 mM koncentrációban alkalmazva a Cu²⁺ fitáz II esetében gátló hatású volt.

Összefoglalás

Kutatómunkám eredményei alapján a két különböző fonalas gomba eredetű fitáz enzimet értékelve (1. táblázat) megállapítottam, hogy a *Thermomyces lanuginosus* IMI 096218 törzs alkalmazásával, rövidebb fermentációs idő alatt (2-4 nap) elérhető a maximális aktivitás, mint az *A. niger* F00735 törzsszel (6-7 nap). Az inokulum tenyészet felszaporításához szükséges idő

mindkét esetben 2 nap, s megegyezik a fermentáció során a legjobb aktivitást eredményező szén- és nitrogénforrás is. *A. niger* esetén a rizsliszt koncentrációjának 7,1%-ig való növelésével az enzimtermelés még fokozódott, míg a *T. lanuginosus* gombánál 5% rizsliszt volt optimális.

1. táblázat Az *A. niger* és a *T. lanuginosus* fitáz enzim fermentációs előállítás technológiájának, tisztításának, valamint az enzimek jellemzőinek összehasonlítása

FERMENTÁCIÓS TECHNOLÓGIA			
	<i>Aspergillus niger</i> F00735		<i>Thermomyces lanuginosus</i> IMI 096218
<i>Inokulum kora, mennyisége</i>	2 nap, 5 tf%		2 nap (40 óra) 5 tf%
<i>Fermentáció ideje</i>	6-7 nap		1-2 nap
<i>Fermentáció körülményei</i>	28°C, 220 rpm		47°C, 220 rpm
<i>Szénforrás</i>	7,1% rizsliszt		5% rizsliszt
<i>Nitrogénforrás</i>	0,86% NaNO ₃		0,86% NaNO ₃
<i>Kiindulási pH</i>	nincs pH állítás pH=5,3		Tris-maleát/NaOH puffer pH=7,5
<i>Felületaktív anyag</i>	-		0,1% Tween 40
<i>Max. elért aktivitás</i>	2000 U/l		2000 U/l
ENZIM KINYERÉS ÉS TISZTÍTÁS			
<i>Kicsapás</i>	ammónium-szulfát frakcionált kicsapás		ammónium-szulfát 80 % telítettség
<i>Kromatográfias lépések</i>	ioncserés kromatográfia		hidrofób kölcsönhatású kromatográfia
	gélszűrés		hidrofób kölcsönhatású kromatográfia
	kromatofókuszálás		ioncserés kromatográfia
	hidrofób kölcsönhatású kromatográfia		
ENZIM JELLEMZÉS			
	Fitáz I.	Fitáz II.	Fitáz
<i>Molekula tömeg</i>	117-120 kDa	65-67 kDa	60 kDa
<i>Optimális hőmérséklet</i>	60°C		70°C
<i>Optimális pH</i>	5,0	2,5-3,5	5,5 , 7,5
<i>Felezési idő t_{1/2} (60 °C)</i>	1,5 h	54 h	1,5 h
<i>Felezési idő t_{1/2} (55 °C)</i>	48 h	120 h	2,25 h
<i>Aktivátor (5 mM)</i>	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ Ca ²⁺ , Co ²⁺		K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Fe ²⁺ (1 mM), Fe ³⁺ (1 mM)
<i>Inhibitor (5 mM)</i>		Cu ²⁺	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ag ⁺ , Co ²⁺

Az *A. niger* törzssel megvalósított fermentáció esetén nem szükséges a kezdeti pH beállítása, sem felületaktív detergens kiegészítés, mégis magasabb ez elérhető maximális aktivitás, mint a *T. lanuginosus* gomba alkalmazásával.

A tisztítási művelet során a kicsapást követően az *Aspergillus* esetén 4, míg a *Thermomyces* esetén 3 kromatográfiás lépés alkalmazásával sikerült megfelelő fehérje elválasztást elérnem és a kapott enzimfrakciók homogénnek bizonyultak. Az optimális hőmérsékleteket összehasonlítva megállapítható, hogy a termofil gomba esetén magasabb, 70°C hőmérsékleten maximális az enzimaktivitás, míg a mezofil gombánál szintén magas, 60°C-os hőmérsékleten mérhető a legnagyobb érték. Ezen a hőmérsékleten mind a *T. lanuginosus*, mind az *A. niger* eredetű fitáz I enzim felezési ideje 1,5 óra. Ennél nagyobb mértékű stabilitás tapasztalható fitáz II esetén, melynek felezési ideje 54 óra 60°C-on. További előnye, hogy pH optimuma az erősen savas közegre tehető, a legnagyobb aktivitás pedig pH=2,5-3,5 tartományban mérhető. Szintén savas tartomány a pH=5-5,5 érték, mely a legtöbb fitáz enzim pH optimuma, s mely mindkét gombánál is jellemző optimális érték. A Ca²⁺ és Mg²⁺ ionok 5 mM koncentrációban alkalmazva aktivátorai a *T. lanuginosus*, valamint az *A. niger* fitáz I enzimének, míg a fitáz II aktivitását nem gátolja, de nem is növeli számottevő mértékben.

Összességében elmondható, hogy mind az *A. niger* F00735, mind a *T. lanuginosus* IMI 096218 törzs alkalmazásával rizsliszten megvalósított szubmerz fermentációval extracelluláris fitáz enzim termelhető. A fiziko-kémiai és kinetikai paraméterek ismerete hozzájárul az enzim ipari alkalmazhatóságához akár az élelmiszeriparban vagy a takarmányozás során, továbbá mioinozit-foszfátok célzott létrehozásával gyógyászati területen is alkalmazást nyerhet.

Új tudományos eredmények

1. Tizennégy termofil *Thermomyces lanuginosus* fonalas gomba törzs rangsorolása alapján a legjobbnak ítélt *Thermomyces lanuginosus* IMI 096218 törzsre fitáz enzim előállítási fermentációs technológiát dolgoztam ki laboratóriumi körülmények között. Fitinsav tartalmú szubsztrátumokon - szójaliszt, búzakorpa, kukoricaliszt, rizsliszt - vizsgálva az enzimtermelést, 5% rizsliszten tapasztaltam kiemelkedő extracelluláris aktivitás értéket. Megállapítottam, hogy TRIS-maleát/NaOH pH=7,5 pufferrel készítve a tápközeget, 5 % inokulum mennyiséggel indítva a fermentációt, már 2 nap alatt elérhető a maximális enzimaktivitás. Továbbá bizonyítottam, hogy 0,1 % Tween 40 felületaktív anyag alkalmazásával az enzimkiválasztás fokozható (BUJNA et al. 2011).

2. Tizenegy mezofil *Aspergillus* törzs rangsorolása alapján, a legjobbnak ítélt *Aspergillus niger* F00735 törzs extracelluláris fitáz enzim előállítására laboratóriumi fermentációs technológiát dolgoztam ki. Különböző, fitinsav tartalmú természetes szubsztrátumokon – rizsliszt, borsóliszt, kukoricaliszt, kukoricakeményítő, kukoricadara, szójaliszt, búzaliszt és búzadara – vizsgálva az enzimtermelést, szintén rizsliszten értem el kiemelkedő aktivitás értékeket. Központi elrendezésű kísérlettervezési módszerrel optimaltam a tápközeg főbb összetevőit. 0,86% nátrium-nitrát és 7,1% rizsliszt alkalmazásával a kiindulási pH beállítása nélkül az enzimtermelés háromszorosára növekedett (BUJNA et al. 2013).

3. Homogenitásig tisztítottam a *Thermomyces lanuginosus* IMI 096218 törzs extracelluláris fitáz enzimét. SDS-PAGE gélelektroforézissel egy 60 kDa körüli, valamint egy 90 kDa körüli molekulatömegű sáv különült el, mely alapján feltételezhető, hogy az enzim multimer jellegű. Meghatároztam a tisztított fitáz enzim főbb jellemzőit: a hőmérséklet optimuma: 70 °C, pH optimuma pH=5,5 és pH=7,5. A Fe^{2+} és a Fe^{3+} 1 mM koncentrációban, a K^+ , a Ca^{2+} , és a Mg^{2+} ionok 5 mM koncentrációban aktivátorként, míg a Zn^{2+} , az Ag^+ , a Co^{2+} és a Cu^{2+} ionok 5 mM koncentrációban gátlólag hatnak az enzim aktivitására. Kinetikai paraméterei: Lineweaver-Burk féle linearizálási módszerrel: $K_M=0,285$ mM, $v_{\max}=0,126$ mM/perc, míg a Hanes-Woolf féle linearizálási módszerrel: $K_M=0,312$ mM, $v_{\max}=0,132$ mM/perc Na-fitát szubsztrátumon. Az enzim stabilitásának értékelése céljából meghatároztam annak felezési idejét, mely 54-58°C közötti tartományban pH=5,0-7,5 értékek között nagyobb mint 100 perc.

4. Homogenitásig tisztítottam az *Aspergillus niger* F00735 törzs fitáz enzimét, s két fitáz aktivitással rendelkező fehérjét (fitáz I. és fitáz II.) kaptam. A tisztított enzimek molekulatömege: 117-120 kDa (fitáz I.) és 65-67 kDa (fitáz II). Az enzimek pH optimuma: fitáz I. esetén pH=5,0, míg fitáz II.-nél pH=2,5-3,5. Mindkét fitáz enzim 60°C-on mutatta a legnagyobb aktivitást. Ezen a hőmérsékleten a felezési idők fitáz I. esetén 1,5 óra, míg a fitáz II. esetén 54 óra. 50 °C-os hőmérsékleten a fitáz II. 2 hónap elteltével is megőrizte aktivitásának 50 %-át. Megállapítottam, hogy a fitáz II. enzimaktivitását a fémionok nem befolyásolták jelentősen. A fitáz I. enzimre 5 mM koncentrációban a legkedvezőbb hatással a Mg^{2+} és a Mn^{2+} voltak.

4. Következtetések és javaslatok

A különböző eredetű fitáz enzimek tulajdonságait, katalitikus és fiziko-kémiai jellemzőit meghatározzák azon szervezetek, amelyből származnak. A mikroorganizmusok diverzitásának köszönhetően a mikrobiális fitázok igen eltérő tulajdonságokat hordozhatnak, így a felhasználási célok támasztotta környezeti feltételeknek megfelelő enzimek gazdag forrásainak tekinthetők. A tápanyagok biofelhasználhatóságának növelése érdekében alkalmazott fitáz készítménnyel szemben elvárás, hogy ellenálljon a gyomor savas pH-jának és az emésztőenzimeknek, ezáltal megfelelően bontsa a fitinsavat a bélben. Továbbá megfelelő stabilitással kell, hogy rendelkezzen a takarmány előállításánál fellépő hőhatással szemben és megőrizze aktivitását. Takarmányozási célra ennek megfelelően az *A. niger* F00735 törzs fitáz II enzime ígéretesnek látszik, mivel pH optimuma 2,5 és 3,5 közötti tartományban található, mely 50°C-on vizsgálva ilyen körülmények között, 2 hónap után is megtartotta aktivitásának felét.

A fitáz enzim újkeletű és fejlődő területe a humán gyógyászatban való alkalmazása. A fitinsavból megfelelő fitáz enzimmészítmények alkalmazásával kedvező hatású mioinozitol-foszfát intermedierek állíthatók elő, melyek bizonyítottan jótékony élettani hatásúak. A daganatos betegségek kezelésébe való bevonásukról számos kutatási eredmény található, melyekben elsődlegesen a mioinozitol-trifoszfátoknak tulajdonítanak nagy jelentőséget. A különböző eredetű fitáz enzimek lebontási mechanizmusuk szerint csoportosíthatóak, amelyek lehetnek 3-fitázok, 4/6-fitázok és 5-fitázok. Ezek különböző lebontási útvonalakat, ezáltal különböző szerkezetű mioinozitol-foszfátokat eredményezhetnek. A fonalas gomba eredetű fitázokra jellemző, hogy a 3-fitázok közé tartoznak, azonban az elért eredményeim nem elegendők a tisztított enzimek besorolásához. A téma továbbfejlesztéseként javasolható ezirányú enzimmalkalmazási kísérleteket tervezni. A hidrolízis termékek analíziséből következtethetünk az adott enzimek mechanizmusára, továbbá léptéknövelést követően az egyes intermedier termékek preparatív HPLC technológiával elválaszthatóak és szerkezet meghatározásuk NMR technikával elvégezhető. A foszfor csoportok helyzete és jelenléte információt ad az elsődleges támadási helyről, valamint a szekvenciálisan megvalósuló foszfátészterek hidrolíziséről, mely alapján az enzimek besorolhatók. Ezen ismeretek birtokában lehetővé válhat a biokonverzió során kapott mioinozitol-foszfátok gyógyászati tesztelése is.

Kapott eredményeim alapján jelentős különbségeket találtam az *A. niger* és a *Thermomyces lanuginosus* eredetű fitáz enzimek között. Tekintve, hogy bőséges irodalmi adat áll

rendelkezésünkre az *A. niger* eredetű fitáz enzimekre vonatkozóan, ezeknek a vizsgálatoknak elvégzése különösen fontos lenne a *Thermomyces* eredetű enzim esetében.

5. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Bujna, E., Kukovics, F., Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M. (2013). Rice flour as potential carbon source for production of phytase by *Aspergillus niger*. *Acta Aliment.* 42: 1-9

E. Bujna, C. Siklodi, J.M. Rezessy-Szabó. (2011). Effects of surfactants on production of phytase from *Thermomyces lanuginosus*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 58: 130.

Nguyen D Q, Sujtó N M, **Bujna E**, Rezessy-Szabó J M (2010): Production of extracellular inulinase by *Thermomyces lanuginosus*: Optimisation of media compositions and environmental conditions. *J. Biotechnol.* 150: (S1) pp. 321-322.

Rezessy-Szabó, J.M., Nguyen, D.Q., **Bujna, E.**, Takács, K., Kovács, M., Hoschke, Á. (2003): *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b strain as rich source of α -galactosidase enzyme. *Food Technol. Biotechnol.*, **41**:55–59

Rezessy-Szabó, J.M., **Bujna, E.**, Hoschke Á. (2002): Effect of different carbon and nitrogen sources on α -galactosidase activity originated from *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b. *Acta Aliment.*, **31**:73-82

Konferencia kiadványban megjelent összefoglalók

Magyar nyelvű

Bujna E., Kozma L., Rezessy-Szabó J.M. (2009): Mikrobiális fitáz enzim alkalmazási és előállítási lehetőségei. Lippay János - Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak. Budapest, (Absztrakt: 38-39. október 28-30)

Bujna, E., Szalma, A., Nguyen, D.Q., Rezessy-Szabó, J.M. (2007): *Aspergillus* eredetű fitáz enzimek jellemzése. Lippay-Ormos-Vas Nemzetközi Tudományos Ülésszak, Budapest 46-47

Bujna, E., Szappanos, J., Rezessy-Szabó, J.M., Nguyen, D.Q., Hoschke, Á. (2004): Fonalas gomba fitáz enzim termelése és tisztítása. MMT Nagygyűlés és X. Fermentációs Kollokvium. Keszthely

Rezessyné, Szabó J., **Bujna, E.**, Hoschke, Á. (2000): Különböző szén- és nitrogén források hatása *Thermomyces lanuginosus* eredetű α -galaktozidáz enzim termelésére. Lippay-Vas Tudományos Ülésszak, Budapest

Rezessyné Szabó J., Nguyen, D.Q., **Bujna, E.**, Rónaszéki, G., Hoschke, Á. (1998): Glükóamiláz enzim előállítása *Thermomyces lanuginosus* fonalas gombával. Lippay János – Vas Károly Nemzetközi Tudományos Ülésszak, Budapest

Nguyen, D.Q., Hoschke, Á., **Bujna, E.**, Kiss, Zs., Rezessyné Szabó J.M. (1998): *Thermomyces lanuginosus* termofil gomba amilolitikus enzimeinek kinyerése, elválasztása és jellemzése. Lippay János-Vas Károly Nemzetközi Tudományos Ülésszak, Budapest

Idegen nyelvű

E. Bujna, Q. D. Nguyen, L. Kozma, A. Szalma, J.M. Rezessy-Szabó. (2011). Production and Characterisation of Phytases from Mesophilic and Thermophilic Fungi. Chinese-European Cooperation for a Long-Term Sustainability. 10-11. NOVEMBER - BUDAPEST, HUNGARY

Bujna E., Kozma L., Nguyen, D.Q., Rezessy-Szabó J.M. (2009): Production and purification of extracellular phytase from *Thermomyces lanuginosus*. 2nd Central European Forum for Microbiology. Acta Microbiol. Immunol. Hung., **56**: 132, Keszthely

Bujna, E., Szalma, A., Nguyen, D.Q., Rezessy-Szabó, J.M. (2007): Production and purification of extracellular phytase from *Aspergillus niger*. 15th International Congress of the Hungarian Society of Microbiology. Acta Microbiol. Immunol. Hung., **54**: S18-S19

Könyvfejezet

Q. D. Nguyen, **E. Bujna**, Á. Hoschke, J. M. Rezessy-Szabó. 2011. Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*: Current Review on Potential Source for Thermostable Enzymes. Chapter II. In: Biotechnology of Microbial Enzymes. Editors: Vijai Kumar Gupta and Manimaran Ayyachamy. Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-62100-131-7, pp 21-56