

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

KERESKEDELMI FORGALOMBAN KAPHATÓ PROBIOTIKUS BAKTÉRIUMOK
GALAKTOZIDÁZ ENZIMEINEK TANULMÁNYOZÁSA

Doktori értekezés

HAVAS PETRA

Témavezetők: Rezessyné Dr. Szabó Judit
Dr. habil. Nguyen Duc Quang

Budapest
2014.

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Felföldi József**
egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem,
Élelmiszertudományi Kar,
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezetők: **Rezessyné Dr. Szabó Judit**
egyetemi magántanár
Dr. habil. Nguyen Duc Quang
egyetemi docens
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Sör- és Szeszipari Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezetők jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2014. október 7-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Dr. Biacs Péter, DSc

Tagjai

Halász Anna, DSc

Kosáry Judit, DSc

Kovács Erzsébet, CSc

Simonné Sarkadi Livia, DSc

Opponensek

Takács Krisztina, PhD

Pomázi Andrea, CSc

Titkár

Styevkó Gabriella

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..... | 3 |
| 1. BEVEZETÉS..... | 5 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS..... | 7 |
| 2.1 Probiotikumok..... | 7 |
| 2.1.1 Bifidobaktériumok | 12 |
| 2.1.1.1 Általános jellemzés | 12 |
| 2.1.1.2 Anyagcsere folyamatok..... | 15 |
| 2.1.2 Tejsavbaktériumok..... | 21 |
| 2.1.2.1 Általános jellemzők..... | 21 |
| 2.1.2.2 Anyagcsere folyamatok..... | 23 |
| 2.2 Prebiotikumok | 26 |
| 2.3 Galaktozidáz enzimek | 29 |
| 2.3.1 Alfa -galaktozidáz enzim | 30 |
| 2.3.1.1 Előfordulása | 30 |
| 2.3.1.2 Szubsztrátum specifitás | 31 |
| 2.3.1.3 Alfa-galaktozidáz enzim szerkezete..... | 32 |
| 2.3.1.4 Hatásmechanizmus..... | 35 |
| 2.3.1.5 Alfa-galaktozidáz enzim kinyerési és tisztítási lehetőségei | 38 |
| 2.3.1.6 Enzim működését befolyásoló tényezők | 40 |
| 2.3.1.7 Alkalmazás | 43 |
| 2.3.2 Béta-galaktozidáz enzim | 45 |
| 2.3.2.1 Előfordulás | 45 |
| 2.3.2.2 Szerkezete | 46 |
| 2.3.2.3 Hatásmechanizmus..... | 48 |
| 2.3.2.4 Enzim működését befolyásoló paraméterek..... | 50 |
| 2.3.2.5 Alkalmazás | 52 |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK..... | 55 |
| 3.1 Alkalmazott törzsek..... | 55 |
| 3.2 Tápközegek | 55 |
| 3.3 Tenyésztési módszerek..... | 57 |
| 3.3.1 Törzsfenntartás..... | 57 |
| 3.3.2 Enzimfermentációs kísérletek | 57 |
| 3.4 Sejtfeltárás | 58 |
| 3.5 Élősejtszám meghatározás..... | 58 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.6 | Galaktozidáz enzim aktivitások meghatározása..... | 59 |
| 3.7 | Fehérjetartalom meghatározása..... | 60 |
| 3.7.1 | Bradford módszer..... | 60 |
| 3.7.2 | 280 nm-en történő fényelnyelésen alapuló módszer..... | 61 |
| 3.8 | Enzim lokalizációjának meghatározása..... | 61 |
| 3.9 | Enzimtisztítási eljárások..... | 61 |
| 3.9.1 | Alkalmazott kromatográfiás módszerek | 61 |
| 3.9.2 | Ultraszűrés | 63 |
| 3.10 | Az enzim jellemzéséhez alkalmazott módszerek | 63 |
| 3.10.1 | Molekulatömeg meghatározása..... | 63 |
| 3.10.2 | A hőmérséklet és a pH optimum meghatározása | 64 |
| 3.10.3 | Enzimstabilitás meghatározása | 64 |
| 3.10.4 | Ionok hatása az enzimaktivitásra..... | 64 |
| 4. | KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK | 65 |
| 4.1 | Sejtfeltárás optimalálása..... | 65 |
| 4.2 | Tejsavbaktérium törzsek galaktozidáz enzim szintézisének kimutatása és indukálása .. | 66 |
| 4.2.1 | <i>Lactobacillus casei</i> 01 törzs β -galaktozidáz enzim szintézise..... | 66 |
| 4.2.2 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 α -galaktozidáz szintézise | 68 |
| 4.2.3 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 β -galaktozidáz szintézise | 72 |
| 4.3 | <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 probiotikus törzs galaktozidáz aktivitásai | 75 |
| 4.3.1 | A β -galaktozidáz | 75 |
| 4.3.2 | Alfa-galaktozidáz | 78 |
| 4.3.3 | <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 törzs alfa-galaktozidáz enzimének tisztítása | 80 |
| 4.3.4 | <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 eredetű alfa-galaktozidáz enzim jellemzése..... | 84 |
| 4.3.4.1 | Molekulatömeg | 84 |
| 4.3.4.2 | pH és hőmérséklet optimum..... | 85 |
| 4.3.4.3 | Az enzim stabilitásának vizsgálata..... | 86 |
| 4.3.4.4 | Ionok hatása az alfa-galaktozidáz aktivitásra..... | 89 |
| 4.4 | Új tudományos eredmények | 90 |
| 5. | KÖVETKEZTETÉSEK ÉS AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTHATÓSÁGA..... | 93 |
| 6. | ÖSSZEFOGLALÁS | 95 |
| 7. | SUMMARY | 99 |
| 8. | FELHASZNÁLT IRODALOM | 103 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC transzport rendszer

Asp

ATP

CTAB

F6PPK

FOS

Fru

Gal

GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue)

GIT

Glu

Glü (G)

GOS

GPH

GRAS (Generally Recognized as Safe)

HPLC

IBD

IL

Inu

Lakt (L)

L-ara

L-Ram

Mal

Man

Mel (M)

MIC

Mtol

N-Aga

PEP

PTS

Raff (R)

Rib

SCFA (Short-chain fatty acid)

SDS

Szach

Szal

Szor

TLC (Thin Layer Chromatography)

Tre

Tke

Xil

ATP-kazetta kötő transzport rendszer

Aszparaginsav

Adenozin-trifoszfát

Cetil-triamónium-bromid

Fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz

frukto-oligoszacharid

Fruktóz

Galaktóz

Gyomor-bélrendszerhez kapcsolódó nyirok szövet

Gasztrointesztinális traktus

Glutaminsav

Glükóz

Galakto-oligoszacharid

Galaktozid-pentóz hexuronid

Általánosan biztonságosnak tartott

Nagy teljesítményű folyadék kromatográfia

Gyulladásos bélszindróma

Interleukin

Inulin

Laktóz

L-arabinóz

L-Ramnóz

Maltóz

Mannóz

Melibióz

minimális gátló koncentráció

Mannit

N-acetilglükózamin

Foszfoenolpiruvát

Foszfotranszferáz

Raffinóz

Ribóz

Rövid szénláncú zsírsav

Nátrium-dadecil-szulfát

Szacharóz

Szalicin

Szorbit

Vékonyréteg kromatográfia

Trehalóz

Telepképző egység

Xilóz

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben az intenzív biotechnológiai kutatásoknak köszönhetően egyre több enzim ipari előállítását oldották meg, amelyek meghatározó jelentőséggel bírnak az ipari, a gyógyászati, az analitikai és a diagnosztikai területeken. Mivel az enzimes katalízis nemcsak régióspecifikus, hanem stereospecifikus is, lehetővé válik, hogy az enzimes technológiával olyan terméket állíthassunk elő, amely kémiai úton csak nagy költséggel oldható/valósítható meg. Továbbá a kutatók, fejlesztők előtt megnyílnak a lehetőségek olyan technológiák kidolgozására, amelyek hatékonyak, energiatakarékosak és környezetkímélők. A többi területhez hasonlóan az élelmiszeriparban is dinamikusan zajlik az enzimes technológiák bevezetése és megvalósítása. Így a galaktozidáz enzimeket is, amelyek a galaktozidos kötések bontását katalizálják, egyre széleskörűbben alkalmazzák az élelmiszer- és gyógyászati iparban. Az α -galaktozidáz enzim segítségével lebontható a raffinóz és a melibióz, amely gátolja a szacharóz kristályosodását, ezáltal növelhető a kihozatal. Továbbá, a szójatípusú galakto-oligoszacharidok lebonthatók az α -galaktozidáz enzimmel, valamint a galaktomannán gélesítő tulajdonságainak javításában, a Fábry betegség kezelésében vagy a vércsoport átalakításában is alkalmazzák az α -galaktozidáz enzimet. A β -galaktozidáz enzimet a tejben lévő laktóz bontására, a laktóz tartalmú termékek technológiai és érzékszervi tulajdonságainak javítására, valamint a transz-galakto-oligoszacharidok (TrGOS) előállítására alkalmazzák.

A galaktozidáz enzimek megfelelő körülmények között (nagy galaktóz koncentráció, kis vízakaktivitás, stb.) a hidroláz aktivitásuk mellett transzgalaktozidáz aktivitással rendelkeznek, amely segítségével különböző polimerizáltságú galakto-oligoszacharidok szintetizálhatók. A szénhidrát lánchossza nagyban függ az alkalmazott enzim tulajdonságától. Ezen oligoszacharidok szelektíven támogatják a probiotikus baktériumok (*Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek) szaporodását és aktivitását, így prebiotikumnak tekinthetők. Jelenleg a kereskedelembe kapható ipari béta-galaktozidáz enzimmészítmények *Aspergillus* spp. vagy *Kluyveromyces lactis* eredetűek. Bár ezen mikroorganizmusok rendelkeznek GRAS státusszal, azonban az általuk szintetizált TrGOS-t nem lehet automatikusan prebiotikumnak tekinteni, hiszen nemcsak a biztonság, hanem a szelektivitás és a stabilitás is fontos kritériumok. Felvetődik a gondolat, hogy a probiotikus mikroorganizmus által szintetizált galaktozidáz enzimekkel kellene TrGOS-ot előállítani, így növelhető annak esélye, hogy az prebiotikum lehessen. Egy másik innovatív megoldás lehet a prebiotikus TrGOS előállítása a probiotikus szabad/rögzített sejtek alkalmazásával. Az így kapott termékeket integrált szinbiotikumoknak nevezzük.

A fermentált probiotikus termékek előállításánál a leggyakrabban alkalmazott probiotikumok a *Lactobacillus acidophilus* La-5, *L. casei* 01 és a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzsek, mivel ezen probiotikumok kedvező élettani hatásai (bélrendszeri fertőzések megelőzése, laktóz intolerancia tüneteinek enyhítése, koleszterinszint csökkentés, immunmoduláló hatás, stb.) mellett kiváló technológiai előnyökkel is rendelkeznek. Noha a szakirodalomban számos tanulmány foglalkozik a technológiai tulajdonságaikkal és az élettani hatásaikkal, nagyon kevés az enzimrendszerükre vonatkozó ismeretünk. Pedig ezen alapismeretek fontos információkkal szolgálhatnak elsősorban a prebiotikum és a szinbiotikum tervezésében.

A fenti gondolatok motiváltak arra, hogy a PhD kutatásomban mélyebben foglalkozzam a három fontos probiotikus starter kultúra (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *L. casei* 01 és *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) α - és β -galaktozidáz enzimével.

Célkitűzések

- ❖ Kereskedelmi forgalomban kapható és alkalmazott probiotikus törzsek (*L. acidophilus* La-5, *L. casei* 01 és *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12) alfa- és béta-galaktozidáz enzim szintézis mechanizmusának tanulmányozása
 - Különböző kémiai szerkezetű szénhidrátok hatásának vizsgálata
 - Szaporodás és enzimszintézis közötti kapcsolatok feltárása
 - Lokalizációjuk meghatározása
 - Optimális induktor koncentráció megállapítása
- ❖ Enzimfermentáció léptéknövelése
- ❖ *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs eredetű alfa-galaktozidáz enzim kinyerése és homogenitásig történő tisztítása
- ❖ Az enzimfehérje jellemzése
 - Molekulatömeg becslése
 - Optimális működési feltételek meghatározása
 - Stabilitás vizsgálata
 - Ionok hatása a tisztított enzim működésére

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Probiotikumok

Probiotikumoknak nevezik mindazokat a humánbarát bélbaktériumokat, amelyek többféle jótékony hatással gyakorolnak a gazdaszervezet egészségi állapotára [Vasiljevic & Shah, 2008]. A probiotikumok köre egyre bővül, de ipari célra általában a tejsavbaktérium és a bifidobaktérium törzseket használják [Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2011]. Az alkalmazott fajok között nem találhatók patogén fajok [Picard *et al.*, 2005]. Továbbá, nagy részük (a régebben használtak 2–30 %-a, a napjainban használtak akár 80–85 %-a is) túléli a gyomorban lévő savas közeget, a vékonybélben pedig az epesavak és az emésztőenzimek pusztító hatását, így életképes formában jutnak el a vastagbélbe, ahol elszaporodhatnak és kolonizálhatják a bélnyálkahártyán [Szakály, 2004; Vasiljevic & Shah, 2008].

Ahhoz, hogy egy baktérium lehessen probiotikum, különböző kritériumoknak kell eleget tennie [Ouweland *et al.*, 1999]. Ilyenek:

- Ellenállás a gyomorsavnak és az epesavaknak.
- Jó tapadás a bélnyálkahártya felszínhez.
- Élelmiszeripari és klinikai használata biztonságos.
- Klinikai vizsgálatok alapján az egészségügyi hatás dokumentálása.
- Jó technológiai tulajdonságok.

A probiotikumokkal szembeni követelmények folyamatosan változnak. A WHO 2001-es határozata alapján ma már nem kritérium a humán eredet és a bélnyálkahártyához való tapadó képesség megléte sem. A probiotikumok számos kedvező élettani tulajdonságát az 1. táblázatban foglalom össze. A probiotikumok, mint például az élelmiszeriparban alkalmazott bifidobaktériumok és a laktobacillusok, nagy mennyiségben szintetizálnak β -galaktozidáz enzimet, amely katalizálja a laktóz lebontását. csökkenthető vagy laktózmentesíthető a tejtermékben lévő tejcukor tartalma, amely felel a laktóz intolerancia tüneteért [de Verse & Marteau, 2007; Shah, 2006; He *et al.*, 2007, Jiang *et al.*, 2006]. Bizonyították, hogy a probiotikus baktériumok az epesavak dekonjugálásával csökkentik a szérum koleszterin szintjét a bélben [Turpin *et al.*, 2010]. Rövid-szénláncú zsírsavak (SCFA) termelésével a gyomor-bélrendszerhez kapcsolódó nyirok szöveteket (GALT) táplálják és hatnak az elhízás ellen [Shah, 2006]. Egészséges bélműködést biztosítanak, valamint az antimutagén és az antikarcinogén tulajdonságaikkal csökkentik a vastagbélrák kialakulásának a kockázatát [Shah, 2006; Leahy *et al.*, 2005, Szakály, 2004, Granato *et al.*, 2010; Savard *et al.*, 2011].

1. táblázat: Probiotikumok kedvező élettani hatásai

| Probiotikus hatás | Hivatkozás |
|--|---|
| Bélbaktériumok modulációja | de Verse & Marteau, 2007 |
| A rotavírus okozta hasmenés tüneteinek csökkentése/megelőzése | de Verse & Marteau, 2007 |
| Az antibiotikumos kezelés következtében fellépő hasmenés csökkentése illetve megelőzése | Rolfe, 2000; de Verse & Marteau, 2007 |
| A laktóz-intolerancia tüneteinek enyhítése | de Verse & Marteau, 2007; Shah, 2006; He <i>et al.</i> , 2007, Jiang <i>et al.</i> , 1996 |
| A gyomor- és béltraktusban gyulladásos fertőzést okozó <i>Helicobacter pylori</i> növekedésnek visszaszorítása | de Verse & Marteau, 2007; Rolfe, 2000 |
| Gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek panaszainak enyhítése | de Verse & Marteau, 2007; Rolfe, 2000, Vasiljevic & Shah, 2008; Shah, 2006, Turpin <i>et al.</i> , 2010 |
| Karcinogenezis megelőzése | Vasiljevic & Shah, 2008, Djouzi <i>et al.</i> , 1997; Goldin <i>et al.</i> , 1992, Marteau <i>et al.</i> , 1990 |

Antimikrobás aktivitásuk és bélrendszeri fertőzések megelőzése

A bifidobaktériumok és tejsavbaktériumok szerves savakat, hidrogén-peroxidot és bakteriocineket, mint antimikrobás anyagokat termelnek/termelhetnek, mellyekkel visszaszorítják a patogén mikroorganizmusok szaporodását és aktivitását.

A tejsav és ecetsav többmint 90%-át teszik ki a bifidobaktériumok által termelt szerves savaknak, melyek csökkentik a bélben uralkodó pH-t és így fejthetik ki bactericid és bakteriosztatikus hatásukat az enteropatogén *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* és *Clostridium perfringens* fajokkal szemben [Shah, 2006]. Állat kísérletek során egy *B. longum* törzsről kimutatták, hogy visszaszorította a *S. typhimurium* szaporodását [Leahy *et al.*, 2005]. Továbbá a kísérleti egerek táplálékában található *B. breve* és *B. pseudocatenulatum* törzsek gátolták az akár halált is okozó shiga toxint termelő *E. coli* O157:H7 törzs fertőzését [Leahy *et al.*, 2005].

A *L. acidophilus* La-5 (Christian Hansen cég által forgalmazott) törzsről kimutatták, hogy antibakteriális (acidocin-CH₅), illetve egyéb gátló anyagokat termel (pl. tejsav, H₂O₂), melyek számos káros, patogén baktérium, illetve bizonyos gomba fajok (pl. *Candida*) ellen hatnak [Möller & de Vrese, 2004].

Az antibiotikummal történő kezelések okozta hasmenés kialakulásának megelőzésére hasznos lehet a probiotikus baktériumok fogyasztása. Ezen hasmenésért elsősorban a *C. difficile* felelős, mely kis számban honos az egészséges bélmikrobiotában. Az antibiotikumos kezelés hatására

megnövekszik arányuk és toxintermelésük miatt hasmenést okozhatnak [Shah, 2006]. Sheu és munkatársai [2006] vizsgálták a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 és *L. acidophilus* La-5 törzseket tartalmazó AB joghurtok hatását a *Helicobacter pylori* aktivitására, és megállapították, hogy a 4 hetes előkezelés hatásra hatékonyabbá válhat az antibiotikumok kezelése.

A gyermekeknél kialakult hasmenésért nagyon sok esetben rotavírus a felelős. Saavedra és munkatársai [1994] kimutatták, hogy a *B. bifidum* és a *Streptococcus thermophilus* törzsek együttes alkalmazásával csökkenthető a rotavírusos megbetegedések száma [Leahy *et al.*, 2005]. Továbbá a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs fogyasztásával megelőzhető gyermekeknél a fent említett hasmenés, valamint csökkenthető a kialakult megbetegedés időtartalma [Shah, 2006].

Az *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* és *Shigella* törzsek által okozott hasmenéses megbetegedések (úgynevezett „utazók hasmenése”) kialakulása azonban bifidobaktériumok és más probiotikus baktériumokkal együttesen alkalmazva csökkenthetővé válhat. Leahy és munkatársai [2005] arról számoltak be, hogy 71 %-ról 43 %-ra csökkent az Egyiptomba látogató turisták hasmenéses megbetegedése a kapszula formájában elfogyasztott probiotikus törzsek (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. bifidum*) metabolizmusának köszönhetően.

Laktóz-intolerancia tüneteinek enyhítése

A világ lakosságának több mint kétharmada szenved laktóz-intoleranciában [Leahy *et al.*, 2005]. A laktóz (tejcukor) a tejben és a tejtermékekben előforduló diszacharid, melyet a laktáz nevű enzim alakít át a vékonybélben felszívódó cukrokká, glükózzá és galaktózzá. A laktáz enzim (béta-galaktozidáz) nem megfelelő működésének vagy teljes hiányának következtében a tejcukor nem emésztődik meg, nem szívódik fel, koncentrációjának megfelelően vizet szív a bélbe és tejfogyasztást követően hasmenést okoz. Így azon személyek, akiknél a laktóz felszívódása nem megfelelő gyakran panaszkodnak gyomor görcsökre, diszkomfort érzetre a friss nem fermentált tej, vagy tejtermékek elfogyasztását követően.

A *Bifidobacterium longum* egyes esetekben enyhíti, a laktóz intolerancia tüneteit [Shah, 2006]. Jiang és munkatársai [1996] vizsgálták, hogy a *B. longum* törzseket (B6 és ATCC 15708) 5×10^8 tke/ml koncentrációban tartalmazó termékek hogyan hatnak a laktóz intoleranciában szenvedő személyek tüneteire. Megállapították, hogy a *B. longum* törzset tartalmazó tejek elfogyasztását követően csökkentek a páciensek leheletében a hidrogén koncentráció és a laktóz malabszorpciónak tünete is. A legjobb eredményt abban a kísérleti beállításban tapasztalták, mikor a törzset csak laktóz szénhidráttal kiegészített tápközegben szaporították fel és így magasabb β -galaktozidáz enzim aktivitást indukálva, növelte a laktóz lebontását. A bifidobaktériumokkal kiegészített étrend pozitív hatását szintén tapasztalták He és munkatársai

[2007] is, amikor 11 kínai laktóz-intoleranciában szenvedő páciens bél mikrobiótájának metabolikus aktivitását vizsgálták. A *B. longum* (kapszula formájában) és a *B. animalis* (joghurtban) törzseket használták fel a vizsgálandó alanyok étrendjének kiegészítésére. Kimutatták, hogy mindkét bifidobaktérium törzs megjelent a kísérleti alanyok bélmikrobiótájában, továbbá a páciensek tünetei is enyhültek [He *et al.*, 2007].

Szerepük a rák megelőzésében

A közelmúltban egyre nagyobb figyelmet kap/kapott a probiotikumok köztük is bifidobaktériumok és a laktobacillusok antimutagenitás, antigenotoxicitás és antikarcinogenitással kapcsolatos tulajdonságainak felderítése. A mutagének kialakulását okozhatja a stressz, a vírusos vagy a bakteriális fertőzés, illetve a fagocitózis. Endogén DNS károsodás jöhet létre az öregedés során a korral járó degeneratív betegségek miatt. Az emberi szervezet védelmi mechanizmusa során a leukociták NO, O⁻² és H₂O₂ szabadítanak fel így védve a szervezetet a bakteriális és a vírusos fertőzésektől, de e folyamatban fellépő hiba következtében a DNS károsítását és a mutációját is indukálhatja. A DNS-ben létrejövő visszafordíthatlan hibák kritikus tényezői a sejt öregedésének, illetve a daganatképződésnek [Vasiljevic & Shah, 2008].

Kimutatatták [Turpin *et al.*, 2010], hogy egyes *Lactobacillus* törzsek 5 mechanizmus által fejthetnek ki védőhatást a karcinogenezis ellen:

1. A karcinogén anyagok szintetizálódásának folyamatát katalizáló enzimek (béta-glükuronidáz, azoreduktáz, ureáz, nitroreduktáz) működésének gátlása
2. Xenobiotikumokat metabolizáló enzimek modulálása
3. A karcinogén anyagok székletbe és/vagy vizeletbe történő kiválasztódásának elősegítése
4. Az általuk termelt antioxidáns anyagokkal a sejt mutáció megelőzése
5. A kóros sejtek elhalásának, apoptózisának elősegítése

A *Lactobacillus*-ok esetében számos irodalom beszámol arról, hogy gátolják a rákos sejtek kialakulásáért felelős enzimek aktivitását [Djouzi *et al.*, 1997; Goldin *et al.*, 1992, Marteau *et al.*, 1990]. A *L. rhamnosus* GG törzs fogyasztásának hatására a bélbaktériumok β -glükuronidáz aktivitása 80%-kal csökkent az emberi szervezetben, míg patkányokkal végzett kísérleteknél a *L. casei* DN 114001 hatására ezen enzim aktivitása 50%-ra csökkent [Djouzi *et al.*, 1997; Goldin *et al.*, 1992]. Marteau és munkatársai [1990] *L. acidophilus* A1 és mellette *B. bifidum* B1 törzset tartalmazó fermentált termékek elfogyasztását követően figyelték meg a bélsár nitroreduktáz

aktivitásának csökkenését, mely csökkenést az életképes *L. acidophilus* A1 törzs jelenléte idézte elő. Továbbá Hirayama és Rafter [2000] epidemiológiai kutatásaik alapján kiemelték, hogy a probiotikumok bevitele csökkentheti a vastagbélrák előfordulását. Bifidobaktériumokkal végzett állat modelleken végrehajtott kísérletek során kimutatták, hogy csökkentik a béta-glükuronidáz, az azoreduktáz és a nitroreduktáz enzimek aktivitását [Vasiljevic & Shah, 2008]. Ebben a tanulmányban megállapították, hogy a bifidobaktériumok bizonyos genotoxikus kémiai vegyületek aktivitását csökkentik és növelik az antimutagén tevékenységet [Vasiljevic & Shah, 2008]. Számos tényezőt már sikerült meghatározni, amelyek felőssé tehetőek a colorectalis rák kialakulásáért, mint például a baktériumok anyagcseréje során keletkező genotoxikus vegyületek (a nitrozamin, a heterociklikus aminok, a fenolos vegyületek és az ammónia).

A probiotikumok antimutagenitás és antikarcinogenitás mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Egyik lehetséges mechanizmus lehet, hogy megváltoztatják a bél mikroökológiáját, ezáltal annak metabolikus aktivitását és normalizálhatják a bélfal átteresztőképességét, valamint fokozzák az immunitást [Shah, 2006].

Gyulladásos bélszindróma megelőzésében betöltött szerep

A gyulladásos bélszindróma (IBD) a gyulladásos betegségek közé sorolható és számos tünete ismert: gyulladás, fekélyek, hasi fájdalmak (melyek oka lehet a rendellenesre szűkülő gyomor-bél traktus), hasmenés és komoly esetekben a gyomor, illetve bélrendszeri vérzés is kialakulhat. Két fenotípusa ismeretes az IBD-nek egyik a *colitis ulcerosa* a másik a Crohn-betegség, mindegyik krónikus, kiújuló betegség. Amennyiben az érintett egyén hajlamos rá az életének későbbi szakaszában akár vastagbél rák is kialakulhat [Vasiljevic & Shah, 2008, Turpin *et al.*, 2010]. Azoknál az embereknél, akik IBD-ben szenvednek a *Lactobacillus*-ok és *Bifidobacterium*-ok száma jóval kisebb, mint a kokkoidok és más anaerob baktériumokké. Ennél a betegségnél általában kortikoszteroidos kezelést alkalmaznak, de a gyógyszeres hatás fokozható probiotikumok fogyasztásával. A *B. breve* és *L. plantarum* együttes hatását vizsgálva megállapították, hogy azok a betegek, akik probiotikumot kaptak a kezelés során javultak a tüneteik, szemben a probiotikumokkal nem kezelt személyekkel.

Allergiás betegek tüneteinek enyhítése

A probiotikumok jótékony tulajdonságai között megemlíthető az allergiás betegek tüneteinek enyhítése is. Általában nagyobb hatás érhető el a gyermekeknél, mint felnőtteknél, mivel a megfelelő immunrendszer kialakításban a baktériumoknak fontos szerepük van, legfőképpen a bél limfoid szöveteiben [Turpin *et al.*, 2010]. Normál körülmények között a csecsemő GALT még steril (fejletlen) a terhesség alatt, és az anyai környezet segíti elő a kezdeti Th2

immunválaszt a csecsemőkben, mely a szülést követően átáll egy nem allergiás Th1 típusú immunválaszra és ezt követően alakul ki az újszülött bélmikrobiotája. Az 1-13 éves gyermekek csoportjában vizsgálták, hogyha napi kétszer 10^{10} *L. rhamnosus* 19070-2 és *L. reuteri* DSM 12246 sejtet visznek be, akkor ez hasznos lehet az atópiás dermatitis (AD) kezelésében, de jelentős változásokat nem tapasztaltak a Th2 citokin interleukinek (IL) IL-2, IL-4 és a szabályzó citokin IL-10 termelésében [Turpin *et al.*, 2010].

Szív-és érrendszeri betegségek megelőzésében betöltött szerep

A probiotikus baktériumok csökkentik a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázatát is. A magas vérnyomás kialakulását gátolják az angiotenzin konvertáló enzim inhibitor (ACEi) segítségével. Az enzim gátlásával csökkenthetők a magas vérnyomás veszélyeit. Az angiotenzin része a rennin-angiotenzin rendszernek, mely serkenti az aldosterol kiáramlását és így növeli a Na^+ ion, valamint a víz kiáramlását. Ezek a tényezők érszűkületet és vérnyomás emelkedést okoznak. A magas koleszterin szint az epesók lebontása révén csökkenthető [Turpin *et al.*, 2010]. Fuglsang és munkatársai [2003] patkányokkal végzett kísérletek során kimutatták, hogy a *L. helveticus* CHCC637 és a CHCC641 törzsek gátolták az angiotenzin II konverzióját, amelyen keresztül a magas vérnyomás csökkenthető.

Néhány probiotikus törzs képes a magas koleszterin szint kialakulását meggátolni úgy, hogy elősegítik a máj koleszterin felhasználását az epesó hidrolázok segítségével. *In vitro* körülmények között kimutatták, hogy egyes *L. acidophilus* törzsek a sejtek növekedése során koleszterint vesznek fel és így annak szintjét csökkentik a tápközegben. Ez a felvétel akkor valósult meg, amikor a törzset anaerob körülmények között epe jelenlétében szaporították. Állatkísérleteket végzett Park és kutatócsoportja [2007] *in vivo* körülmények között és azt tapasztalták, hogy a mesterségesen előidézett magas koleszterin szinttel rendelkező patkányoknál a *L. acidophilus* ATCC 43121 törzs fogyasztása csökkentette a patkányok koleszterin szintjét [Turpin *et al.*, 2010].

2.1.1 Bifidobaktériumok

2.1.1.1 Általános jellemzés

Az emberi bélrendszerben körülbelül 10^{13} – 10^{14} baktérium található, amelyek közül a legtöbb obligát anaerob, beleértve a klosztridiumokat, eubaktériumokat és a bifidobaktériumokat. A bifidobaktériumok természetes lakói a humán vastagbélnek, különösen nagy mennyiségben az anyatejjel táplált, egészséges csecsemők bélrendszerében fordulnak elő nagy mennyiségben [Lee *et al.*, 1999], a mikrobiota körülbelül 80 %-át teszik ki, míg a felnőtteknél ez az érték csak 25 %-ra tehető [Picard *et al.*, 2005]. Ez a csökkenés a vegyes táplálkozásra történő átállás miatt

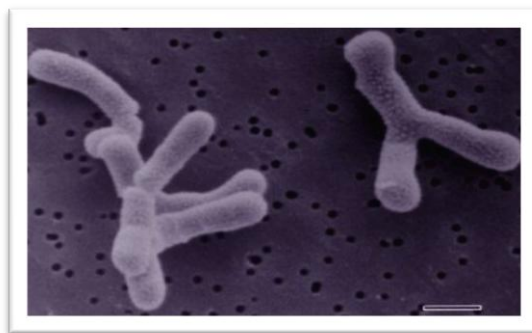
következik be, és az életkor előrehaladtával tovább fokozódik. Azért, hogy a bifidobaktériumok kedvező részarányát a bélmikrobiotában megőrizzük, kétféle stratégiát alkalmazhatunk. A probiotikus megközelítés szerint megfelelő számú bifidobaktériumot tartalmazó élelmiszer fogyasztása, míg a prebiotikus koncepció szerint pedig az élelmiszer olyan oligoszachariddal, vagy oligoszacharidokkal (bifidogén faktor, vagy prebiotikum) való kiegészítése, amely/amelyek szelektíven elősegítik a bélben élő endogén bifidobaktériumok szaporodását és aktivitását [Alander *et al.*, 2001]. Az élelmiszerek között egyre nagyobb számban jelennek meg olyan termékek, amelyek probiotikumokat és prebiotikumokat egyaránt tartalmaznak, ezeket szinbiotikus termékeknek nevezzük. Bifidobaktériumot először Tissier izolált csecsemő bélsárból és a *Bacillus bifidus* nevet adta neki [Biavati *et al.*, 2000]. Rendszertanilag, bifidobaktériumok a *Bifidobacteriales* rendhez tartozó, Gram pozitív baktériumok, melyek DNS-e nagy G+C tartalmú (55-67%). Ehhez a rendhez tartoznak még a *Corynebacterium*, *Mycobacterium* és a *Streptomyces* nemzetségek is [Leahy *et al.*, 2005; Gomes & Malcata, 1999]. Előfordulásuk alapján is csoportosíthatjuk a bifidobaktérium fajokat. Ezek közül a szakirodalomban leggyakrabban fellelhető fajokat a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat: Különböző bifidobaktériumok előfordulási helye

| Fajok | Előfordulási hely | Referencia |
|---|---|--|
| <i>B. adolescentis</i> | csecsemő, és felnőtt bélsár, szarvasmarha bendő, vagina | Leahy <i>et al.</i> , 2005 Shah, 2006 |
| <i>B. angulatum</i> | felnőtt bélsár | Leahy <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>B. animalis</i> | patkány, csirke, nyúl, borjú bélsár, szennyvíz | Biavati <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> | Joghurt | Ventura <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>B. bifidum</i> | felnőtt, és csecsemő bélsár és vagina | Leahy <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>B. breve</i> | csecsemő bélsár, vagina, szennyvíz | Biavati <i>et al.</i> , 2000 Shah, 2006 |
| <i>B. catenulatum</i> | felnőtt, és csecsemő bélsár és vagina | Leahy <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>B. cuniculi</i> | nyúl bélsár | Leahy <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>B. dentium</i> | szájüreg, felnőtt bélsár | Biavati <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>B. infantis</i> | csecsemő bélsár és vagina | Leahy <i>et al.</i> , 2005 Shah, 2006 |
| <i>B. animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> | fermentált tej | Biavati <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>B. longum</i> | felnőtt és csecsemő bélsár, vagina, szennyvíz | Biavati <i>et al.</i> , 2000 Shah, 2006 |
| <i>B. mininum</i> | szennyvíz | Ventura <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>B. subtile</i> | szennyvíz | Leahy <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>B. thermophilum</i> | malac, csirke bélsár, szarvasmarha bendő | Biavati <i>et al.</i> , 2000 |

A 2. táblázat adatai alapján a bifidobaktériumok mind a humán, mind az állati bélsárban és testüregekben is előfordulnak.

A bifidobaktériumok szigorúan anaerob mikroorganizmusok, azonban néhány oxigén toleráns törzset is izoláltak már [Arunachalam, 1999; Gomes & Malcata 1999; Leahy *et al.*, 2005]. Morfológiailag a bifidobaktériumok nem mozgó, nem spóráképző pálca alakú baktériumok, általában ívelt, bunkós, Y alakúak [Leahy *et al.*, 2005]. A jellemző morfológiájukat a 1. ábrán mutatom be a *Bifidobacterium adolescentis* faj példáján keresztül.



1. ábra: *Bifidobacterium adolescentis* pásztázó elektronikus mikroszkópos képe
(<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium>)

A bifidobaktériumok növekedésének optimális hőmérsékleti tartománya 37-41 °C között található, de néhányuk szaporodhatnak 20 °C alatt és 46 °C felett is [Biavati *et al.*, 2000]. Az egyetlen kivétel a *B. thermacidophilum* faj, mely jól szaporodik 49,5 °C-on is. Savtoleránsak, de optimális szaporodási pH-juk 6,5–7,0 között található, 4,5 pH alatt csak a *B. thermacidophilum* növekedik. Sejtfaluk tipikus Gram pozitív struktúrájú, ahol vastag peptidoglükán réteg N-acetil-muraminsav-N acetil-glükózamin szénhidrát láncához L-alanin, D-glutaminsav, L-ornitin és D-alanin aminosavakat tartalmazó tetrapeptid rész kapcsolódik, de néhány fajnál az ornitint a lizin helyettesíti [Biavati *et al.*, 2000]. A bifidobaktériumok sejtfalának murein részéhez kovalensen kapcsolódó poliszacharid rétegét glükóz, galaktóz és ramnóz alkotja. Mennyiségi és minőségi különbségek vannak azonban a fajok, törzsek genetikai tulajdonságainak megfelelően, valamint a növekedési feltételektől függően [Biavati *et al.*, 2000]. A bifidobaktériumok általában rezisztensek néhány antibiotikumra, mint például a kanamicin, neomicin, nalidixsav, polimixin B, gentamicin, sztreptomycin és metronidazol. Ez a közös jellemzőjük valószínűleg kromoszomálisan kódolt. Egyes törzsek érzékenyek bizonyultak ampicillinre, G-penicillinre, erythromycinre, cepharosporinra, bacitracinra, chloramphenicolra, clindamycinre, nitrofurantoinra és tetraciklinre nézve [Biavati *et al.*, 2000].

2.1.1.2 Anyagcsere folyamatok

Szénhidrát metabolizmus

A membrán transzport folyamatok közül a cukor molekula három különböző mechanizmus révén juthat át a citoplazmamembránon:

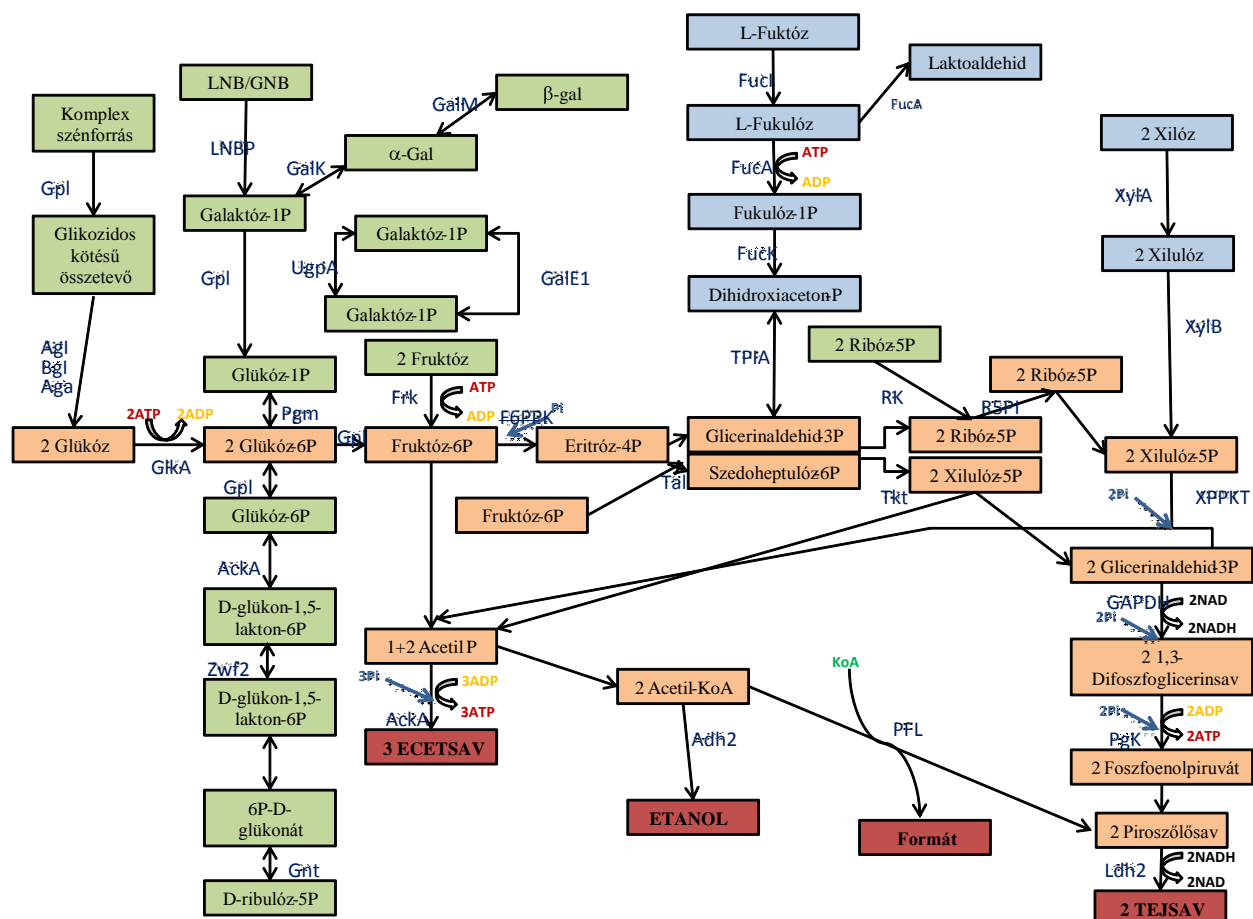
- A sejten belülre juthat PEP transzporttal: ez a rendszer magába foglalja a cukor transzlokációját és a foszforilációját is.
- ATP-kötött rendszerrel: ehhez szükséges energia a foszfát rész hidrolizálásából származik
- Fém vagy proton szimporttal [Krewinski *et al.*, 1997].

Az előbb említett transzport folyamatok segítségével a bifidobaktériumok hasznosítják a táplálékokban található azon szénhidrátokat, amelyek a bélrendszer felső szakaszán nem bomlanak le és szívódnak fel, hanem változatlanul jutnak el a vastagbélbe.

A bélrendszerben élő mikroorganizmusok kommenzalista közösséget alkotnak és nagy változatosságuknak köszönhetően különböző anyagcsereutakat követnek és képesek lebontani a komplex szénhidrátokat is. E komplex szénhidrátok lehetnek étrendi (élelmiszer) összetevők, mint például a rezisztens keményítő, cellulóz, hemicellulóz, glikogén, galaktán, xilán, pullulán, pektin és a gumik, illetve a gazdaszervezetből származó összetevők: mucin, glikoszfingolipid, kondroitin-szulfát, hialuronsav és heparin vagy a gasztrointesztinális traktus (GIT) más mikrobái által előállított egyéb szénforrások is.

Az elfogyasztott nem-emészthető szénhidrátok mennyisége és jellege közvetlen hatással van a metabolikus aktivitásra, valamint a GIT-ban lévő mikrobák számára és összetételére. A bélrendszer mikrobái hasznosítják a sokféle táplálkozási forrásból származó növényi eredetű oligo- és poliszacharidokat, amelyek lebontását az erre alkalmas enzimek katalizálják. A bifidobaktériumok genomjába szerveződő génekből következtethetünk, hogy milyen jól alkalmazkodtak az emberi GIT-hez. Ezt tükrözi az is, hogy különböző szénhidrátok bontásában résztvevő enzimeket kódoló gének is megtalálhatók a genomban, mint például a glikozilhidroláz, a cukor ATP-kazetta kötő transzport rendszer (ABC transzport rendszer) és a foszfoenolpiruvát-foszfotranszferáz (PEP-PTS) rendszere.

A bifidobaktériumok eltérően a tejsavbaktériumoktól egy úgynevezett „bifid shunt” anyagcsere úton bontják le a hexózokat (2. ábra).



2. ábra: Sematikus ábrája a bifidobaktériumokra jellemző „Bifid útnak”
[Pokusaeva et al., 2011 nyomán]

Acka: acetát kináz, **Adh2:** aldehyd-alkohol dehidrogenáz 2, **Aga:** α-galaktozidáz, **Agl:** α-glukozidáz, **Bgl:** β-glukozidáz, **Gale1:** UDP-glukóz 4-epimeráz, **GalK:** galaktokináz, **GalM:** galaktóz mutarotáz, **GAPDH:** glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz C, **Gika:** glukokináz, **Gnt:** 6-foszfoglukonát dehidrogenáz, **Gpi:** glukóz 6-foszfát izomeráz, **Frk:** fruktokináz, **F6PPK:** fruktóz 6-foszfoketoláz, **FucI:** L-fukóz izomeráz, **FucK:** L-fukulóz kináz, **FucA:** L-fukulóz-1P aldoláz, **FucO:** laktaldehyd reduktáz, **Ldh2:** laktát dehidrogenáz, **LNBp:** lakto-N-bióz foszforiláz, **Pgk:** foszfogliserin kináz, **Pgm:** foszfoglükomutáz, **Pfl:** formát acetiltranszferáz, **Rk:** ribokináz, **R5PI:** ribóz-5-foszfát izomeráz, **R5PE:** ribulóz-5-foszfát epimeráz, **Tal:** transzaldoláz, **Tkt:** transzketoláz, **TpiA:** triózfoszfát izomeráz, **UgpA:** UTP-glukóz-1-foszfát uridilil-transzferáz, **XPPKT:** xilulóz-5-foszfát/fruktóz-6-foszfát foszfoketoláz, **XylA:** xilóz izomeráz, **XylB:** xilulóz kináz, **Zwf2:** glukóz-6-foszfát 1-dehidrogenáz, **Pi:** foszfát

Anyagcseréjük folyamán a hexózokból tejsavat, ecetsavat, etanolt és hangyasavat állítanak elő. A bifid úton kulcsfontosságú szerepet játszik a fruktóz-6-foszfoketoláz (F6PPK) enzim (E.C. 4.1.2.2.), amely a *Bifidobacteriaceae* család rendszertani besorolásnál biokémiai markernek tekinthető. A komplex szénhidrátokat először glikozidos kötéseket tartalmazó összetevőkre bontják, majd további enzimek szükségesek a különböző érendi, illetve gazdaszervezet eredetű szénhidrátok lebontásához. Így a „bifid úton” keresztül lehetővé válik, hogy több ATP-t termeljenek, mint a fermentatív úton energiát nyerő tejsavbaktériumok. elméletileg egy mol glukózból 2,5 mol ATP-t nyernek 1,5 mol acetát és 1,0 mol laktát képzése mellett. Ellenben a

homofermentatív tejsavbaktériumoknál 1 mol glükózból csak 2 mol ATP és 2 mol laktát keletkezik. A heterofermentatív tejsavbaktériumok azonban csupán 1 mol ATP, 1 mol tejsav és 1 mol etanol előállítására képesek. A bifidobaktériumok esetében a keletkezett tejsav és acetát arány fajok és törzsek szintjén eltérő lehet [Pokusaeva *et al.*, 2011].

A *Bifidobacterium* törzsek mindegyike hasznosítja a glükózt és a fruktózt, valamint nagy részük a galaktózt, és a ribózt. Galaktóz jelenlétében egy törzs (*B. minimum* YITH4097) mutatott gyenge növekedést így nem is bizonyult galaktóz hasznosítónak [Pokusaeva *et al.*, 2011]. A vizsgált szénhidrátok közül csak a glükózt, fruktózt, szacharózt, maltózt hasznosította. Bizonyították, hogy a *B. breve* NCTC11815 azonban nem hasznosította a ribózt. A bifidobaktériumok cukor hasznosítása a PEP-PTS rendszeren csak kis mértékben, míg túlnyomó részt az ABC transzporterén keresztül történik.

Ezt követően a szénhidrátok intracelluláris enzimek segítségével hidrolizálódnak, deacetilálódnak, foszforilálódnak, illetve transzglikozilálódnak. A vizsgált törzsek túlnyomó többsége 2, illetve 3 monomerből álló összetett cukrokat is erjesztik, mint például a szacharóz, maltóz, melibióz és a raffinóz [Pokusaeva *et al.*, 2011].

A 3. táblázatban feltüntetett bifidobaktérium törzsek nem fermentálták az L-arabinózt, a ramnózt, a N-acetilglukózamint, a szorbitot, a melezitózt, a trehalózt, a glicerint, a xilitet és az inulint [Pokusaeva *et al.*, 2011].

A laktóz bontásáért felelős béta-galaktozidáz enzimszintézis mechanizmusát az *E. coli* faj esetében részletesen tanulmányozták [Matthews, 2005]. E miatt a *lac* operon felépítése és működése számos prokariótánál már ismertnek tekinthető. A bifidobaktériumok esetében azonban még hiányosak az ismereteink. Hung és munkatársai [2002] tanulmányozták a *B. infantis* HL96 törzs béta-galaktozidáz kódoló génjét és megállapították, hogy legalább 3 izoenzimet kódoló gén található genomjában. Bár a fehérjeszekvencia nagymértékű hasonlóságot mutatott a LacZ (*lac* operonban található) által kódolt béta-galaktozidáz szekvenciával, de bebizonyították, hogy a β Gal-II gén nem a *lac* operonban található. Továbbá fehérjeszinten a *B. infantis* eredetű β Gal-II 98 %-ban hasonlóságot mutatott a *B. longum* eredetűéhez. A β Gal-III aminosav szekvenciája pedig nagyon közel áll a LacG típusú fehérjéjéhez. Ez a gén szintén nem a *lac* operonban található. Smart és munkatársai [1993] különbséget tapasztaltak laktóz hasznosítása során a béta-galaktozidázt kódoló gének között. Továbbá megállapították, hogy a bifidobaktériumok glükóz metabolizmusa eltér az *E. coli* baktériumétól.

3. táblázat: Néhány bifidobaktérium törzs szénhidrát hasznosítása [Pokusaeva *et al.*, 2011]

| SZÉNHIDRÁTOK | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|------|------|------|-----|-------|-----|-----|------|------|-----|
| TÖZSEK | L-ara | Rib | Xil | Gal | Fru | Man | Glü | L-Ram | N-Aga | Szor | Szal | Lakt | Mel | Szach | Mal | Tre | Raff | Mtol | Inu |
| <i>B. breve</i> UCC2003 | - | + | - | + | + | +/- | + | - | +/- | - | +/- | + | + | + | + | - | + | Na | - |
| <i>B. breve</i> JCM7017 | - | + | Na | + | + | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na |
| <i>B. breve</i> JCM7019 | - | + | Na | +/- | + | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na | Na | - | Na | Na | Na | Na | Na |
| <i>B. breve</i> NCFB2258 | - | + | Na | + | + | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na |
| <i>B. breve</i> NCIMB8815 | - | + | Na | + | + | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na | Na | - | Na | Na | Na | Na | Na |
| <i>B. breve</i> NCTC11815 | - | +/- | Na | + | + | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na |
| <i>B. breve</i> NCFB2275 | - | + | Na | + | + | Na | + | Na | Na | Na | Na | Na | Na | +/- | Na | Na | Na | Na | Na |
| <i>B. longum</i> NCC2705 | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | - | Na |
| <i>B. indicum</i> JCM1302 | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | +/- | - |
| <i>B. dentium</i> JCM 1195 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - |
| <i>B. minimum</i> JCM5821 | - | Na | - | Na | Na | - | Na | Na | Na | Na | - | Na | Na | Na | + | Na | - | Na | Na |
| <i>B. minimum</i> YITH4097 | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| <i>B. asteroides</i> JCM8230 | + | Na | +/- | Na | Na | +/- | Na | Na | Na | Na | + | Na | Na | Na | +/- | Na | + | Na | Na |
| <i>B. crudilactis</i> LMG 23609 | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | Na | + | + | + | + | - | + | - | - |

+; pozitív növekedés; -: nincs növekedés; +/-: gyenge növekedés; Na: Nem vizsgált

A bifidobaktérium eredetű alfa-galaktozidáz enzim genetikai hátterének megismerésével részletesen még nem foglalkoztak, azonban a *B. breve* UCC2003 törzs szénhidrát

hasznosításának (laktóz kivételével) genetikai hátterét számos kutatócsoport részletesen tanulmányozta [Pokusaeva *et al.*, 2011]. A *B. breve* UCC2003 törzs genomja számos olyan struktúrgént tartalmaz, amelyek a glikozidos kötések bontásában, módosításában, illetve létrehozásában szerepet játszó enzimeket kódolnak. Ezen struktúrgének az 4. táblázatban feltüntetett operonokba rendeződnek.

4. táblázat: *B. breve* UCC2003 szénhidrát metabolizmusért felelős gének, illetve operonok [Pokusaeva *et al.*, 2011]

| Gén/gén operon | Kódolt enzim | Szubsztrátum |
|-------------------|---------------------------------|--|
| <i>fos operon</i> | β -fruktofuranozidáz | FOS, szacharóz |
| <i>fru operon</i> | EII enzim a PTS-PEP rendszerben | fruktóz |
| <i>apuB</i> | amilopullulanáz | keményítő, amilopektin glikogén, pullulán |
| <i>galA</i> | endogalaktanáz | Paradicsom galaktán |
| <i>agl1</i> | α -glükózidáz | pannóz, izomaltóz, izomaltotrióz, szacharóz izomerek |
| <i>agl2</i> | α -glükózidáz | pannóz, izomaltóz, izomaltotrióz, szacharóz izomerek |
| <i>rbs operon</i> | ribokináz | ribóz |
| <i>cld operon</i> | β -1,4-glükózidáz | cellobióz, cellodextrin |

A *B. breve* UCC2003 törzsnél vizsgálták a ribóz által indukált transzkripciót és megállapították, hogy a *rbsABCDK* gén klaszter felelős a ribóz metabolizmusáért. A *fos* operon kódolja a β -fruktofuranozidáz enzimet, amelynek szintézise függ a másodlagos szénhidrát jelenlététől. Abban az esetben, amikor a *B. breve* törzset Actilight-on (egyfajta oligofruktóz) vagy szacharózon tenyésztették a *fos* operon expresszálta a β -fruktofuranozidáz enzimet [Pokusaeva *et al.*, 2011]. Ellenben mikor a tápközeg nem tartalmazott sem Actilight sem szacharóz szénhidrátot abban az esetben nem történt meg az expresszió. További kísérletekkel bizonyították a glükóz és a fruktóz katabolit repressziós tulajdonságát a vizsgált *B. breve* törzs β -fruktofuranozidáz enzim szintézisére is [Pokusaeva *et al.*, 2011].

Antimikrobás anyagok termelése

A bifidobaktériumok anyagcseréjük folyamán szerves savak mellett más antimikrobás anyagokat is előállíthatnak, ilyenek a bakteriocinek. Néhány szakirodalom arról számol be, hogy a megtermelt szerves savak csak részben felelősek az antimikrobás hatásért [Martinez *et al.*, 2013].

A bifidobaktériumok néhány patogén baktériummal szemben antagonista hatással rendelkeznek, például az *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica* fajok egyes törzsei. E gátló hatás a termelődő tejsav és ecetsav hatására valósul meg [Makras & De Vuyst, 2006].

Egyes esetekben az antimikrobás aktivitás nem a termelt szerves savaknak köszönhető, hanem peptid jellegű összetevőknek. Kevés információ áll még rendelkezésünkre ez aktív hatóanyagok természetéről és hatásmechanizmusáról. Az első *Bifidobacterium* törzs amely bakteriocinnek vélt anyagot – bifidint - termelt a *Bifidobacterium bifidum* NCDC 1452 volt. Aminosav analízist követően megállapították, hogy a peptid gazdag fenilalaninban és glutaminsavban míg kevesebb treonint, aszparaginsavat, szerint, glicint, prolint, izoleucint és leucint tartalmaz [Martinez *et al.*, 2013]. Saleh és El-Sayed [2004] számoltak be két a kereskedelemben is használt *B. lactis* Bb-12 és a *B. longum* Bb-46 bakteriocinnek vélt peptid szintéziséről, melyeket bifilact Bb-12 és bifilong Bb-46 néven tartanak számon. E két bakteriocin jelentős gátló hatást fejtett ki a *Staphylococcus aureus*, *S. typhimurium*, *B. cereus* és az *E. coli* törzsekkel szemben. A részben tisztított bifilact Bb-12 és bifilong Bb-46 bakteriocinek minimális gátló koncentrációi (MIC) rendre 40 és 20 mg/ml volt a *S. aureus*-sal, míg 20 és 16 mg/ml volt az *E. coli* törzsszel szemben.

A *Bifidobacterium bifidum* NCBFB 1454 törzsnél a korai stationer fázisban Bifidocin B bakteriocin termelést mutattak ki. Ez a bakteriocin mokoluka jó sav- és hőtüő, de a proteolitikus hatással szemben érzékeny [Yildirim *et al.*, 1999]. A *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602 törzs egy bifidin I. nevű részben szekvenált bakteriocint termelt [Cheikhoussef *et al.*, 2010]. A *B. longum* DJO10A törzs a lantiobiotikumok közé sorolt bisint állít elő [Lee *et al.*, 2011].

Nitrogén anyagcsere

A bifidobaktériumok proteolitikus metabolizmusának feltérképezésével foglalkozó kutatások még nem annyira kiterjedtek, mint a tejsavbaktériumoké. A *B. cuniculi* és a *B. suis* fajoknak szüksége van az exogén szerves nitrogénforrásra a növekedéshez. Matteuzzi és munkatársai a *B. bifidum* alanin, valin, aszpartát és treonin termeléséről számoltak be *in vitro* körülmények között [Arunachalam nyomán, 1999].

Vitamin szintézis

A humán eredetű bifidobaktériumok növekedéséhez általában B vitaminokra (B₁ vitamin (tiamin), B₆ vitamin (piridoxin), B₉ vitamin (folsav) és B₁₂ vitamin (cianokobalamin)) van szükség. Azonban szintetizálják a K vitamint és a legtöbb vízben oldható B vitamint: a biotint (B₇), a kobalamint (B₁₂), a folsavat (B₉), a nikotinsavat (B₃), a piridoxint (B₆), a riboflavint (B₂), és a tiamint (B₁) is [Leblanc *et al.*, 2013].

Deguchi és munkatársai tanulmányozták a bifidobaktériumok vitamin szintézisét, eredményeiket az 5. táblázatban foglalom össze [Arunachalam nyomán, 1999]

5. táblázat: Különböző bifidobaktérium fajok vitamin szintézise

| Vitaminok | <i>B. adolescentis</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>B. breve</i> | <i>B. infantis</i> | <i>B. longum</i> |
|--|------------------------|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|
| Tiamin (B₁) [µg/ml] | 0,02 | 0,23 | 0,09 | 0,2 | 0,09 |
| Folsav [µg/ml] | 0,01 | 0,058 | 0,008 | 0,04 | 0,02 |
| Piridoxin (B₆) [µg/ml] | 0,043 | 0,046 | 0,02 | 0,059 | 0,42 |
| Nikotin (B₃) [µg/ml] | 0,17 | 1,04 | 0,39 | 1,23 | 0,61 |
| Cianokobalamin (B₁₂) [µg/ml] | 0,35 | 0,65 | 0,49 | 0,39 | 0,46 |
| C-vitamin [µg/ml] | a.k. | n.s. | a.k. | a.k. | a.k. |
| Biotin [µg/ml] | a.k. | n.s. | a.k. | a.k. | a.k. |

a.k.: kis koncentráció **n.s.:** nincs szintézis

Riboflavint egyik faj sem szintetizált. Nikotin szintézisben is eltérő eredményeket kaptak, a legnagyobb koncentrációban a *B. infantis* törzs szintetizálta (1,23 µg/ml), míg a *B. bifidum* 1,04 µg/ml-t. Ezzel szemben a *B. adolescentis* mindössze 0,17 µg/ml nikotint termelt. A *B. longum* a többi törzshöz képest, mintegy 10-szer nagyobb koncentrációban szintetizálta a piridoxint.

2.1.2 Tejsavbaktériumok

2.1.2.1 Általános jellemzők

A *Lactobacillales* rendje rendszertanilag a Gram pozitív valódi baktériumok *Firmicutes* törzsének *Bacilli* osztályához tartozik.

[<http://patricbrc.org/portal/portal/patric/TaxonomyTree?cType=taxon&cId=186826>].

Molekuláris filogenetikai osztályozással a rend további hat családra (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostoccaceae*, *Streptococcaceae*) osztható, melyekbe összesen huszonhét nemzetség tartozik. Az ide tartozó fajok spórátlanok, endotoxinokat nem termelnek, oxidáz és kataláz negatívak. Többnyire fakultatív anaerob életformák, ami azt jelenti, hogy oxigén jelenlétében és attól elzártan is működik katabolikus anyagcseréjük. Mindkét esetben tejsavas erjesztéssel nyerik a működésükhöz szükséges energiát (obligát erjesztők), ennek oka az, hogy a sejtekben nem működik a citromsav-ciklus.

A tejsavbaktériumok számos fajánál leírtak olyan törzseket, amelyeknek kedvező tulajdonságai lehetővé teszik probiotikumként való alkalmazásukat. Tudományos kísérletek támasztják alá, hogy túlélnek ez emberi emésztőrendszerben uralkodó környezetet (elviselik a pH=4 értéket és a 20 %-os emberi epét 1 órán át), sőt áthaladásuk során további hasznos anyagokat (antioxidánsok és antimikrobás anyagok) termelnek [Ljungh & Wadström, 2006]. A vastagbél elérésével megtelepszenek és szaporodnak (pl. kötődni tudnak a mucinhoz, kötést létesítenek a mátrix fehérjékkel). Bizonyítottan jótékony hatással vannak az immunrendszerre (pl. fokozzák a fagociták működését, β -galaktozidázt termelnek, így enyhítik, a laktóz intolerancia kellemetlen tüneteit), ezáltal fontos szerepük lehet bizonyos bél- és emésztőrendszeri megbetegedések megelőzésében, leküzdésében [Ljungh & Wadström, 2006].

A *Lactobacillus* nemzetség

A tejsavbaktériumok a legnagyobb fajszerű nemzetsége (~80 faj), amely több csoportra osztható élettani és molekuláris tulajdonságok alapján. Az ide tartozó fajok közös tulajdonsága a tejsavas erjesztés, azonban ennek módja szerint három csoportot különböztethetünk meg.

1. obligát heterofermentatívok pl. *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*,
2. obligát homofermentatívok pl. *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*,
3. fakultatív heterofermentálók pl. *L. plantarum*, *L. casei*, *L. pentosus*.

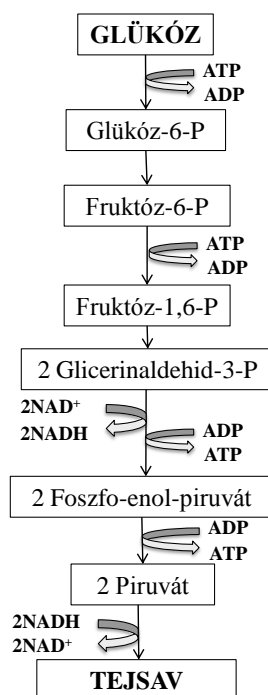
Molekuláris jellemzők alapján nyolc filogenetikai csoportra osztható ez a nemzetség (*L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. coryniformis*), amelyek egy-egy jellegzetes képviselőjükről kapták a nevüket. A csoportok az erjesztési mód tekintetében elég vegyes összetételűek. Természetes élőhelyük mind az emberi, mind az állati szervezet és a növényeken is előfordulnak. Több *Lactobacillus* fajhoz tartozó törzs rendelkezik probiotikus tulajdonságokkal [Deák, 2006].

A *Lactobacillus acidophilus* természetes lakója az emberi szervezetnek. Elsőként Moro izolálta mesterségesen táplált csecsemő székletéből 1900-ban [Deák, 2006]. Az emberi emésztőrendszer felső- és alsótraktusában is megtalálható a homofermentatív, Gram-pozitív tejsavbaktérium [Itsaranuwat *et al.*, 2003]. Az élelmiszer-gyártásban felhasználják, elsősorban tejtermékek tartósítására (pl. kefir, joghurt). A *L. acidophilus* számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, melyek lehetővé teszik probiotikumként való alkalmazását [Ljungh & Wadström, 2006].

2.1.2.2 Anyagcsere folyamatok

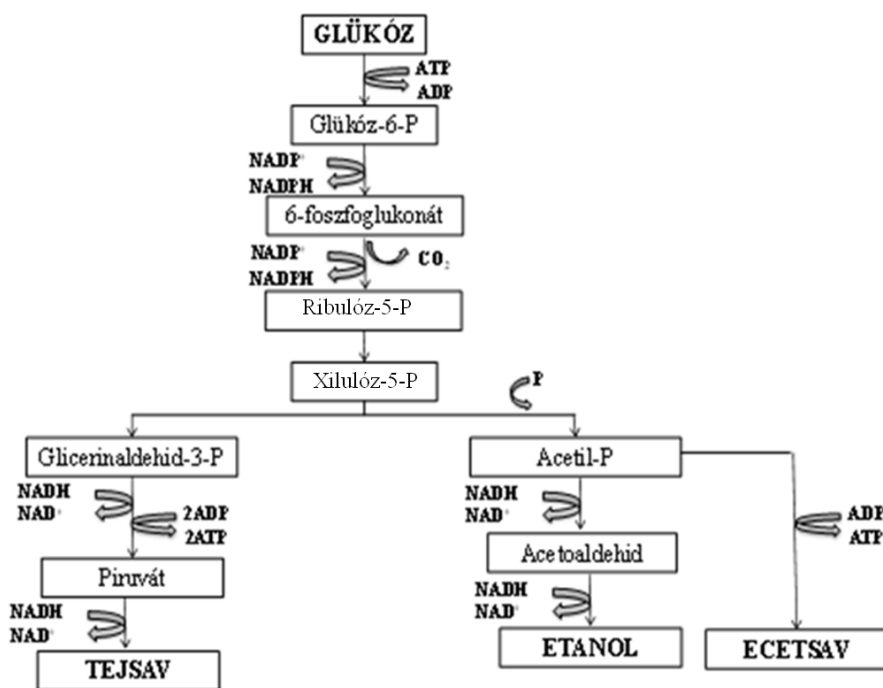
Szénhidrát metabolizmus

A tejsavbaktériumok általános tulajdonsága hogy tejsavas erjesztéssel nyerik az energiát. Az obligát homofermentálók esetében glikolízis szerint történik a glükóz erjesztése, amely során a keletkezett piroszőlősav közvetlenül tejsavvá redukálódik (3. ábra). Ezen folyamat fontos feltétele, hogy a sejtben a fruktóz-difoszfát aldoláz működjön, mely a fruktóz-1-6-difoszfát gliceraldehid-foszfáttá történő átalakítását katalizálja.



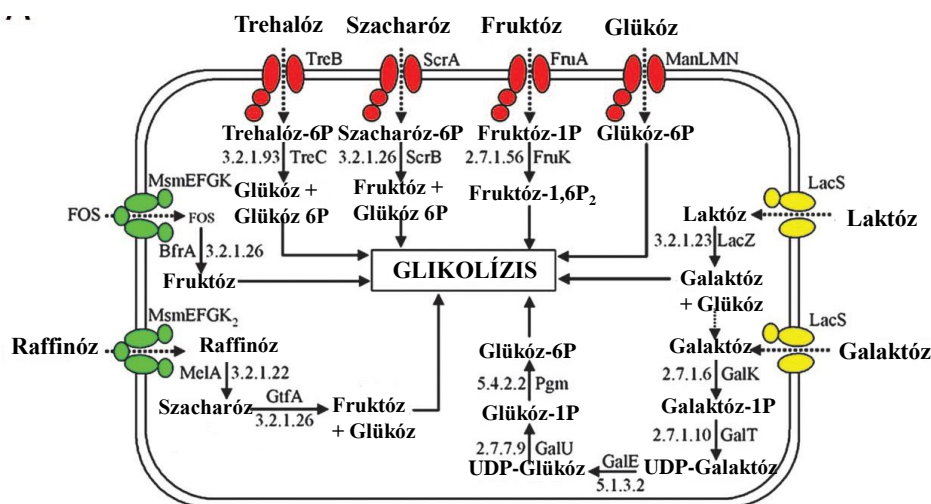
3. ábra: A homofermentatív erjesztés vázlata

A heterofermentálók a tejsav mellett etanolt, CO₂-t és ecetsavat is képeznek anyagcseréjük során (4. ábra). A glükózt a pentóz-foszfát cikluson keresztül alakítják át xilulóz-5-foszfáttá, amelyet a foszfoketoláz enzimük acetil-foszfátra és glicerinaldehid-foszfátra hasít. Az előbbi vegyületből piroszőlősavon keresztül képződik a tejsav, viszont az utóbbi átalakulhat közvetlenül ecetsavvá vagy acetaldehiden keresztül etanollá. A végtermékek mennyisége fajoként eltérő.



4. ábra A heterofermentatív tejsavas erjesztés vázlata

Barrangou és munkatársai [2006] vizsgálták a *Lactobacillus acidophilus* NCFM törzs különböző szénhidrát hasznosításának genetikai hátterét. Eredményei alapján a fruktóz transzportja a sejtbe PTS transzporter segítségével történik és fruktóz 1-foszfáttá alakul. A szacharóz felvételében három gén vesz részt a La399, a La400 és a La401. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a szacharóz a PTS transzporter segítségével jut a sejtbe szacharóz-6-foszfát formájában, majd glükóz-6-foszfáttá és fruktózzá hidrolizálódik. A *FOS* operonban hat struktúrgén található, amelyek a következők: La502, La503, La504, La506 (MsmEFGK, ABC transzporter) La505 (BfrA, β -fruktozidáz) La507 (GtfA, szacharóz-foszfohidroláz). Megállapították, hogy a FOS az ABC transzporterrel jut be a sejtbe, ahol hidrolizálódik β -fruktozidáz enzim segítségével fruktózzá és szacharózzá. Az így keletkező szacharózt az előbbieken említett szacharóz-foszfátáz enzim bontja le glükóz-6-foszfáttá és fruktózzá. A raffinóz metabolizmusát tanulmányozva arra a következtetésre jutottak, hogy a raffinóz lokuszon lévő gének a La1442, La1441, La1440, La1439 (MsmEFGK₂, ABC transzporter), La1438 (MefA, α -galaktozidáz) és a La1437 (GtfA₂, szacharóz-foszforiláz) felelnek e a szénhidrát hasznosításáért [Barrangou *et al.*, 2006].



5. ábra: *Lactobacillus acidophilus* szénhidrát hasznosítása [Barrangou *et al.*, 2006]
(piros: PTS transzport; sárga: GPH (galaktozid-pentóz hexuronid) transzport, zöld: ABC transzport)

A laktóz és a galaktóz szénhidrátok hasznosításában a *La1463* (*LacS*, permeáz), *La1462* (*LacZ*, β -galaktozidáz); *La1461* (hipotetikus fehérje) *La1460* (felületi fehérje); *La1459* (*GalK*, galaktokináz); *La1458* (*GalT*, galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz); *La1457* (*GalM*, galaktóz epimeráz); *La1467-La1468* (*LacLM*, β -galaktozidáz nagy és kicsi egység); *La1469* (*GalE*, UDP-glükóz epimeráz) vesznek részt [Barrangou *et al.*, 2006]. A *L. acidophilus* szénhidrát hasznosításának összefoglalóját az 5. ábrán szemléltem. A FOS és raffinóz az ABC transzporter, a trehalóz, szacharóz, glükóz és fruktóz a PTS transzporter, míg a laktóz és galaktóz pedig a GPH transzporter rendszereken keresztül juthatnak be a citoplazmába.

Abban az esetben, amikor a mikrobának egyszerre többféle szénhidrát áll rendelkezése a szén katabolit represszió (CCR) segítségével először a gyorsabban metabolizálható szénhidrátot hasznosítja. A katabolit represszió egy összetett szabályozási rendszer, amelyben több mechanizmus is lezajlik. Érdekes, hogy a két fő baktérium törzs a *Enterobacteriaceae* és a *Firmicutes* esetében eltérő módon működik a katabolit represszió. Azonos, hogy mindkét esetben megtalálható a PEP (foszfoenolpiruvát): szénhidrát foszfortranszfer rendszer (PTS), mely a szállítja és foszforilálja a szénhidrátokat [Deutscher, 2008].

Ásványi sók adszorpciója

Annak ellenére, hogy a klorid ion hiánya az emberi szervezetben elég ritka, általában a hányást és a hasmenést követően előfordulhat, amelynek eredménye az általános gyengeség és az alacsony vérnyomás. Borthakur és munkatársai [2008] megállapították, hogy a *L. acidophilus* 4375 és *L. rhamnosus* 53103 növelték a Cl^-/OH^- ionok mennyiségét a vizsgált Caco-2 sejtekben és így növelték a klorid ion felvételét. Egy másik kutatócsoport szerint a *L. salivarius* UCC118

törzs növelte a kalcium felvételét a Caco-2 sejtekben és így megelőzhetővé válhatnak a kalcium hiánya miatt kialakuló betegségek (osteoporózis) [Gilman & Cashman, 2006].

Vitamin szintézis

A tejsavbaktériumok B vitaminokat is termelnek. Ez a tény hasznos, hiszen a B₂, B₉ és B₁₂ vitamin hiánya súlyos megbetegedéseket okoz, amelyek a B vitaminokat szintetizáló probiotikus baktériumok fogyasztásával, megelőzhetőek. A vízben oldható vitaminok lényeges összetevői táplálékoknak, melyek fontos szerepet játszanak az emberi sejtek metabolizmusában. Egy felnőtt embernek 400 µg/nap étrendi folát bevitele szükséges, míg terhes nők esetében ez az érték 600 µg/napra tehető. A terhesség alatt a nem megfelelő folát bevitel növeli a születési rendellenességeknek és a koraszülésnek kockázatát. Kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között néhány *Lactobacillus* törzs, úgymint a *L. plantarum* WCFS1 és a *L. plantarum* TSB 304 rendre 6 ng/ml és 16 ng/ml folátot szintetizált [Turpin *et al.*, 2010].

Antibiotikumra való érzékenység

Általánosan megállapítható, hogy a *Lactobacillus* törzsek természetes rezisztenciát mutatnak számos antibiotikummal szemben úgy, mint a bacitracin, a cefoxitin, a ciprofloxacín, a fuzidsav, a kanamicin, a gentamicin, a metronidazol, a nitrofuratoin, a norfloxacín, a sztreptomycin, a szulfadiazin, a teicoplanin, a trimetoprim/szulfametoxazol és a vankomicin [Bernardeau *et al.*, 2008]. Habár a szigorúan homofermentatív laktobacillusok érzékenyebbek a vankomicinre, mint a *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. leishmannii* vagy *L. acidophilus*. Ezen érzékenység a D-alanin, illetve a D-alanin ligáz enzimekkel hozható összefüggésbe [Elisha & Courvalin, 1995]. Néhány adatot találhatunk olyan az élelmiszeriparban alkalmazott *Lactobacillus* törzsekről, amelyek antibiotikumra rezisztensek. Ezek elsősorban mono-, illetve multirezisztens törzsek és a tejiparban is előfordulhatnak, például a tetraciklin rezisztens *L. plantarum*-ot izoláltak számos nyers tejben illetve lágy sajtokban, míg egy spanyol házi készítésű sajtból izolált törzsek (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*) rezisztenciát mutattak penicillin G, kloxacilin, sztreptomycin, gentamicin, tetraciklin, eritromicin és kloramfenikol antibiotikumokkal szemben [Bernardeau *et al.*, 2008].

2.2 Prebiotikumok

A prebiotikumok, olyan nem emészthető élelmiszer összetevők, amelyek jótékony hatással vannak a szervezetre, azáltal, hogy szelektíven serkentik a vastagbélben honos baktérium fajok növekedését és/vagy aktivitását [FAO/WHO, 2006]. A prebiotikumok számos élelmiszerben

előfordulnak, például vörös-, póré- és fokhagyma, articsóka, bab, borsó, búza, banán, burgonya. Szerkezetileg fehérje, peptid, és lipid is lehet prebiotikum, de az élelmiszeriparban többségében nem emészthető szénhidrátokat alkalmaznak prebiotikus összetevőként. Ahhoz, hogy egy oligoszacharidot prebiotikumnak nevezzünk, számos kritériumnak kell eleget tennie [Roberfroid, 2008]:

- Gyomorsavval szembeni ellenállóképesség
- Emésztő enzimekkel szembeni ellenállóképesség
- Ne szívódjon fel a tápcsatorna felső traktusában
- Hasznosítható legyen a bélmikrobióta számára
- Szelektíven stimulálja a jótékony bélbaktériumok növekedését és/vagy aktivitását.

A fent említett kritériumoknak, számos nem emészthető oligoszacharid megfelel, melyeket a következő csoportokba sorolhatunk (6. táblázat).

6. táblázat Prebiotikus oligoszacharidok [Macfarlane *et al.*, 2006]

| NÉV | ÖSSZETEVŐK | IPARI ELŐÁLLÍTÁSA | DP |
|----------------------------------|--|--|-------------|
| Inulin | $\beta(2-1)$ fruktán | Extrakció cikória gyökérből | 11-65 |
| Frukto-oligoszacharidok | $\beta(2-1)$ fruktán | Transzfruktozilációval szacharózból, vagy cikória inulin irányított hidrolízisével | 2-10 3-5 |
| Galakto-oligoszacharidok | oligo-galaktóz (85%), glükózzal és laktózzal | Laktózból β -galaktozidáz enzim segítségével | 2-5 |
| Szója-oligoszacharidok | raffinóz (F-Gal-G) és sztachióz (F-Gal-Gal-G) keveréke | Szójabab savójából extrakcióval | 3-4 |
| Xilo-oligoszacharidok | $\beta(1-4)$ kötésű xilóz | Xilánból enzimatisz hidrolízissel | 2-4 |
| Pirodextrinek | glükóz tartalmú oligoszacharidok keveréke | Pirolízissel paradicsomból vagy kukoricából | Eltérő |
| Izomalto-oligoszacharidok | $\alpha(1-4)$ glükóz és $\alpha(1-6)$ glükóz | Maltóz transzglükolizációjával | 2-8 |

DP: polimerizáltsági fok, G: glükóz, F:fruktóz, Gal: galaktóz

A 6. táblázatban is látható, hogy a legtöbb prebiotikum kis polimerizáltsági fokú (2-10), mivel a hosszabb láncú oligoszacharidok fermentációja lassabban megy végbe [Van den Broek & Voragen, 2008]. A nem emészthető oligoszacharidok alkalmazásának elsődleges eredménye lehet, hogy a bélrendszerben élő *Bifidobacterium*-ok száma növelhető. A bifidobaktériumok ezen

oligoszacharidokat szerves savakra (főleg tejsavra és ecetsavra) és/vagy rövidszénláncú zsírsavakra bontják. A prebiotikumok fermentációjakor a rövid szénláncú zsírsavak keletkeznek és ez pH csökkenést eredményez. Az alacsony pH hatására fokozódik az ásványi anyagok ionizációja és növeli a kationok oldékonyságát az ozmolaritás útján. A prebiotikumok legfontosabb metabolikus hatásait a 7. táblázatban foglaltam össze.

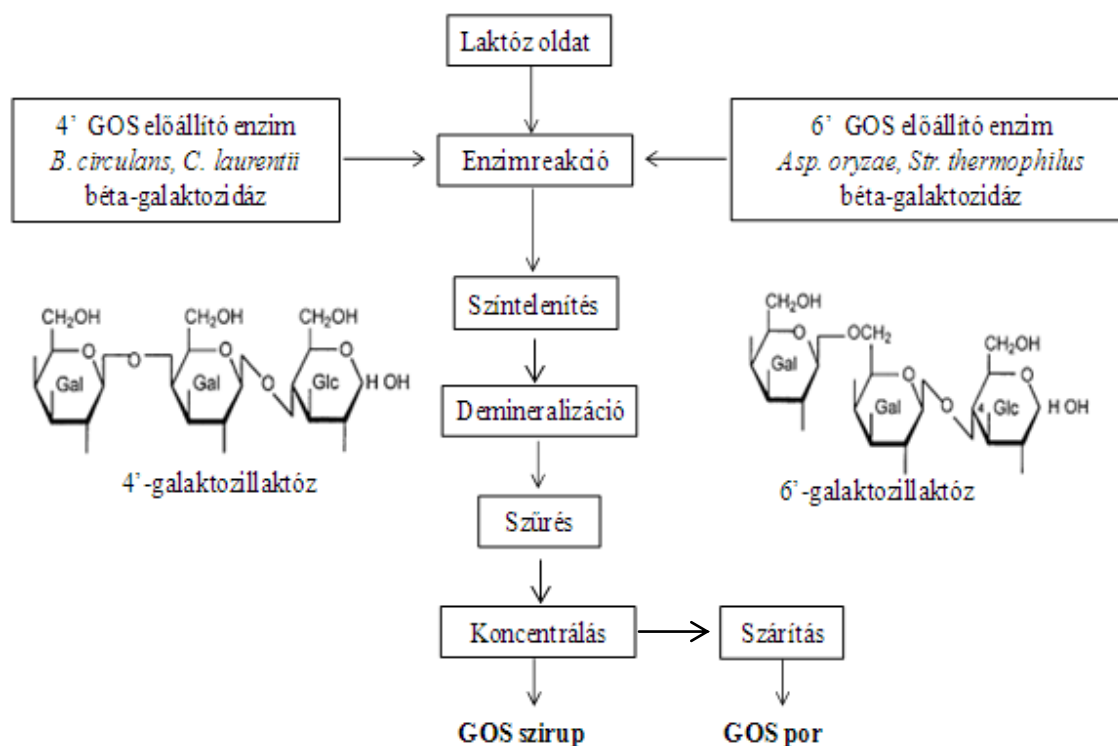
7. táblázat A prebiotikumok emberi szervezetre gyakorolt hatásai
[Cummings & Macfarlane, 2002]

| | |
|--|---|
| VASTAGBÉLBEN Növelhetik a biotomassza tömegét Rövidszénláncú zsírsavak termelése Fokozza a gázok termelődését (CO ₂ és H ₂) Fokozza széklet energia és N tartalmát | MIKROBIÓTÁRA Szelektíven növelik a bifidobaktériumok és a laktobacillusok számát Növelik a mikrobióta rezisztenciáját a patogénekkel szemben |
| VÉKONYBÉLBEN Növelik a vas, a kalcium és a magnézium felszívódását | EGYÉB Védhetnek a fogsúvasodás ellen Apoptózis stimulációja |

Galakto-oligoszacharidok

Galakto-oligoszacharidoknak (GOS) nevezzük azokat a di-, tri-, tetra-, penta- és hexaszacharidokat, amelyek a β -galaktozidáz transzgalaktoziláló hatása révén keletkeznek. A GOS, mint funkcionális élelmiszerösszetevők prebiotikus tulajdonságainak kihasználásával javíthatjuk számos élelmiszer minőségét, valamint szelektíven stimulálják a bélrendszerben élő probiotikus bifidobaktériumok növekedését. Alkalmazhatjuk a fermentált tejtermékek, cukrász termékek, kenyérfélék és italok alacsony kalóriájú édesítőszereként [Park & Oh, 2010].

A GOS-at laktózból állítják elő béta-galaktozidáz enzim transzgalaktozidáz aktivitásának segítségével. Először a tehéntej savójából nagy koncentrációjú laktóz oldatot állítanak elő, amelyet a reakció során szubsztrátumként alkalmaznak. A reakció fő termékei, triszacharid (4'-, vagy 6'-galaktozollaktóz) és hosszú láncú oligoszacharid, mely 4 vagy több monoszacharidból épül fel [Mussatto & Mancilha, 2007]. Ipari előállításukhoz *Bacillus circulans*, *Cryptococcus laurentii*, *Aspergillus oryzae* és *Streptococcus thermophilus* mikroorganizmusok béta-galaktozidáz enzimét használják. Az előállítási folyamat sematikus ábráját a 6. ábrán szemléltettem [Sako *et al.*, 1999]. A kereskedelmi forgalomban kapható GOS por és szirup formában is kapható, összetételét tekintve körülbelül 55% oligoszacharidot, 20% laktózt, 20% glükózt és kis mennyiségű galaktózt tartalmaz.



6. ábra Galakto-oligoszacharidok ipari előállításának lehetőségei

A galakto-oligoszacharidokról általánosan elmondható, hogy vízoldhatóak, szintelenek, hőstabilisak (160°C-on pH=7,0 mellett 10 percig, míg 100°C-on pH=2 mellett 10 percig), nagy nedvesség visszatartó kapacitással rendelkeznek, valamint édesítőképességük 0,3-0,6-szorosa a szacharóznak [Torres *et al.*, 2010].

Azokat a funkcionális élelmiszereket, melyek a prebiotikumokat a probiotikumokkal együtt tartalmazzák **szinbiotikum**nak nevezzük, a szinergista hatásuk révén [Vitali *et al.*, 2010]. Tudományos eredmények bizonyítják, hogy a probiotikus baktériumok előnybe részesítik azon oligoszacharidok hasznosítását, amelyeket saját enzimeik segítségével szintetizáltak. Ennek alapján alkották meg az integrált szinbiotikum fogalmát. Az integrált szinbiotikumban a probiotikum mellett olyan prebiotikus oligoszacharidot alkalmaznak, amelynek szintézise az adott törzs enzimével valósul meg.

2.3 Galaktozidáz enzimek

Azokat az enzimeket, amelyek a víz jelenlétében szubsztátumuk kovalens kötéseit bontják, hidroláz enzimeknek nevezzük. Ezen enzimeket hasításuk milyensége alapján tovább csoportosíthatjuk (8. táblázat).

8. táblázat: Hidroláz enzimek csoportosítása

| Enzim | Szubsztrátum | Kötés |
|--|-----------------------------------|------------------|
| Észterázok (pl. lipáz, foszfolipáz) | neutrális lipidek, foszfolipidek | észter |
| Foszfodiészterázok | nukleotidok | foszfodiészter |
| Foszfátázok | foszfátészterek | foszfomonoészter |
| Glikozidázok | oligoszacharidok, poliszacharidok | glikozid |
| Proteázok | peptidek, proteinek | peptid |

Az összetett szénhidrátok alkotó elemeit glikozidos kötések kapcsolják össze (O–glikozidos szerkezet) és hidrolízisükben a glikozidáz enzimek vesznek részt, amelyeket karbohidroláz enzimeknek is neveznek.

A glikozid hidrolázokat aminosav szekvenciájuk hasonlósága alapján 132 családba sorolják [www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html]. Ezen osztályozáson belül az ide tartozó enzimeket két csoportba sorolhatjuk katalitikus mechanizmusuk útja alapján:

- amelyek, sztereokémiaiilag megtartják a szubsztrátum anomer központot,
- amelyek a hidrolízis során invertálják az anomer központot.

Mind a két mechanizmushoz szükséges az aktív centrumban az aszparaginsav, vagy glutaminsav jelenléte, melyek karboxilát csoportjának szerepe van a katalízis közvetítésében. Az inverziós glikozil hidrolázok az egy lépéses mechanizmusnál a glikozid rész hasítását katalizálják, ahol az aktív részhez kötődött egyik karboxilát csoport általános bázis katalizátorként aktiválja a nukleofil vízmolekulát.

A szubsztrátumuk monoszacharid számától függően megkülönböztethetünk oligo- és poliszacharidázokat. Az előbbi csoportba tartoznak a galaktozidáz enzimek, amelyek a 2-10 egyszerű cukor molekulából álló és terminális galaktózt tartalmazó szénhidrátokat (galaktoszacharidok) bontanak. A galaktóz kötésben résztvevő glikozidos hidroxilcsoportja lehet alfa, illetve béta térállású, így megkülönböztethetünk alfa-, és béta-galaktozidázokat.

2.3.1 Alfa -galaktozidáz enzim

Az alfa-galaktozidáz enzimmel a szakirodalomban több néven is találkozhatunk: melibiáz, α -D-galaktozid-galaktohidroláz, galaktozidáz alfa. Enzimszáma: E.C. 3.2.1.22.

2.3.1.1 Előfordulása

Az α -galaktozidáz enzim előfordulását tekintve megtalálható a növényvilágban, emberi szervezetben és számos mikroorganizmus is szintetizálja. A növényvilág azon képviselőiben, melyek a raffinóz-család oligoszacharidjait tartalmazzák, ilyenek például a hüvelyesek rendjébe

tartozó borsó, bab, szója, földimogyoró, valamint a pillangós virágúak, ajakosok és rózsafélék, de kávéban és az édes mandulában is megtalálható [Marraccini *et al.*, 2005].

Számos tudományos kutatás irányult a növényi eredetű α -galaktozidáz enzimek tanulmányozására [Kim *et al.*, 2002, Shen *et al.*, 2008, Soh *et al.*, 2006]. Enzim aktivitást mutattak ki növekedésben lévő növények levelében, illetve már teljesen kifejlődött levelekben, gyümölcsökben, valamint magokban és gumókban. A növényi eredetű α -galaktozidáz enzimeknek több formája ismeretes. Jellemzően széles pH optimummal rendelkeznek (savas, de lúgos közegben is aktívak). Továbbá a működési paraméterei is eltérnek egymástól attól függően, hogy az izoenzimek a növényen belüli melyik részen találhatók: a citoszolban, a vakuólumban vagy néhány esetben sejtfalhoz kötött formában. Ezen enzimek mobilizálják a galaktózt a raffinóz típusú oligoszacharidokból, illetve a magokban és gumókban tárolt poliszacharidokból csírázásuk során [Soh *et al.*, 2006].

Növényekben a hancs szövetekben képződik az enzim és innen választódik ki a fejlődő levelekbe, gyümölcsökbe, gumókba. Ezekben a szövetekben történik a raffinóz család oligoszacharidjainak hidrolízise, amelyben az alfa-galaktozidáz enzim mellett a savas invertázok és egyéb hidroláz enzimek is fontos szerepet játszanak. Kim és munkatársai [2002] rizsből vonták ki, tisztították és jellemezték az alfa-galaktozidáz enzimet, míg Shen és munkatársai [2008] kávébab csíráztatása során detektálták az enzim aktivitását. Arra a következtetésre jutottak, hogy a csírázás első 25 napjában lassú, míg a 25 nap után intenzív az aktivitás növekedése. A csírázás végére többmint 14-szeres aktivitás értéket mértek. A kávébab mellett papayában is detektáltak alfa-galaktozidáz aktivitást [Soh *et al.*, 2006].

A növények mellett a mikroorganizmusok is nagy mennyiségben termelhetik az alfa-galaktozidáz enzimet. Szakirodalomban sok kutatás témája az eukarióta eredetű α -galaktozidáz enzim [Kurakake *et al.*, 2011, Rezessy-Szabó *et al.*, 2007, Prashnath & Mulimani 2004, Scigelova & Crout, 2000]. Természetesen a prokarióta eredetű α -galaktozidáz enzimmel is egyre több kutatás foglalkozik [Leder *et al.*, 1994, Yoon & Hwang 2008, Garro *et al.*, 1996]. A mikroorganizmusok extracellulárisan [Gote *et al.*, 2004, Puchart *et al.*, 2000, Shivam *et al.*, 2010, Manzanares *et al.*, 1998], illetve intracellulárisan [Carrera-Silva *et al.*, 2006, Tzortzis *et al.*, 2003, Xiao *et al.*, 2000] szintetizálják az alfa-galaktozidáz enzimet.

2.3.1.2 Szubsztrátum specifitás

Fredslund és munkatársai [2011] a következő két típusba sorolják az alfa-galaktozidáz enzimeket szubsztrátum specifitásuk alapján:

1. Típus 1: Ezen α -galaktozidáz enzimek melibióz [α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp] és raffinóz család oligoszacharidjain (RFOs) aktívak. Ezen oligoszacharidokban α (1 \rightarrow 6) kötésű galaktóz molekula található a lánc egyik végén. Például a raffinóz szerkezete a következő: [α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp-(α_1,β_2)-DFruk].
2. Típus 2: Ezen alfa-galaktozidáz enzimek a növényekben tartalék tápanyagként raktározódó galaktomannánok és galaktoglükomannánok fő hemicellulóz láncáról hidrolizálják az α (1 \rightarrow 6) galaktozil oldalláncot [Fredslund *et al.*, 2011].

Az alfa-galaktozidáz enzim az exoglikozidáz enzimek közé tartozik, a lánc végen bontja a galaktooligoszacharidokat, polimer galaktoglükomannánokat és galaktolipideket α -D-galaktózt felszabadítva.

2.3.1.3 Alfa-galaktozidáz enzim szerkezete

Az alfa-galaktozidáz enzimek a glikozid hidrolázok (GH) 4, 27, 36, 57, 97 vagy 110 családjában találhatók (www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html).

A 9. táblázatban láthatóak a szakirodalomban megtalálható α -galaktozidáz enzimek méretére és szerkezetére vonatkozó adatok. A GH27 és a GH36 családba sorolható glikozid hidrolázok számos funkcionális tulajdonságai megegyezők.

9. táblázat: Glikozid hidrolázok alfa-galaktozidáz enzimeket tartalmazó családjai
[www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html]

| | Glikozid hidrolázok családjai | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| | GH 4 | GH 27 | GH 36 | GH 57 | GH 97 | GH 110 |
| Mechanizmus | konformáció megtartó | konformáció megtartó | konformáció megtartó | konformáció megtartó | megtartó /invertáló | invertáló |
| 3D szerkezet | n.i. | (β/α) ₈ | (β/α) ₈ | (β/α) ₇ | (β/α) ₈ | n. i. |
| Katalitikus nukleofil | n.i. | Asp | Asp | Glu | invertáló: Glu megtartó: Asp | n. i. |
| Katalitikus proton donor | n.i. | Asp | Asp | n.i. | Glu | n. i. |

n.i.:nem ismert

Három dimenzós szerkezetük szerint a GH27 és a GH36 családokra jellemző a (β/α)₈ TIM barrel (hordó) szerkezet és hatásmechanizmusuk tekintetében a konformáció megtartók közé sorolhatóak. Az aktív centrumban Asp aminosav található mind a katalitikus proton donor, mind a katalitikus nukleofil részén.

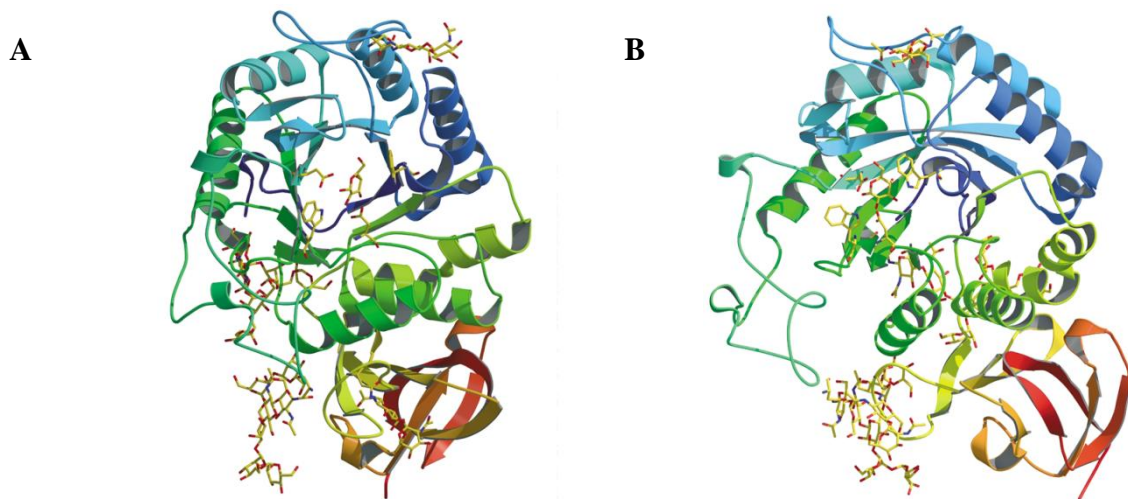
A szakirodalomban elérhető α -galaktozidáz enzimek glikoprotein jellegűek és molekula méretük tekintetében széles skálán mozognak (10. táblázat). A negyedleges szerkezetük a monomertől a tetramerig terjed. A bifidobaktériumoknál az alfa-galaktozidáz enzimek szerkezete eltérő. A *B. adolescentis* DSM 20083 törzs által termelt enzim tetramer (4×79 kDa) szerkezetű, a *B. bifidum* NCIMB 41171 enzime pedig trimer (3×85 kDa) [Leder *et al.*, 1994; Goulas *et al.*, 2009]. Xiao és kutatócsoportja [2000] egy harmadik bifidobaktérium fajhoz tartozó *B. breve* 203 törzs α -galaktozidáz enzimének molekula tömegét 160 kDa (2×80 kDa) becsülte és homodimerek közé sorolta.

10. táblázat Különböző eredetű α -galaktozidáz enzimek molekula tömege és szerkezeti tulajdonságai

| EREDET | Méret [kDa] | Szerkezet | Hivatkozás |
|---|---------------|--------------|------------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 82 | monomer | Scigelova <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> MTCC-2796 | 67,5 | monomer | Shivam & Mishra, 2010 |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 50 | monomer | Ferreira <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> NCIM5146 | 2×80 | dimer | Gote <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083 | 4×79 | tetramer | Leder <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171 | 3×85 | trimer | Goulas <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Bifidobacterium breve</i> 203 | 2×80 | homodimer | Xiao <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM | 4×86 | tetramer | Fredslund <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> CRL251 | 4×45 | tetramer | Garro <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> CRL722 | 4×84 | homotetramer | Carrera-Silva <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> NCIMB 41152 | 64 | monomer | Tzotzis <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Penicillium oxalicum</i> SO | 124 | monomer | Kurakake <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 395.62/b | 93 | monomer | Rezessy-Szabó <i>et al.</i> , 2007 |

Golubev és munkatársai [2004] tanulmányozták a *Trichoderma reesei* mezofil gomba alfa-galaktozidáz enzimének szerkezetét. Vizsgálatukhoz az úgynevezett SIRAS módszert alkalmazták, amely tulajdonképpen az izomorf és az anomális különbségek tanulmányozása. Megállapították, hogy a fehérje konformációja szignifikánsan nem változik az inhibitor kötődésekor. Kimutatták, hogy az α -galaktozidáz 417 aminosavból álló polipeptid láncot, a 4 oligoszacharidot (17 monoszacharidból épül fel) és 621 víz molekulát tartalmaz. A fehérje

komplex szerkezetében 19 α -hélix és 16 β -redő található, amely az aminosav 29 %, illetve 19% mennyiségét foglalja magában [Golubev *et al.*, 2004]



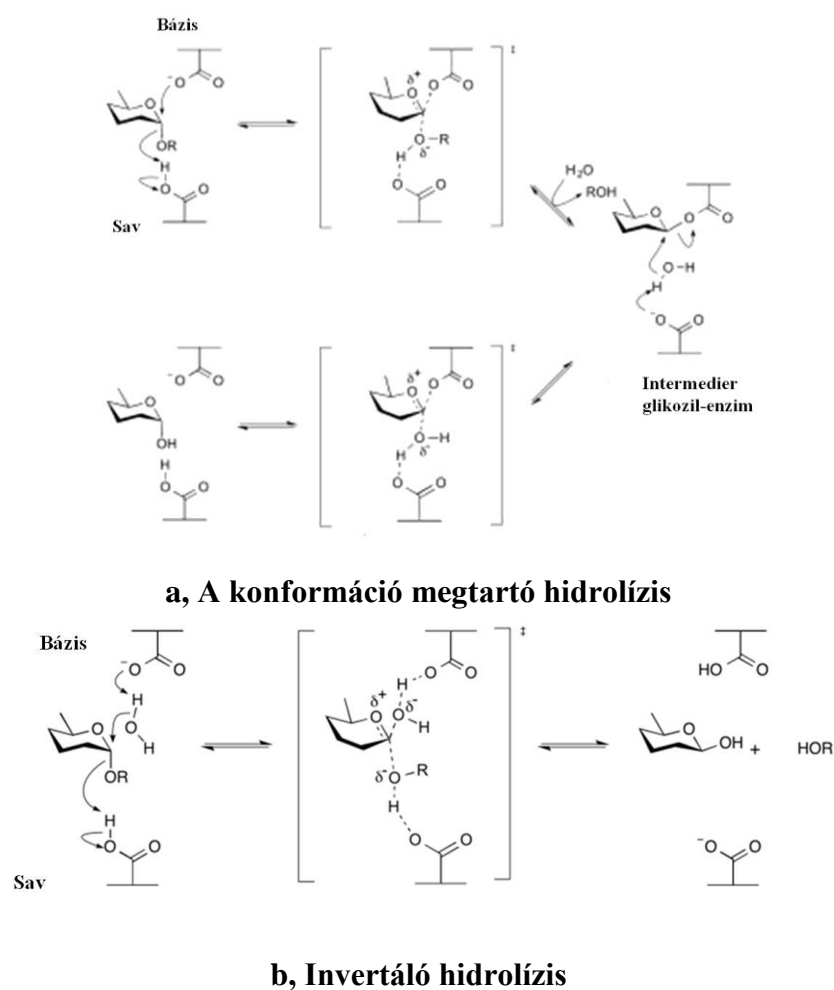
7. ábra A: *Trichoderma reesei* α -galaktozidáz enzim szerkezetének képe Golubev és munkatársai [2004] nyomán B: Ugyanez a kép 45°-kal elforgatva.

A 7. ábrán a *Trichoderma reesei* α -galaktozidáz enzimének térbeli szerkezete látható, ábrázolva az α -héliceket, β -redőket, β - δ -galaktózt, valamint a katalízisben résztvevő Asp 132, illetve az Asp 226 aminosavakat. Két triptofánnak is fontos szerepe van a szubsztrátummal való hidrofób kölcsönhatás kialakításában, illetve a négy N-terminális cukor láncnak, amelyek az úgynevezett „hézag” kialakításában vesznek részt. Vizsgálták az inhibitornak számító galaktóz molekula kötőhelyét is és megállapították, hogy ez a katalitikus domén közepében az aktív hely zsebében található. Golubev és munkatársai a *Trichoderma reesei* faj alfa-galaktozidáz enzimét szerkezeti tulajdonságai alapján a glikozid hidrolázok 27 családjába sorolják, mivel a 27 család fő tulajdonsága hogy a két fontos Asp is található a katalitikus centrumban. Fujimoto és munkatársai [2009] a 27. családba sorolták az *Umbelopsis vinacea* faj alfa-galaktozidáz enzimét. A molekulatömegét 50-46 kDa-ra becsülték az SDS-PAGE-val és 240 kDa-ra gélszűrőssel. Ennek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az *U. vinacea* faj tetramer szerkezetű alfa-galaktozidáz enzimet szintetizál. Az enzim monomer struktúrája alapján a GH27 család enzime közé sorolták. Szerkezeti elemzéseket is végeztek, és megállapították, hogy a katalitikus domén $(\beta/\alpha)_8$ hordó struktúrájú, míg az aktív centrum a C-terminális részen helyezkedik el. A C-terminális domén 8 β -redőből épül fel, két egymás után ismétlődő görög-kulcs motívumot formálva [Fujimoto *et al.*, 2009]. A *Lactobacillus acidophilus* NCFM törzs által szintetizált alfa-galaktozidáz enzim szintén a GH36 családkhoz tartozik, hiszen megtalálható az Asp aminosav a katalitikus hely nukleofil bázis és proton donor részén [Fredslund *et al.*,

2011]. Ezen enzimet szerkezetileg a tetramerek közé sorolták. Az egyes monomerek viszont három domén részből állnak: az *N*-terminális domain rész, amely a β -redőket tartalmazza. Ehhez kapcsolódik a katalitikus $(\beta/\alpha)_8$ hordó domén egység. A hosszú α -hélix lánc végén folytatódik a *C*-terminális domén, amely antiparallel β -redőkből áll [Fredslund *et al.*, 2011].

2.3.1.4 Hatásmechanizmus

A glikozidos kötés enzimés hidrolízise során két molekula keletkezik a proton donor és a nukleofil bázis rész. A hidrolízis két fő mechanizmusa során az anomer konfiguráció teljes retenciója vagy inverziója történhet. Mind a két esetben a proton donor helyzete azonos (8. ábra).



8. ábra: A glikozil hidrolázok mechanizmusa

http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#bibkey_Gebler1992

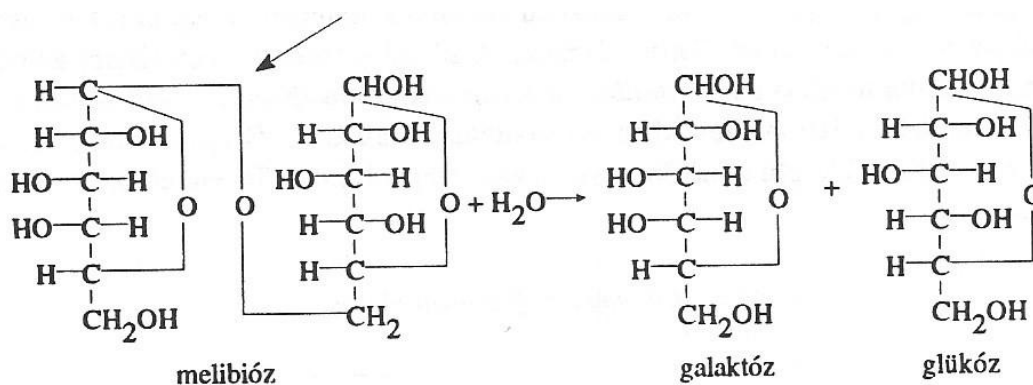
A konformáció megtartó enzim katalízis esetében a katalitikus nukleofil csoport közvetlen közelében helyezkedik el az anomer szénatom. Ebben az esetben a donor molekula anomer kötéseinek sztereokémiai tulajdonsága változatlan marad. Szemben az invertáló mechanizmus során ahol a molekula anomer kötéseiben sztereokémiai változások mennek végbe.

A konformáció megtartó reakció során a glikozil oxigén protonálódik a sav katalizátor segítségével és a nukleofil bázis rész segít a szubsztrátum aglikon részének leválásához, majd ezt követően a bázishoz való kapcsolódáshoz. Ezután az intermedier glikozil-enzim a víz molekula segítségével hidrolizálódik és a második nukleofil szubsztitúciónak révén a szubsztrátummal sztereokémiaailag azonos terméket képez.

Az invertáló mechanizmus során a glikozil-oxigén protonálódása és az aglikon kapcsolódása egyidejűleg történik egy lépésben a víz molekula „támadásával”. Ezen egy lépéses nukleofil szubsztitúció során a termék sztereokémiaailag eltérő lesz a szubsztrátumtól [Davies & Henriessat, 1995].

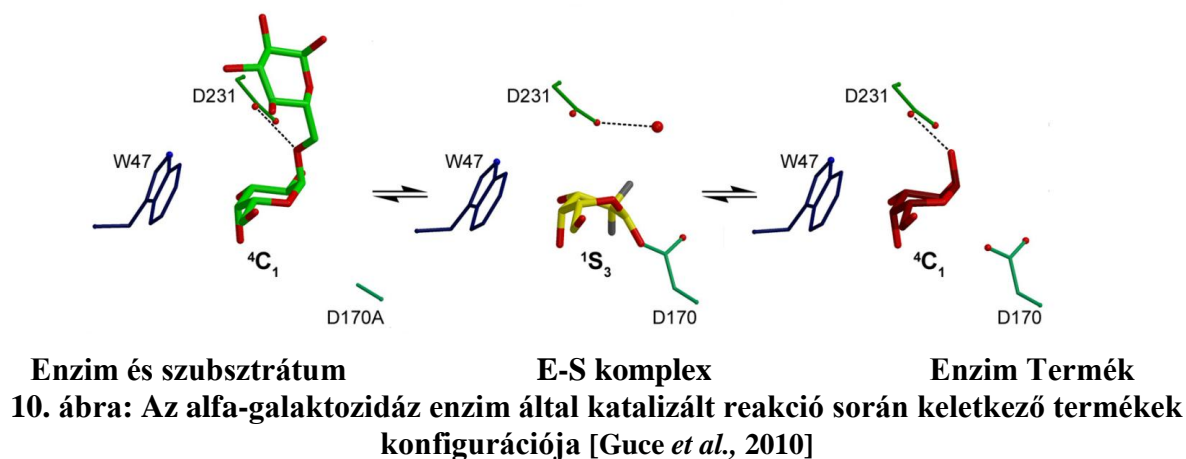
Az alfa-galaktozidáz, vagy melibiáz egy exoglikozidáz enzim a terminális nem redukáló α -D-galaktózt hasítja és α -D galaktóz keletkezik. Az alfa-galaktozidáz szubsztrátumai azok a láncvégükön galaktózt tartalmazó szénhidrátok, amelyekben a galaktozidos kötés α térállású, tehát nem redukáló cukrok. Ilyen α -galakto-oligoszacharidok például a melibióz, a raffinóz, a sztachióz és az elágazó poliszacharidok, mint a galaktomannán és galakto(glüko)mannán [Anisha *et al.*, 2007].

A melibióz hidrolízisét a 9. ábra mutatja be, mely során a diszacharidból galaktóz és glükóz keletkezik.



9. ábra A melibióz hidrolízise

Az alfa-galaktozidáz enzim hatásmechanizmusának részletesebb megismerése céljából Guce és munkatársai [2010] vizsgálták a humán eredetű α -galaktozidáz enzim kristály szerkezetének változását az enzim katalízis során. A humán alfa-galaktozidáz enzim szerkezetileg homodimer, melyben mindegyik monomer rész két domainből áll. Érdekes, hogy ez az enzim két aktív centrummal rendelkezik és két *N*-terminális $(\beta/\alpha)_8$ hordót tartalmaz.



Kék: az enzim aktív centruma; **zöld:** a szubsztrátum; **sárga:** kovalens intermedier; **piros:** termék-rész
D231: Asp-231; **W47:** Trp-47; **D170:** Asp-170

A 10. ábra szemlélteti az alfa-galaktozidáz enzim hatásmechanizmusát során keletkező termékek konfigurációját. Az aktív centrum kitüntetett helyei a katalitikus nukleofil rész az Asp-170, és a katalitikus sav/bázis Asp-231, valamint a konzervatív Trp-47. A reakció során a ligandum konfigurációja a kezdeti 4C_1 szék formából 1S_3 majd ismét 4C_1 lesz, tehát a humán eredetű alfa-galaktozidáz enzim a „konformáció megtartó” glikozidáz enzimek közé tartozik.

Víz jelenléte nélkül a galaktozidáz enzimek hidroláz aktivitásuk mellett mutatnak transzfer aktivitást is. Általában Gal- α -1,6, vagy Gal- α -1,3 kötéseket tartalmazó terméket szintetizálnak [Tzortzis *et al.*, 2003, van Laere *et al.*, 1999] és ritkábban Gal- α -1,4 kötéssel állítanak elő terméket. Egy *Stachys affinis* gumóiból izolált alfa-galaktozidáz enzimről írták le eddig, hogy Gal- α -1,4 kötést tartalmazó diszacharidot szintetizált p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozidot alkalmazva donor molekulaként és galaktózt akceptorként [Zhao *et al.*, 2008].

Puchart és munkatársai [2000] tanulmányozták a *Thermomyces lanuginosus* eredetű α -galaktozidáz enzim transzgalaktozil aktivitását nagy koncentrációjú (200 mM volt 50 mM pH 4,5 Na-acetát pufferben, 40 °C-on) p-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid szubsztrátummal. Azt közölték, hogy a termék (glikozid része) α -anomer konformációjú volt. Tzortzis és kutatócsoportja [2003] vizsgálták a *Lactobacillus reuteri* NCIMB 41152 törzs alfa-galaktozidáz enzimének transzgalaktozil aktivitását a galaktóz, a raffinóz és a melibióz szubsztrátumok jelenlétében. Megállapították, hogy az enzim akár nagy galaktóz koncentrációban (60-80%, pH 5,8; 40 °C, 5 nap) sem volt képes galakto-oligoszacharid előállítására. Ellenben melibióz szubsztrátumon (pH 7,2 és 35°C) és raffinóz szubsztrátumon (pH 7,8 és 45°C) detektálták a galaktozil transzfer aktivitását. Ezen körülmények között az optimális kihozatal 85 % melibiózon és 42 % raffinózon. *Bifidobacterium adolescentis* törzs alfa-galaktozidáz enzim segítségével a melibióz szubsztrátum esetén (pH 8,0 és 40 °C) 75%-os maximális kihozattal állítottak elő oligoszacharidot [van Laere *et al.*, 1999]. Zhao és kutatócsoportja [2008] a *B. breve* 203 aga2

génjét klónozták *E. coli* törzsbe, majd az így kapott rekombináns AGA2 alfa-galaktozidáz enzimet tisztították és tanulmányozták transzglikolizáló tulajdonságait. Megállapították, hogy az enzim mutat transzfer aktivitást galaktóz, glükóz, fruktóz, mannóz, szorbóz, ramnóz, xilóz, eszkulin, cellobióz, maltóz, szacharóz, trehalóz, laktóz, inozit, mannit és szorbit szubsztrátumokon. A kapott oligoszacharidok kihozatalai az alkalmazott szubsztrátumtól függően 1-7% között voltak. A monoszacharidok (fruktóz, glükóz, mannóz és szorbóz) és a diszacharidok (trehalóz, szacharóz) relatív jó akceptor molekuláknak tekinthetők. A cukoralkoholok közül az inozit bizonyult a legjobb akceptornak. Ezen eredményekből arra a következtetésre jutottak, hogy a vizsgált Aga2 enzim számára a legalkalmasabb akceptor molekulák: a furanozil, a piranozil és a glicit struktúrák [Zhao *et al.*, 2008].

2.3.1.5 Alfa-galaktozidáz enzim kinyerési és tisztítási lehetőségei

Az intracelluláris enzimek vizsgálatára általában csak sejtfeltárási eljárás után nyílik a lehetőség. Számos módszer áll rendelkezésre, amelyek mechanikus és nem mechanikus elven alapulnak. A mechanikus módszerek közé tartozik a nyírás folyadékban (ultrahanggal, mechanikus keveréssel, átnyomás folytáson) és a nyírás szilárd fázisban (örlés, nyomás). A nem mechanikus módszerek között pedig különböző lízisek (ozmotikus sokk, hősök, kémiai reagensek, enzimek), valamint szárítási módszerek találhatók. Goulas és munkatársai [2009] *B. bifidum* NCIMB 41171 törzs sejtjeit kémiai reagenssel – toluollal – tárták fel. Ezzel a feltárással sikerült a bifidobaktérium sejtek sejtfalának permeabilitását fokozni. Az alkalmazott módszer hátrányát jelenti, hogy a toluolt nehéz elválasztani terméktől és toxicitási problémákat is okozhat. Tzortzis és munkatársai [2003] enzimes (lizozim) módszert választottak a *L. reuteri* törzs sejtjeinek feltáráására. Az enzimes módszer előnye, hogy speciálisan csak a sejtfal alkotóban lévő néhány kötést bontja és nincs hatása a kinyerendő anyagokra, azonban ezen módszerek drágák és szakértelmen alapulnak. Leder és munkatársai [1999] a *B. adolescentis* törzs sejtjeit több ciklusban ultrahanggal tárták fel, Garro és kutatócsoportja [2006] pedig nagynyomású homogenizátort (French Press) választottak egy *Lactobacillus* törzs sejtjeinek feltáráshoz.

A következőekben néhány a szakirodalomban fellelhető módszert gyűjtöttem össze, amelyek a bifidobaktérium eredetű intracelluláris alfa-galaktozidáz enzimek tisztítási lehetőségeivel foglalkoztak.

Leder és munkatársai [1999] a *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 törzs alfa-galaktozidáz enzimét tisztították. A fermentációt követően a sejteket centrifugálással (5200 g 25 perc, 4°C) gyűjtötték össze és kétszer mosták McIlvaine pufferrel (pH 6,5), amely 0,1 %(v/v)-ban tartalmazott merkaptóetanolt. A mosási ciklust követően a sejteket a fent említett pufferbe szuszpendálták és feltárták (ultrahangos kezeléssel). A sejtfeltárást követően a sejtfal törmelékét

centrifugálással (31000 g, 20 perc, 4°C) eltávolították. Ezt követően a felülúszóban lévő fehérjéket két lépésben ammónium-szulfáttal (45 illetve 65% telítettséget alkalmazva) kicsapták, majd centrifugálták és ultraszűrték. A koncentrált fehérjéket először egy Resource Q anioncserélő oszlopra vitték fel (0,2 M McIlvaine puffer pH=6,5 1M NaCl, 1 ml/perc), majd az alfa-galaktozidáz enzim aktivitást mutató frakciókat összegyűjtötték és koncentrálták. Az utolsó lépésre gélszűrő oszlopot (Superdex HR 200) használtak. A tisztítás eredményeként 3,7 % kihozatal mellett 36,05 tisztulási faktort értek el [Leder *et al.*, 1999].

Xiao és munkatársai [2000] módszert (4 lépés) dolgoztak ki egy másik faj a *Bifidobacterium breve* intracelluláris alfa-galaktozidáz tisztítására. A fermentáció után a fehérjéket ammónium-szulfáttal kicsapták, majd DEAE Cellulóz ioncserélő, Gigapite ioncserélő és Cellulofine GC700 gélszűrő oszlopokra vitték fel a mintákat. A kidolgozott tisztítási eljárás 1 %-os kihozatalt eredményezett.

A bifidobaktérium törzsek mellett tejsavbaktérium törzsek alfa-galaktozidáz enzimének tisztításával is csak csekély számú szakirodalom foglalkozik. Garro és kutatócsoportja [2006] egy *Lactobacillus fermentum* CRL 251 törzs alfa-galaktozidáz enzimének tisztítását valósították meg. Első lépésként a törzseket centrifugálással elválasztották, majd β -merkaptoetanollal mosták, ezt követően McIlvaine pufferbe felfuszpendálták és French Press nagynyomású homogenizátorral feltárták a sejteket. A sejtfeltárást követően a sejtfal törmelékét centrifugálással eltávolították, majd ammónium-szulfáttal (95% telíttség mellett) kicsapták a fehérjéket. A kicsapást követően először Sephadex G200 gélszűrő oszlopon folytatták a fehérje tisztítását (McIlvaine puffer pH=5,8), melyet DEAE Sepharose ioncserélő oszlop követett. Az enzim homogenitásig történő tisztítását SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőrizték. A fent leírt módszerrel 21,03 tisztulási faktort mutattak ki az 5,5% kihozatal mellett [Garro *et al.*, 2006]. Az eddig felsorolt tisztítási módszerekhez hasonló lépéseket alkalmaztak Farzadi és munkatársai [2011] a *L. acidophilus* PTCC 1643 törzs alfa-galaktozidáz esetében is. A fermentációt követően nem alkalmaztak sejtfeltárást, a sejtek centrifugálását követően ammónium-szulfáttal kicsapták fehérjéket, majd Sephadex G200 gélszűrő oszlopot alkalmaztak. A gélszűrés során kapott galaktozidáz enzimre aktív frakciókat összegyűjtötték, majd ultraszűréssel koncentrálták. Ezt követően a végtisztításként DEAE-celullóz ioncserélő oszlopot használtak. A *L. acidophilus* törzs alfa-galaktozidáz enzimét 18,4 tisztulási faktorról és majdnem 28 % kihozatal mellett tisztították [Farzadi *et al.*, 2011].

2.3.1.6 Enzim működését befolyásoló tényezők

Az enzimek felhasználhatósága szempontjából fontos információ az enzimek működését befolyásoló környezeti tényezők pontos ismerete. Ezen tényezők a hőmérséklet, kémhatás, ionok hatása, hőstabilitás, amelyeknek a pontos feltérképezése elengedhetetlen. Nehézséget jelent, hogy az eltérő forrásból származó enzimek más és más optimális környezetet igényelnek működésükhöz.

Hőmérséklet, pH és stabilitás

A két legfontosabb tényező, amelyek hatást gyakorolnak az enzimek működésére a hőmérséklet és a kémhatás. A hőmérséklet befolyása a biokatalízisnél két hatás eredőjeként nyilvánul meg, növelése egyrészt gyorsítja a kémiai reakciók sebességét, illetve az enzimek fehérje jellegükből adódóan magasabb hőmérsékleten szerkezetük megváltozik, majd denaturálódnak, így alkalmatlanná válnak a biokémiai folyamatok katalízisére. A hőmérséklet optimum meghatározása lényeges az enzim alkalmazhatósága szempontjából. A hőmérséklet optimum megállapítása mellett célszerű az adott tartományban az enzim stabilitását is megvizsgálni. Különböző eredetű enzimek eltérő optimális hőmérséklettel rendelkeznek. A 11. táblázatban a mikroba eredetű α -galaktozidáz enzimek működésének optimális hőmérséklet és pH értékeit gyűjtöttem össze.

A felsorolt prokarióta eredetű α -galaktozidáz enzimek közül a legnagyobb hőmérséklet optimummal a *Bacillus stearothermophilus* enzime rendelkezik. A *Lactobacillus* fajok által szintetizált enzimek 45-50 °C körüli optimummal rendelkeznek, de a *L. curvatus* R08 törzs eredetű enzim hőmérséklet optimuma csupán 37 °C volt [Yoon-Hwang, 2008]. Jól látható, hogy a mikroorganizmusok diverzitásának köszönhetően még az azonos fajból származó törzsek enzimeinek hőmérséklet optimuma is eltérő lehet. Például a *L. fermentum* CRL 722 jelű törzsnél ez az érték 50 °C, míg a CRL 251 jelű törzsnél 45 °C. Az eukarióta eredetű α -galaktozidáz enzimek esetében megállapítható, hogy általában 50-55 °C tartományban található a hőmérséklet optimum, de 65 °C-ot is detektáltak termofil gombáknál.

A kémhatás tekintetében elmondható, hogy a bakteriális eredetű α -galaktozidáz enzimek gyengén savas és semleges vagy esetleg gyengén lúgos kémhatáson mutatnak maximális aktivitást. A tejsavbaktériumoknál tapasztalták a legalacsonyabb pH optimumot (pH=4,5), amely a nemzetség sajátosságából adódik. A gomba eredetű enzimek esetében egyértelműen a savas kémhatás volt kedvező az enzim működése szempontjából. A legalacsonyabb pH=3,0 optimumot a *Penicillium oxalicum* törzsből származó enzimmél tapasztalták.

11. táblázat Mikrobiális α -galaktozidáz enzimek optimális pH és hőmérséklet adatai

| EREDET | Optimális pH | Optimális hőmérséklet | Hivatkozás |
|--|--------------|-----------------------|------------------------------------|
| <i>Prokarióta eredetű</i> | | | |
| <i>Bacillus megaterium</i> VHM1 | 7,5 | 55 °C | Patil <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> NCIM5146 | 6,5-7,0 | 65 °C | Gote <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083 | 5,5 | 55 °C | Leder <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083 ^T | 6,0 | 45 °C | van Laere <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Bifidobacterium breve</i> 203 | 5,5-6,5 | | Xiao <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Bifidobacterium breve</i> 203 | 5,5 | 50 °C | Zhao <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> R08 | 6,5-7,0 | 37 °C | Yoon & Hwang 2008 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 251 | 5,5-6,5 | 45 °C | Garro <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> CRL722 | 4,8 | 50 °C | Carrera-Silva <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | 4,5-5,0 | 50 °C | Tzortzis <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> JK55 | 8,0-8,5 | 37 °C | Yoon & Hwang 2008 |
| <i>Streptomyces</i> sp. S27 | 7,4 | 35 °C | Cao <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Streptomyces griseoalbus</i> | 6,0 | 30 °C | Anisha <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Eukarióta eredetű</i> | | | |
| <i>Aspergillus niger</i> | 4,5-5,0 | | Scigelova & Crout, 2000 |
| <i>Aspergillus niger</i> N400 | 4,5 | 50-55 °C | Manzanares <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 4,8 | 50 °C | Prashnath & Mulimani 2004 |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> MTCC-2796 | 5,0 | 50 °C | Shivam & Mishra, 2010 |
| <i>Gibberella fujikuroi</i> | 5,8 | 56 °C | Thippeswamy & Mulimani 2002 |
| <i>Penicillium oxalicum</i> SO | 3,0 | 60 °C | Kurakake <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 395.62/b | 5,0-5,5 | 65 °C | Rezessy-Szabó <i>et al.</i> , 2007 |

Az enzimstabilitási vizsgálatok elég szórt eredményeket adtak (12. táblázat), amely szintén a tulajdonságban való diverzitást mutatja.

Számos kísérletben egy meghatározott hőmérsékleten vagy pH-n vizsgálták az enzim stabilitását megadott időtartamig és adták meg a kezdeti aktivitáshoz képest megmaradt aktivitást százalékosan [Carrera-Silva *et al.*, 2006, Manzanares *et al.*, 1998]. A másik lehetséges megközelítés, hogy a felezési időt határozzák meg különböző környezeti feltételek mellett [Gote *et al.*, 2004, Puchart *et al.*, 2000, Shivam & Mishra, 2010]. Összehasonlíthatóság és alkalmazástechnikai szempontból véleményem szerint a felezési idő informatívabb.

12. táblázat Különböző eredetű α -galaktozidáz enzimek stabilitásra vonatkozó adatai

| EREDET | α -galaktozidáz | Stabilitás | Hivatkozás |
|---|------------------------|---|---------------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> N400 | extracelluláris | 30 °C; pH 4,0 ill. 4,5 20 óra 85% aktivitás pH 5,5 ill. 6,0 → 20 óra 65% aktivitás | Manzanares <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> MTCC-2796 | extracelluláris | t _{1/2} 65 °C 3óra 70 °C 1óra 80 °C 30 perc | Shivam & Mishra, 2010 |
| <i>Bacillus megaterium</i> VHM1 | extracelluláris | 55 °C 120 perc | Patil <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> NCIM5146 | extracelluláris | t _{1/2} 70 °C 80 perc | Gote <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Gibberella fujikuroi</i> | intracelluláris | 55 °C → 12óra 90 % aktivitás | Thippeswamy & Mulimani 2002 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> CRL722 | intracelluláris | 100 % aktivitás 50 °C 30 perc | Carrera-Silva <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> NCIMB 41152 | intracelluláris | 60 °C 10 perc | Tzortzis <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>L. curvatus</i> R08 | intracelluláris | t _{1/2} → 37°C, 1 óra | Yoon-Hwang, 2008 |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> IMI 158749 | extracelluláris | t _{1/2} → 65 °C 3 óra pH=4,5; 60°C 6óra → 100% aktivitás | Puchart <i>et al.</i> , 2000 |

Aktivátorok, inhibitorok

A hőmérséklet és kémhatás mellett az aktivátoroknak és inhibitoroknak is fontos szerepe van az enzim működése szempontjából. Ilyen jellegű vizsgálatok esetében fontos az adott ionok, vegyületek koncentrációját figyelembe venni.

A szulfhidril-reaktív ionok, mint az ezüst és a higany teljes gátló hatást fejtenek ki az α -galaktozidáz enzimre. Ennek oka az lehet, hogy az enzim katalitikus régiójában tiol csoportot tartalmazó aminosav áll, és az említett ionok ezen aminosavak funkciós csoportjához kötődhetnek és így lecsökkentik az enzim aktivitását. A Hg²⁺ és Ag²⁺ enzim inaktiváló hatásairól számos szakirodalom beszámolt [Gote *et al.*, 2006; Carrera-Silva *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2000; Shivam & Mishra, 2010]. Cao és munkatársai [2010] is vizsgálták az *E. coli* törzsbe klónozott *Streptomyces* sp. S27 törzs α -galaktozidáz enzimét és arra a megállapításra jutottak, hogy az ezüst és a higany ionok (1 és 5 mM koncentrációban) teljesen gátlólják az enzimet. Hasonló

eredményeket tapasztaltak Patil és munkatársai [2010] a *Bacillus megaterium* VH1 törzs α -galaktozidáz enzimének vizsgálatakor. 1 mM koncentrációjú Ag^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} ionok erős inhibitorok voltak. Egy másik *Bacillus* faj tisztított α -galaktozidáz enziménél 1 mM-os koncentrációban gátló hatást fejtett ki az Ag^{2+} , Hg^{2+} mellett a Cu^{2+} ion is. Az α -galaktozidáz enzim tiol csoportja mellett karboxil csoportok is megtalálhatók az aktív centrumban [Gote *et al.*, 2006]. A Cu^{2+} ion gátló hatásáról Ibrahim és munkatársai [2010] is beszámoltak hat *Lactobacillus reuteri* törzs α -galaktozidáz enzim esetében.

A Cr^{3+} , Ni^{+} , illetve Zn^{2+} ionok (1 és 5mM koncentráció) gátló hatásáról számoltak be *Streptomyces* sp. S27 törzs α -galaktozidáz génjének klónozását követően [Cao *et al.*, 2010]. Míg egy *Bacillus* faj alfa-galaktozidáz enzimére nem fejtett ki sem gátló sem aktiváló hatást az 1 mM koncentrációjú Ni^{2+} illetve Zn^{2+} ion sem [Gote *et al.*, 2006]. Más ionok, mint a Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , K^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} (1mM), illetve az EDTA (10mM), a β -merkaptóetanol (1 mM) és az urea (1mM) nem befolyásolták az enzim működését, aktivitását.

Az *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796 törzs enzim aktivitását 17,5, illetve 12%-kal növelik 1mM Ca^{2+} és K^{+} ionok [Shivam & Mishra, 2010].

A szénhidrátok is befolyásolhatják az enzim működését. Különböző szerkezetű szénhidrátok hatását egy *Bacillus* faj alfa-galaktozidáz enzimére vizsgálták Gote és munkatársai [2006], és megállapították, hogy a galaktóz, melibióz, sztachióz inhibitoroként szolgáltak, míg a glükóz, fruktóz, szacharóz nem gátolták az enzimet. A galaktóz gátló hatását más mikroorganizmusok (mint például *Aspergillus parasiticus*) esetében is tapasztalták [Shivam & Mishra, 2010].

Proteáz enzimek közül a semleges proteázok, mint az α -kimotripszin, szubtilizin A, kollagenáz nem voltak hatással a *Streptomyces* sp. S27 törzs α -galaktozidáz enzim aktivitására [Cao *et al.*, 2010].

2.3.1.7 Alkalmazás

A legfontosabb alkalmazási lehetősége az alfa-galaktozidáz enzimnek a cukoripar, pép és papíripar mellett a szója alapú élelmiszerek és az állateledel gyártásánál ismert. Egyre több kutatás irányul ezen enzim humán gyógyászatban való felhasználására, úgymint a vércsoport traszformációnál, a Fabry kór kezelésénél és a xenotranszplantációnál [Gote *et al.*, 2006].

Általános ipari alkalmazása ezen enzimnek a cukoriparban ismeretes, ahol a raffinóz és a sztachióz negatív hatást fejtenek ki a szacharóz kristályosítására. Az alfa-galaktozidáz enzim alkalmazásával a raffinóz és a sztachióz lebonthatóvá válik, ezáltal növelve a szacharóz kihozatalát és a kristályosítás hatásfokát. Mindemellett fontos ezen technológia szempontjából is

az alkalmazott enzim hőstabilitása, tekintettel a termelés során a lehűtésre majd az újra melegítésre. A papíriparban az alfa-galaktozidáz enzimek hőstabilitását kihasználva a papír fehéříthetőségének növelése érdekében alkalmazzák. Fontos biotechnológiai alkalmazása az α -galaktozidáz enzimnek a hüvelyes növényekből készült ételek tápértékének növelése. A hüvelyesek a raffinóz család oligoszacharidjait tartalmazzák, amely az emberi szervezet számára nem emészthető. Pedig a hüvelyesek fontos szerepet játszanak a táplálkozásban és a Föld több területén, ahol a tradicionális táplálkozásnak része, alacsony zsírtartalmának, kiváló fehérje és élelmi rost forrásának, valamint sokféle tápanyag tartalmának köszönhetően. A hüvelyes növények egyik kiemelkedő képviselője a szójabab, mely izoflavonoid tartalma miatt kapott jelentős figyelmet, fontos szerepet játszhat a rák megelőzésében és kezelésében, illetve a csontritkulás kezelésében. Az emberek és a monogasztrikus állatok bélnyálkahártyája nem szintetizál α -galaktozidáz enzimet, mely elengedhetetlenül fontos a raffinóz alapú oligoszacharidok hidrolíziséhez. A vastagbélben honos mikroorganizmusok fermentálják ezen oligoszacharidokat, mely során gáz képződik és nagymértékű diszkomfort érzetet, flatulenciát okoz. A nem tejalapú termékek gyártásában is hasznos enzimeknek számítanak, a szójában jelenlévő poliszacharidok, raffinóz és szacharóz hidrolízisét végzik el, mely tevékenységét elsősorban a szójaital esetében használják. Ezen okok miatt egyre több kutatás irányul az α -galaktozidáz enzim alkalmazhatóságára vonatkozóan a szójában lévő galakto-oligoszacharidok hidrolízisére [Guce *et al.*, 2004]. Patil és munkatársai [2010], illetve Gote és munkatársai [2004] végeztek kísérleteket a *Bacillus* törzsek által termelt α -galaktozidáz enzimmel a szójaitalban lévő flatulenciát okozó szénhidrátok lebontására, és a törzsek által termelt enzim egy, illetve kettő óra alatt a termékben lévő oligoszacharidok nagy részét hidrolizálta. Az előzőekben említett alkalmazási kísérletek mellett az eukarióta *Gibberella fujikuroi* gomba faj α -galaktozidáz enzimével is kezelték a szójaitalt és nyomon követték a szénhidrátok mennyiségi alakulását, és 12 óra elegendőnek bizonyult, hogy a termékben lévő raffinóz család oligoszacharidjainak 91 %-a hidrolizálódjon. A szabad enzim mellett rögzített enzimmel is elvégezték az alkalmazhatósági kísérleteket, de hatékonysága nem érte el a szabad enzim hidrolízis szintjét (12 óra alatt 71% kihozatal) [Thippeswamy & Mulimani, 2002]. Az alfa-galaktozidáz enzim hidroláz aktivitása mellett transzgalaktozilálási aktivitással is rendelkezik, amelyet kihasználva galakto-oligoszacharidok (GOS) állíthatók elő, amelyek későbbiekben prebiotikus élelmiszer összetevőként alkalmazhatóak lehetnek [Shivam & Mishra, 2010]. Nemcsak az ipari alkalmazásban tölt be fontos szerepet az alfa-galaktozidáz enzim, hanem az orvostudomány területén is. Segítségével a B típusú vérben lévő B antigén hidrolizálhatóvá válik a 0 típusú vércsoportoknál előforduló H antigénné [Shivam & Mishra 2010, Puchart *et al.*, 2010], valamint a Fabry kórban szenvedő betegek (α -galaktozidáz enzim hiánya) kezelésében is

alkalmazzák [Simerská *et al.*, 2007] ez enzimet. Gyakorlatban az enzim pótlásának hiánya miatt a glikolipidek (elsősorban globotriaoszilceramid, GL-3) felhalmozódnak a sejtek lizoszómájában, ami vesekárosodáshoz (később a máj és az agy működésének károsodásához) vezet. A legtöbb esetben enzimpótló terápiát javasolnak, amelynek hatására a betegség tünetei enyhíthetők. A savas pH optimumának (és a szfingolipid aktivátor protein B hiánynak) köszönhetően a plazmában, és a citoplazmamembránban sem aktív, ezért az ott lévő oligoszacharid oldalláncokat nem bontja. A sejtek mannóz-6P receptoraik segítségével képesek ezen lizoszomális enzimeket a vérplazmából felvenni, így a szervezetbe juttatott enzim könnyen el tud jutni a lizoszómáig. A humán α -galaktozidáz enzimek előállítása CHO (Chinese hamster ovary) sejt kultúrák alkalmazásával történik. Szerencsés módon a jól termelő sejt vonalakban az enzim a lizoszomális akkumulációt követően az extracelluláris térbe szekretálódik, ami jelentősen megkönnyíti az izolálást és a tisztítást [Tözsér *et al.*, 2011].

2.3.2 Béta-galaktozidáz enzim

A béta-galaktozidáz enzimet a szakirodalomban laktázként és β -galaktozid-galaktohidrolázként is említik. Enzimszáma: EC 3.2.1.23.

2.3.2.1 Előfordulás

A béta-galaktozidáz enzim megtalálható a növényvilágban [Biswas *et al.*, 2003, Balasubramaniam *et al.*, 2005, Kestwal & Bhide, 2007; Kishore & Kayastha, 2012], az állatvilágban [Taniguchi & Takano, 2004], valamint számos mikroorganizmus is szintetizálja. A növényi eredetű enzimek oldott formában a citoplazmában vagy sejtfalhoz kötött állapotban fordulnak elő. Elsősorban gyümölcsfélékben mutattak ki β -galaktozidáz aktivitást. A gyümölcsök mellett magvakban is kimutatható ez az aktivitás. A gyümölcsök esetében az érés, míg magok esetében a csírázás során detektálható a legnagyobb aktivitás [Kestwal & Bhide, 2007].

Hétféle béta-galaktozidáz enzimet detektáltak a paradicsom érése során. Aminosav szekvencia azonosítás során megállapították, hogy mind a hét detektált β -galaktozidáz enzim a GH 35 családba tartozik [Husain, 2010]. A gyümölcsök érési folyamata során a sejtfal galaktozil koncentrációját csökkenti az enzim, így elősegítve a pektin degradációját, mely a gyümölcs éréséhez vezet. Papaya érési folyamata során szintén bizonyították, hogy a β -galaktozidáz aktivitás jelenléte elősegíti a gyümölcs érését és annak puhulását a sejtfal hidrolizálásával [Husain, 2010].

A mikroorganizmusok által termelt béta-galaktozidáz enzimekre vonatkozóan egyre szélesebb körű kutatások folynak. A fonalas gombák gyakran hasznosítják a laktózt, de csak kisebb mennyiségben, mint például ipari penicillin termelés során a *Penicillium chrysogenum* törzs. A

penészgombák mellett az élesztőgombák is termelnek nagy mennyiségben béta-galaktozidáz enzimet, amelyet széles körben alkalmaznak az élelmiszeriparban. Az élesztők és a baktériumok által termelt enzimek intracellulárisak [Hung-Lee *et al.*, 2002; Hinz *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2006; Iqbal *et al.*, 2010; Rhimi *et al.*, 2009; Numanoglu & Sungur 2004], míg a penészgombák által termelték jelentős része extracelluláris [Freitas *et al.*, 2011; Manzanares *et al.*, 1998; Nagy *et al.*, 2001].

2.3.2.2 Szerkezete

A béta-galaktozidáz enzimek a glikozid hidrolázok (GH) 1, 2, 35 és 42 családjában (13. táblázat) találhatóak (www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html).

13. táblázat: Glikozid hidrolázok béta-galaktozidáz enzimeket tartalmazó családjai
[www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html]

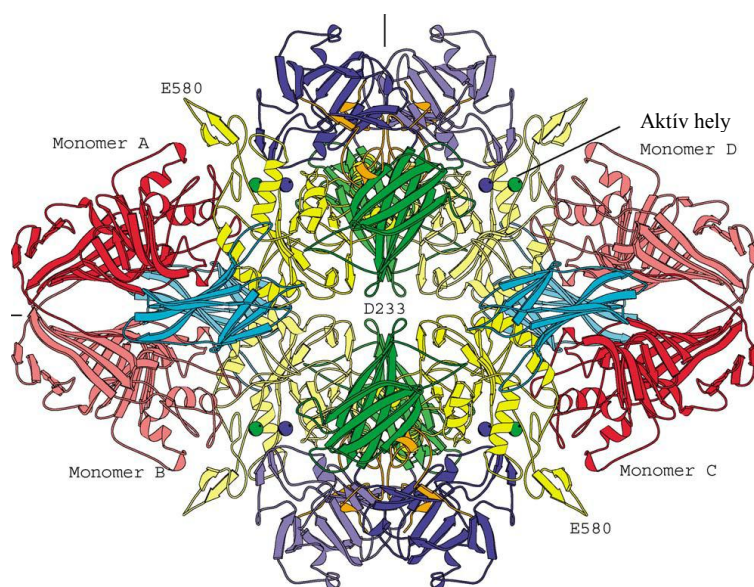
| | Glikozid hidrolázok családjai | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | GH 1 | GH 2 | GH 35 | GH 42 |
| Mechanizmus | megtartó | megtartó | megtartó | megtartó |
| 3D szerkezet | (β/α) ₈ | (β/α) ₈ | (β/α) ₈ | (β/α) ₈ |
| Katalitikus nukleofil | Glu | Glu | Glu | Glu |
| Katalitikus proton donor | Glu | Glu | Glu | Glu |

Mind a négy család, amelyekbe a béta-galaktozidáz enzimek tartozhatnak mechanizmusuk tekintetében a megtartó glikozid hidrolázok közé sorolhatóak. A 3D szerkezetük a (β/α)₈ hengerrel jellemezhető. A katalitikus nukleofil és proton donorok szerepét a glutaminsav tölti be.

A szakirodalomban elérhető adatok alapján a prokarióta eredetű β -galaktozidáz enzimek molekula méretük alapján széles skálán mozognak (14. táblázat). A bifidobaktérium által termelt β -galaktozidázok közel azonos molekula tömeget (350-370 kDa) mutatnak. Általánosságban elmondható, hogy ezen enzimek tetramer szerkezetűek [van Laare *et al.*, 2000; Dumortier *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 2006].

14. táblázat Prokarióta eredetű β -galaktozidáz enzimek molekula mérete és szerkezeti tulajdonságai

| EREDET | Méret [kDa] | Szerkezet | Hivatkozás |
|---|-------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus circulans</i> | 67 | | Fujimoto <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Bacillus megaterium</i> 2-37-4-1 | 120 | | Li <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083 | 4×89 | homotetramer | van Laare <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 | 362 | | Dumortier <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> CCRC 15708 | 367 | | Hsu <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>E. coli</i> | 464 | tetramer | Matthews, 2005 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> KUBST10-1 | 105 | heterodimer | Maischberger <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>L. acidophilus</i> R22 | 107 | heterodimer | Nguyen <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>L. plantarum</i> WCFS1 | 107 | heterodimer | Iqbal <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>L. reuteri</i> L 103 | 105 | heterodimer | Nguyen <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>L. reuteri</i> L 461 | 105 | heterodimer | Nguyen <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>S. pneumoniae</i> D39 | 69 | | Terra <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>S. mitis</i> NCTC 122611T | 268 | | Campuzano <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>S. thermophilus</i> LMD9 | 4×118 | homotetramer | Rhimi <i>et al.</i> , 2009 |



11. ábra: *Escherichia coli* eredetű β -galaktozidáz enzim szerkezete [Matthews., 2005]
 Domén 1: Kék; Domén 2: Zöld; Domén 3: Sárga; Domén 4: Világoskék; Domén 5: Piros;
 Kiegészítő peptidek: Narancssárga; Na^+ : zöld gömb; Mg^{2+} : kék gömb.

Az *E. coli*-ból izolált β -galaktozidáz enzim térbeli szerkezete a 11. ábrán látható. Molekula tömege 464 kDa. Az enzim tetramer szerkezetű, mindenegyes monomer 1023 aminosavból és öt doménből áll. A 'TIM barrel' (α/β) struktúra a harmadik doménben található. Az ábrán a Mg^{2+} és Na^+ ion kötőhelyek is szerepelnek. A maximális aktivitás eléréséhez ezen ionokra van szükség. A Mg^{2+} ion kötődési helyét az aktív centrumban mutatták ki a fehérje mind natív, mind kristály formájában.

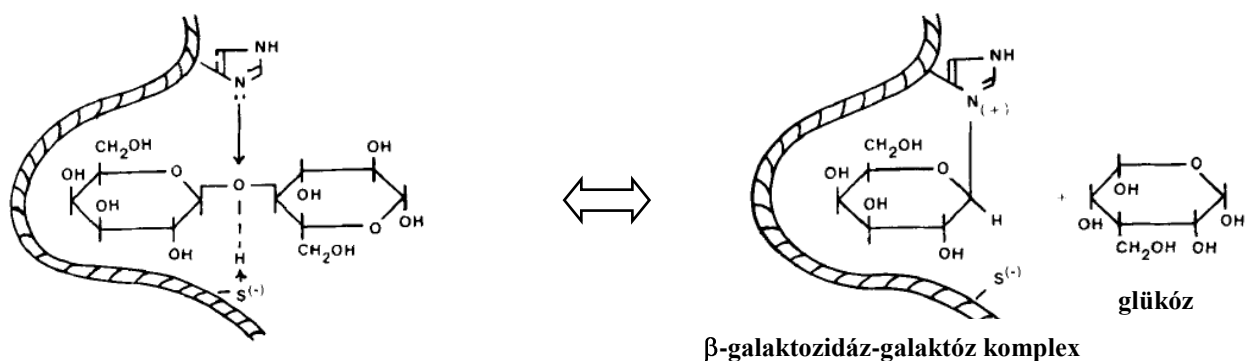
2.3.2.3 Hatásmechanizmus

A béta-galaktozidáz is a glikozil hidroláz enzimek közé sorolható. Ezen enzimekre általánosan jellemző két fő mechanizmust már részletesen bemutattam a 2.3.1.4. pontban.

A béta-galaktozidáz enzim a szénhidrátok, glikoproteinek és glikolipidek terminális, nem redukáló β -D-galaktóz monomerjeit hidrolizálja. E szubsztrátumokból a $\beta(1-3)$ és $\beta(1-4)$ kötéssel kapcsolódó galaktozil részt hasítja le.

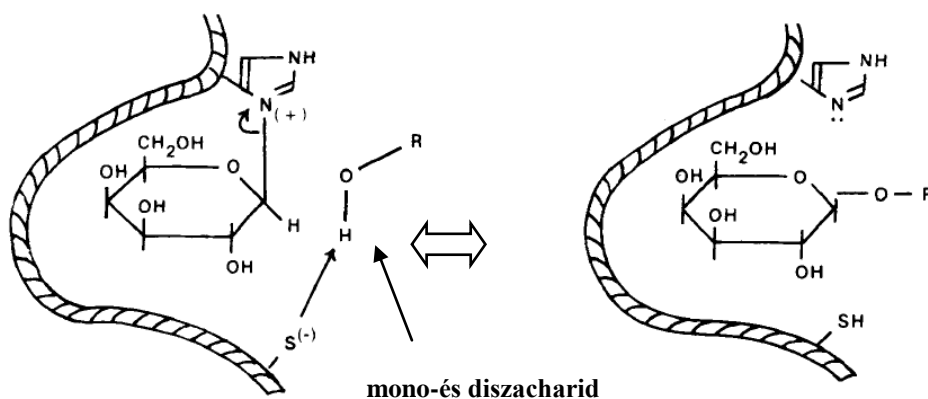
A hidrolízis első lépésében a szubsztrátum glikozil oxigénje protonálódik a sav katalizátoron keresztül. Majd általában ezt követi a nukleofil támadás S_N2 rész, amely révén a szubsztrátum (laktóz) molekuláról leválik a glükóz molekula (12. ábra). Az intermedier molekula a víz jelenlétének köszönhetően tovább hidrolizálódik és galaktóz molekula keletkezik [Richmond *et al.*, 1981].

Maksimainen és munkatársai (2012) vizsgálták a *B. circulans* subsp. *alkalophilus* alfaj béta-galaktozidáz hatásmechanizmusát. Megállapították, hogy a hidrolízis során keletkező intermedier molekulában lévő galaktóz α konfigurációjú. A hidrolízis befejeztével viszont β -D-galaktóz keletkezik és mutarotációval az oldatban α -D-galaktóz is képződik. Ez az alfa térállású galaktóz molekula képes kötődni az enzim aktív centrumához. A kapcsolódás a hidrolíziskor létrejövő intermedier molekula szerkezetéhez hasonló, de a kötés távolsága lényegesen rövidebb. Santos és munkatársai [1998] vizsgálták a laktóz hidrolízisét a kereskedelmi forgalomban kapható *Kluyveromyces fragilis* eredetű β -galaktozidáz enzimmel. Megállapították, hogy a hidrolízis végtermékeként keletkező glükóz nem gátolta a katalízist, míg a galaktóz igen.



12. ábra: Béta-galaktozidáz enzim hatásmechanizmusa laktóz szubsztrátum jelenlétében [Richmond *et al.*, 1981 nyomán]

A béta-galaktozidáz enzim a megfelelő körülmények között szintén rendelkezik transzglykozilálási aktivitással (13. ábra). A laktóz hidrolízisekor a reakció első lépésében olyan intermedier keletkezik, amelyben kovalens kötés a galaktóz 1-es szénatomja és a glutaminsav között jön létre. Mely intermedier a víz jelenlétében teljesen hidrolizálódni fog, míg víz hiányában az akceptor molekula (mint például a glükóz), másik (oligo)szacharid vagy alkohol. Ez a reakció is „konformáció megtartó”, így a termék hasonlóan a szubsztrátumhoz β -galaktozidos kötéseket tartalmaz [Maksimainen *et al.*, 2012]. Hung és Lee [2002] klónozták a *B. infantis* HL96 törzs béta-galaktozidázt kódoló génjét *E. coli*-ba és 20 és 30% laktóz koncentráció jelenlétében 30 és 60°C-on Na-foszfát pufferben vizsgálták a transzgalaktozidáz aktivitását. Nagyobb (30%) laktóz koncentráció esetén 15 órát követően 60 °C-on 190 mg/ml, míg alacsonyabb hőmérsékleten (30 °C-on) csupán 120 mg/ml galakto-oligoszacharid kihozatalt sikerült elérni.



13. ábra Galaktozil transzfer reakció béta-galaktozidáz enzimmal [Richmond *et al.*, 1981 nyomán]

2.3.2.4 Enzim működését befolyásoló paraméterek

A béta-galaktozidáz működésének optimális pH-ja eltérő a nemzetség, faj vagy akár törzs szinten is. Erre jó példa a *Bifidobacterium infantis* HL96 és *B. adolescentis* DSM20083 törzsek, mivel a *B. infantis* törzs enzimének optimális pH-ját 7,5-nek találták addig a *B. adolescentis* törzsnél ez az érték pH=6,0 volt. A prokarióta eredetű β -galaktozidáz enzim optimális pH-ja 6,0-8,0 közé eső tartományban található (15. táblázat). Ezen a tartományon kívül esik a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* törzs β -galaktozidáz enzim pH optimuma (5,0-5,5 közötti). Az irodalomban fellelhető eukarióta eredetű galaktozidáz enzimek pH optimumai savastól semleges (pH 4-7,0) tartományig mozognak (15. táblázat).

15. táblázat Mikrobiális eredetű β -galaktozidáz enzimek optimális pH és hőmérséklet adatai

| TÖRZS | Optimális pH | Optimális hőmérséklet | Hivatkozás |
|---|--------------|-----------------------|---------------------------------|
| Prokarióta eredetű | | | |
| <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i> | 6,0 | 65 °C | Gul-Guven <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 8005 | 7,7 | 70 °C | Chen <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | 65 °C | Konsoula <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM20083 | 6,0 | 50 °C | Hinz <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> HL96 | 7,5 | 50 °C | Hung-Lee <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> CCRC 15708 | 7,0 | 50 °C | Hsu <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> B1 | 7,5-8,0 | 37-40°C | Lu <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (klónozták) | 5,0-5,5 | 45 °C | Rhimi <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 | 7,5 | 55 °C | Iqbal <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Propionibacterium acidipropionici</i> CRL1198 | 7,0 | 50 °C | Zárate <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Propionibacterium acidipropionici</i> Q4 | 7,0 | 50 °C | Zárate <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Thermus thermophilus</i> HB-8 | 6,6 | 87°C | Maciuńska <i>et al.</i> , 1998 |
| Eukarióta eredetű | | | |
| <i>Aspergillus niger</i> N400 | 4 | 60-65°C | Manzanares <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 4,8 | 55 °C | Freitas <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Guehomyces pullulans</i> 17-1 | 4 | 50 °C | Song <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | 6,5-7,0 | 40 °C | Santos <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | 6,6-7,0 | 40 °C | Zhou & Chen, 2001 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> ATCC8583 | 6,5 | 40 °C | Numanoğlu & Sungur 2004 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> NCAIM 00237 | 4 | 30°C | Nagy <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Rhizomucor</i> sp. | 4,5 | 60 °C | Shaikh <i>et al.</i> , 1999 |

Alkalmazás szempontjából lényeges információ az adott enzim optimális hőmérséklete, valamint stabilitása. A legnagyobb hőmérséklet optimumot a *Thermus thermophilus* törzs béta-galaktozidáz enzime mutatta (15. táblázat), amelyet 87 °C-ban határoztak meg [Maciuńska *et al.*, 1998]. Általánosan a 45-55 °C közötti optimum jellemző a prokarióta eredetű béta-galaktozidáz enzimekre. Az azonos nemzetségbe tartozó törzsek (*Bifidobacterium infantis* HL96, *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083, *Bifidobacterium longum* CCRC 15708) eredetű béta-galaktozidázok azonos 50 °C-os optimummal rendelkeztek [Hung & Lee, 2002; Hinz *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2006]. Ez az azonosság megfigyelhető az eukarióta *Kluyveromyces* törzseknél (*Kluyveromyces lactis*: 40°C; *Kluyveromyces fragilis*: 40 °C) is [Zhou & Chen, 2011; Santos *et al.*, 1998]. Az eukarióta eredetű β -galaktozidáz enzimeknek 30-65 °C közötti optimummal rendelkeznek (15. táblázat).

16. táblázat Különböző eredetű β -galaktozidáz enzimek stabilitásra vonatkozó adatai

| Törzs | Stabilitás | Hivatkozás |
|--|--|---------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> N400 | pH=4 → 20 óra, 85% aktivitás | Manzanares <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> CCRC 15708 | 40 °C → 40 perc 80% aktivitás | Hsu <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 8005 | $t_{1/2}$: 60°C → 120 óra 65°C → 50 óra 70 °C → 9 óra | Chen <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM20083 | $t_{1/2}$ = 10 perc 50°C-on | Hinz <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> HL96 | 37 ill. 50°C → 80 perc 90% akt. | Hung & Lee, 2002 |
| <i>Guehomyces pullulans</i> 17-1 | 40°C → 2,5 óra 84,14% aktivitás | Song <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | $t_{1/2}$: 50°C → 6 óra 55°C → 3 óra 60°C → 1,5 óra 65°C → 0,4 óra | Rhimi <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 | pH=6,5-8; 30°C → 5óra, 75% akt. 37°C → 5 óra, 43 % aktivitás | Iqbal <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Propionibacterium acidipropionici</i> Q4 | 60°C → 15 perc, 70 % aktivitás | Zárate <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Rhizomucor</i> sp | $t_{1/2}$ = 2,5 óra 70 °C | Shaikh <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Thermus thermophilus</i> HB-8 | pH=6,6 75°C → 5óra, 98% aktivitás pH=6,6 85°C → 5óra, 80% aktivitás | Maciuńska <i>et al.</i> , 1998 |

A szakirodalomban fellelhető béta-galaktozidáz enzim stabilitás eredményeit 16. táblázatban foglaltam össze. Számos kísérletben egy meghatározott hőmérsékleten vagy pH-n vizsgálták az enzim stabilitását és adták meg a kezdeti aktivitáshoz képest megmaradt aktivitást százalékosan [Hsu *et al.*, 2006, Iqbal *et al.*, 2010, Zárate *et al.*, 2002], míg a mások a félelet idővel jellemzik

azt [Hinz *et al.*, 2004, Rhimi *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2008]. Talán ez utóbbi meghatározással összehasonlíthatóbbá válnak az adatok. Alkalmazhatóság szempontjából a *Bacillus stearothermophilus* ATCC 8005 törzs enzime figyelemre méltó, mivel félélet ideje 70°C-on 9 óra és 60 °C-os hőmérsékleten 120 óra volt [Chen *et al.*, 2008].

Iqbal és munkatársai [2010] vizsgálták a *Lactobacillus plantarum* WCFS1 törzs rekombináns β -galaktozidáz enzimének stabilitását és megállapították, hogy ha 1 mM, illetve 10 mM MgCl_2 -ot adagolnak a reakcióelegyhez, akkor 37°C-on öt óra eltelté után is megmarad az aktivitás 73, illetve 85 %-a. Ilyen mértékű stabilitást tapasztaltak pH 6,5-8,0 közötti tartományban 5 óra elteltével 30 °C-on is. MgCl_2 nélkül mindössze az aktivitás 45%-át tartotta meg.

2.3.2.5 Alkalmazás

A laktóz béta-galaktozidáz enzim hidrolízisének ipari alkalmazás tekintetében számos előnye van [Milchová & Rosenberg, 2006]:

- A tejben lévő laktóz lebontásával a laktóz-intolerancia tüneteinek enyhítése.
- Transzgalaktozidáz aktivitását kihasználva prebiotikus GOS előállítása.
- Laktózt tartalmazó termékek technológiai és érzékszervi tulajdonságainak javítása.

A béta-galaktozidáz enzim alkalmazása szempontjából két típust különböztethetünk meg. A hőstabilis β -galaktozidáz enzimek előnyösebbek a csökkentett laktóz tartalmú termékek előállításánál. Az ipari alkalmazásban célszerű termostabilis hidroláz enzimeket használni, mivel nagyobb reakció sebesség érhető el, valamint a mikrobiológiai fertőzés is megelőzhető [Li *et al.*, 2009]. A hidegtűrő enzim segítségével viszont a tej és tejtermékek enyhe körülmények között kezelhetők, közben a termék tápértéke megóvható [Milchová & Rosenberg, 2006]. A laktóz enzim hidrolízése kétségtől számos előnnyel rendelkezik: nem keletkezik melléktermék, nem lesz a terméknek kellemetlen íze, szaga és színe sem. Ezen pozitívumokat egybevéve fontos alkalmazási területe a béta-galaktozidáz enzimnek a tejipar. Egyre szélesebb körben alkalmazzák a szabad enzim reaktorok mellett a rögzített β -galaktozidáz enzim technológiát a tejben lévő laktóz tartalmának csökkentésére. A laktóz mennyiségének csökkentése mellett megelőzhetővé válik a termékben jelenlévő diszacharid okozta kikristályosítása következtében kialakuló minőségi romlás is. Az ipari alkalmazásának fontos területe a sajtgyártás, ahol a keletkező savó magas laktóztartalmának csökkenésével, megelőzhetővé válik ezen tejipari hulladékkal történő környezetszennyezés [Santos *et al.*, 1999]. A sajtgyártásnál növelhetjük a hatékonyságot, ha a keletkezett savót az iparban alkalmazott membrántechnológiák és rögzített enzim technológiákat ötvözzük. A folyamat során ultraszűrővel elválasztják a savóban lévő fehérjét, majd reverz ozmózissal sótalánítják. Az így kapott permeátumot a rögzített β -galaktozidáz

enzimet tartalmazó reaktorba vezetik, ahol megtörténik a laktóz hidrolízis. Az így kapott terméket sóalanítják és töményítik, majd a szükséges felhasználási formában szirupként vagy por formájában szállítják ki.

További alkalmazási lehetőség lehet a galakto-oligoszacharidok előállítása, amelyek prebiotikumokként hasznosíthatók. Iqbal és kutatócsoportja (2010) vizsgálta a *Lb. plantarum* WCFS1 törzs által termelt béta-galaktozidáz transzglükozilációs aktivitását lakóz jelenlétében. A laktóz biokonverziója 85%-ra volt tehető és ennek megfelelően növekedett a szintetizált GOS mennyisége is. Már nyolc órás reverz hidrolízist követően elérték a maximális kihozataalt (41 %). Megállapították, hogy a keletkezett GOS keverék 19 % diszacharidot (mely nem laktóz), 21% triszacharidot és 1,3% tetraszacharidot tartalmaz. A laktobacillusok mellett bifidobaktérium eredetű béta-galaktozidáz enzimek galakto-oligoszacharid szintézisét is vizsgálták már [Rabiu *et al.*, 2001]. Rabiu és munkatársai [2001] *B. angulatum* törzs béta-galaktozidáz enzimének segítségével szintetizáltak GOS-ot. A szintézis 30 v/v%-os laktózzal, 55°C-on pH=7,5-n zajlott hét óráig. A szintézis kihozatala 43,8 % volt.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Alkalmazott törzsek

Alkalmazott *Bifidobacterium* törzs: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen)

Alkalmazott *Lactobacillus* törzsek: *Lactobacillus casei* 01 (Chr. Hansen)

Lactobacillus acidophilus La-5 (Chr. Hansen)

3.2 Tápközegek

- TPY tápleves (Trypticase – Phyton – Yeast extract)

| | |
|------------------------------------|-------------|
| Trypticase pepton | 10 g |
| Phytone pepton | 5 g |
| Élesztő kivonat | 2,5 g |
| Tween 80 | 1 ml |
| Cisztein*HCl | 0,5 g |
| Dikálium-hidrogén-foszfát | 2 g |
| Magnézium-klorid*6H ₂ O | 0,5 g |
| Cink-szulfát*7H ₂ O | 0,25 g |
| Kalcium-klorid | 0,15 g |
| Vas-klorid*6H ₂ O | 0,03 g |
| Desztillált vízzel kiegészítve | 1000 ml –re |

Sterilizés 121°C-on 15 percig

- TPYG tápleves

TPY alaptápleves 5g/liter koncentrációban kiegészítve glükózzal. Sterilizve 121°C-on 15 percig.

- TPY+L tápleves

TPY tápleves megfelelő koncentrációban kiegészítve laktózzal. Sterilizve 121°C-on 15 percig.

Munkám során 0,1; 0,5, 1; 1,5, 2 w/v%-os laktóz koncentrációban egészítettem ki a TPY tápközeget.

- TPY+R tápleves

TPY tápleves megfelelő koncentrációban kiegészítve raffinózzal. Sterilizve 121°C-on 15 percig.

Munkám során 0,5, 1; 1,5, 2 w/v%-os raffinóz koncentrációban egészítettem ki a TPY tápközeget.

- TPY+M tápleves

TPY tápleves megfelelő koncentrációban kiegészítve melibiózzal.

Munkám során 2 w/v%-os koncentrációban melibióz egészítettem ki a TPY tápközeget.

Sterilizve 121°C-on 15 percig.

- TPYG tápagar

TPYG tápleves 1000 ml
 Agar-agar 15 g
 A pH értékét 6,8-ra állítottam, majd autoklávoztam 121°C-on 20 percig

- MRS alaptápleves (de Man, Rogosa and Sharpe)

| | |
|-----------------------------|---------|
| Kazein pepton | 10 g |
| Húskivonat | 8 g |
| Élesztőkivonat | 4 g |
| Dikálium-hidrogén-foszfát | 2 g |
| Tween 80 | 1 ml |
| Di-ammónium-hidrogén-citrát | 2 g |
| Nátrium-acetát | 5 g |
| Magnézium-szulfát | 0,2 g |
| Mangán-szulfát | 0,04 g |
| Desztillált víz | 1000 ml |

- MRSg tápleves

MRS tápleves 20g/liter koncentrációban kiegészítve glükózzal. Sterilezve 121°C-on 15 percig.

- MRS+L tápleves

MRS tápleves megfelelő koncentrációban kiegészítve laktózzal. Sterilezve 121°C-on 15 percig.

Munkám során 0,1; 0,5; 1; 2 w/v%-os laktóz koncentrációval egészítettem ki a TPY tápközeget.

- MRS+R tápleves

MRS tápleves megfelelő koncentrációban kiegészítve raffinózzal. Sterilezve 121°C-on 15 percig.

Munkám során 1; 1,5; 2; 2,5; 3 w/v%-os raffinóz koncentrációval egészítettem ki a TPY tápközeget.

- MRS agar

| | |
|--------------------------------|------------|
| MRS broth /EMD Chemicals/ | 52,3 g |
| Agar-agar | 15 g |
| Desztillált vízzel kiegészítve | 1000 ml-re |

pH: 6,8. Sterilizés autoklávban 121°C-on 15 percig.

- Beeren's agar [Beeren's, 1990]

| | |
|---------------|-------|
| Columbia agar | 44 g |
| Glükóz | 5 g |
| Cisztein*HCl | 0,5 g |
| Agar -agar | 5 g |
| 1N NaOH | 48 ml |

Propionsav
Desztillált víz

5 ml
1000 ml –re

3.3 Tenyésztési módszerek

3.3.1 Törzsfenntartás

A bifidobaktériumok tenyésztéséhez anaerob körülményeket a 14. ábrán látható Bugbox (anaerobic chamber, Ruskin Technology, Leeds, Anglia) anaerob munkahelyet, illetve Jar+GasPak rendszert (Oxoid) alkalmaztam. A BugBox anaerob munkahely működésének elve, hogy a kamrából a levegőt kiszivattyúzzuk, majd egy speciális gázeleggyel árasztjuk el, amely összetételét tekintve 10 % szén-dioxid és 5 % hidrogén nitrogénben oldva. A maradék oxigén megkötésére a boxban található palládium katalizátor szolgál, mely felületén a hidrogén és az oxigén vizet képez.

A bifidobaktériumok tenyésztése TPYG táplevesben 37°C-on történt. Az alkalmazott két *Lactobacillus* törzset szintén 37°C-on tenyésztettem MRSG tápközegben.



14. ábra Anaerob munkahely (Bugbox)

3.3.2 Enzimfermentációs kísérletek

Az enzimfermentációs kísérleteket különböző méretű Erlenmeyer lombikokban valósítottam meg. A fermentációkat rendre egy napos inokulummal (1 térfogat százalékos beoltás mellett) indítottam. Az inokulumok tápközege TPYG, illetve MRSG tápközegek voltak, amelyekbe 5 térfogat százaléknyi sejtszuszpenziót oltottam. A fermentáció 37 °C-on 1-2 napig zajlott. Meghatározott időközönként mintát vettem, és a pH és a galaktozidáz enzim aktivitások mérésével követtem nyomon a fermentációt.

A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs szaporításának léptéknövelését 2 literes hasznos térfogatú Biostat B (B. BRAUN) fermentorban valósítottam meg. A fermentáció 37 °C-on, 150 rpm-es fordulatszám mellett 20 óráig tartott. Az anaerob környezetet a levegőztető rendszeren

keresztül beáramoltatott kevert gázzal (10 % szén-dioxid nitrogén gázban oldva) valósítottam meg.

3.4 Sejtfeltárás

A tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok galaktozidáz enzimeit intracellulárisan termelődnek, ezért detektálásukhoz a sejtek feltárása szükséges.



15. ábra French Press nagynyomású homogenizátor

A sejtfeltárás előtt centrifugálással elválasztottam a sejteket (12000 rpm, 10 perc, 4 °C-on), majd a sejteket háromszor pufferrel mostam (0,2 M McIlvaine pH=6,6) és a mosási lépések után centrifugálással összegyűjtött sejteket használtam fel a sejtfeltáráshoz. Sejtek feltárására a mechanikai eljárások közé tartozó French Press nagynyomású homogenizátort (15. ábra) alkalmaztam. A nagy nyomású homogenizátor segítségével történő sejtfeltárás esetében, egy speciálisan kialakított fojtáson (homogenizátor szelepen) keresztül nagy nyomással (200–1000 bar) átnyomjuk a szuszpenziót. Mechanizmusát tekintve a sejtek a hirtelen nyomásváltozás eredményeként szétrobbannak. A sejtfeltárást egymást követő ciklusokban végeztem el 800 Psi nyomás mellett. A feltárt sejteket a felhasználásig fagyasztva tároltam.

3.5 Élősejtszám meghatározás

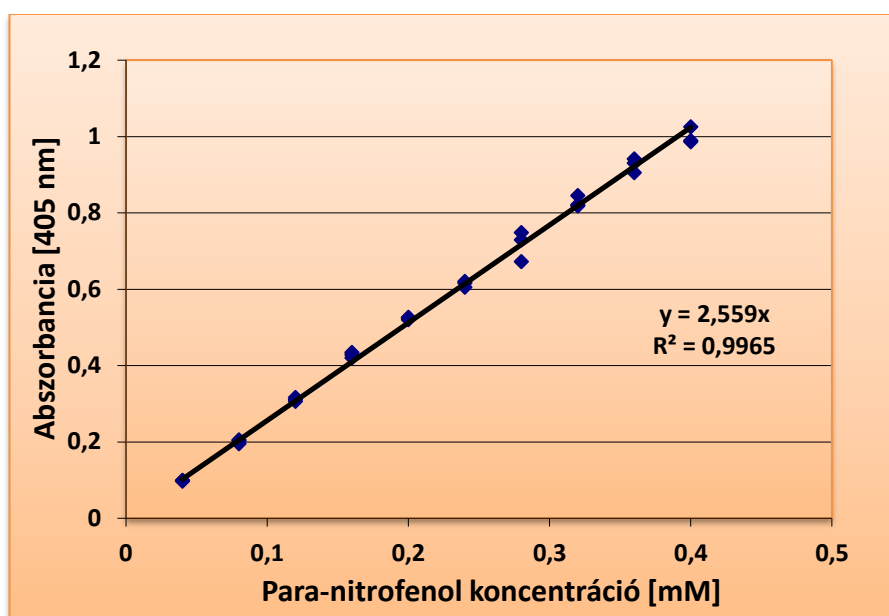
Bifidobacterium-ok esetében TPY, illetve szelektív Beeren's agaron lemezöntéssel módszerrel történt. Inkubálás anaerob körülmények között Bugboxban, illetve Anaerobe Jarban 37°C-on 2-3 napig történt.

Lactobacillus-ok esetében lemezöntéssel módszerrel MRS agaron 37°C-os inkubálási hőmérséklet mellett termosztátban történt 2-3 napig.

Az inkubálást követően a kifejlődött telepeket megszámlálva következtettem a mintában lévő sejtszámokra, amelynek értékét tke/ml dimenzióban adtam meg.

3.6 Galaktozidáz enzim aktivitások meghatározása

A galaktozidáz enzimek aktivitásának meghatározásához McIlvaine puffert (pH=6,6) alkalmaztam. Elkészítéséhez 728 ml 0,2 M-os Na_2HPO_4 törzsoldatot és 272 ml 0,1 M-os citromsav oldatot készítettem, a pH-t szükség szerint korrigáltam a megfelelő törzsoldat alkalmazásával. A 17. táblázatban szereplő összemérést alkalmaztam az aktivitás méréséhez. A minta hozzáadása előtt a reakcióelegyeket 5 percig 37°C-on előinkubáltam majd 0,2 ml megfelelően hígított mintával indítottam az 5 perces reakciót. A reakcióidő lejártá után 5 ml 0,1 M Na_2CO_3 oldattal állítottam le a reakciót, majd 405 nm-en spektrofotométer segítségével mértem az oldat abszorbanciáját. A felszabadult para-nitrofenol mennyiség meghatározásához standard sort készítettem (16. ábra) a kapott kalibrációs egyenes meredekségét használtam az aktivitás kiszámításához.



16. ábra: Para-nitrofenol mennyiségi meghatározására szolgáló kalibrációs egyenes

17. táblázat: Az alfa-galaktozidáz aktivitás meghatározáshoz alkalmazott összemérés

| | Desztillált víz [ml] | Puffer [ml] | Szubsztrátum [ml] | Enzim oldat Minta[ml] |
|------------------|-------------------------|----------------|----------------------|--------------------------|
| Műszer vak | 0,7 | 0,3 | - | - |
| Szubsztrátum vak | 0,2 | 0,3 | 0,5 | - |
| Enzim vak | 0,5 | 0,3 | - | 0,2 |
| Reakció | | 0,3 | 0,5 | 0,2 |

Minden aktivitás mérést két párhuzamosban és két különböző hígításban elkészített mintával valósítottam meg.

Aktivitás számítása:

$$\text{Aktivitás}_{\text{u-gal}} = \{(A_{\text{minta}} - A_{\text{EV}} - A_{\text{SV}}) \cdot \text{hígítás} \cdot \text{térfogat}_{\text{reakcióelegy}}\} / (\text{térfogat}_{\text{minta}} \cdot \text{reakció idő} \cdot 2,559)$$

A_{minta} : Minta abszorbanciája

A_{EV} : Enzimvak abszorbanciája

A_{SV} : Szubsztrátumvak abszorbanciája

Egy egységnyi galaktozidáz az az enzimmennyiség, mely 1 μM p-nitrofenolt szabadít fel egy perc alatt a reakció körülményei között.

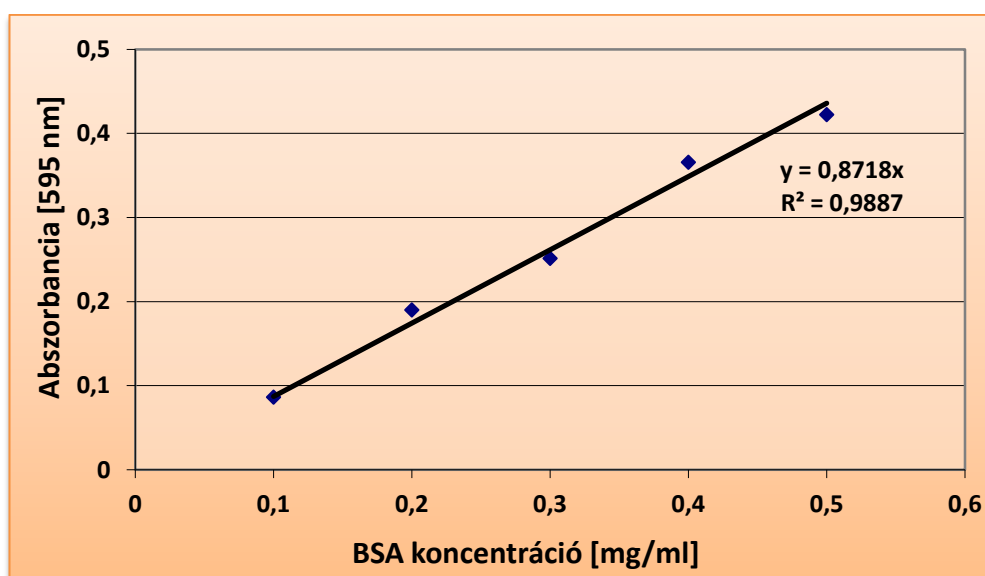
Dolgozatomban többfajta származtatott aktivitás értékeket használok, melyek a következők:

- **U/mg**: Specifikus aktivitás, mely az enzim fehérjetartalmára vonatkoztatott aktivitás
- **U/100 ml**: 100 ml fermentléből származó feltárt sejtek aktivitása
- **U/10¹⁰sejt×h**: 10¹⁰ sejt által meghatározott időegység alatt mutatott aktivitás

3.7 Fehérjetartalom meghatározása

3.7.1 Bradford módszer

A fehérjetartalom meghatározására Bradford módszert alkalmaztam (Bradford, 1976). Az eljárás elve, hogy a fehérje és a színező anyag (Coomassie Brilliant Blue G-250) kék színű komplexet hoz létre, melynek maximális fényelnyelése 595 nm-en van. A minta fehérje koncentrációjára a fényelnyelés mértékéből következtethetünk. A módszer 1 és 140 $\mu\text{g/ml}$ fehérje koncentráció tartományban alkalmazható. A meghatározáshoz koncentrált színező reagens oldatot használtam, amelyet a Bio-Rad cég (Bio-Rad, USA) gyárt és forgalmaz. Először kalibrációs sort készítettem 5 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) törzsoldat felhasználásával. A kapott kalibrációs egyenest a 17. ábrán szemléltettem.



17. ábra: Fehérjetartalom meghatározásához felvett kalibrációs egyenes

A megfelelően hígított mintákat használtam fehérjetartalom meghatározására. A vizsgálatokat három ismétléssel és több beméréssel valósítottam meg.

A fehérjetartalom kiszámítása a következő egyenlet segítségével történt:

$$\text{Fehérjetartalom (mg/ml)} = \{(A_{\text{minta}} - A_{\text{vak}}) * \text{hígítás}\} / 0,8718$$

ahol a 0,8718 a kalibrációs egyenes meredeksége,

A_{minta} - a minta abszorbanciája,

A_{vak} - a vak abszorbanciája (csak desztillált vizet tartalmaz).

3.7.2 280 nm-en történő fényelnyelésen alapuló módszer

Ezt a módszert a fehérje tisztítás során alkalmaztam, hiszen ebben az esetben nem volt szükségem pontos fehérjetartalom meghatározására, hanem csak a hozzávetőleges értékre és az egyes fehérje specíesek helyének meghatározására. Gyakorlatban megmértem a minta abszorbanciáját 280 nm-en spektrofotométerrel vagy FPLC detektorral (átfolyásos küvetta).

3.8 Enzim lokalizációjának meghatározása

Raffinózon szaporított *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 20 órás tenyészléből a sejteket összegyűjtöttem és háromszori egymást követő sejteltárás után lecentrifugáltam a feltárt szuszpenziót. Az üledékként kapott sejtörmelékét 1 ml 200 mM McIlvaine (pH=6,6) pufferral felsuszpendáltam és ezt a frakciót tekintettem a sejtfalhoz kötött résznek, míg a centrifugálás után kapott felülúszó a citoplazmában előforduló enzimeket tartalmazta.

3.9 Enzimmtisztítási eljárások

3.9.1 Alkalmazott kromatográfiás módszerek

Az alfa-galaktozidáz enzim kinyerését és tisztítását sejteltárással, ioncserélő kromatográfiával és gélszűrés kombinációjával valósítottam meg. Az enzimmtisztítás során alkalmazott kromatográfiás lépéseket FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) berendezéshez (Pharmacia, Uppsala, Sweeden) csatlakoztatott különböző töltetű oszlopok segítségével valósítottam meg 4°C-on. A kromatográfiás oszlopokra a sejteltárás után kapott feltárt sejteket lecentrifugáltam és a kapott felülúszót vittem fel több lépésben az oszlopokra. A különböző kromatográfiás lépések során az alfa-galaktozidáz aktivitást mutató frakciókat összeöntöttem és 50 mM pH=5,8 McIlvaine puffer alkalmazásával 10 kDa-os vágási értékű Amicon ultraszűrő berendezéssel sóalanítottam és koncentráltam.

Használt töltetek (Pharmacia, Uppsala, Sweden)**➤ Q Sepharose:** erős anion-cserélő (1*30 cm)

pH stabilitás: 2-12

átlagos szemcseméret: 90 µm

áramlási sebesség: 400-700 cm/h

mátrix típusa: 6% keresztkötött agaróz

összes ionkapacitás: 0,18-0,25 mmolCl⁻/ml gél

Alkalmazott puffer: 50 mM McIlvaine puffer (pH=5,8) 1 M NaCl

Áramlási sebesség: 3 ml/perc

Felvitt minta mennyisége: 1 ml

Frakció térfogat: 8 ml

➤ DEAE Sepharose Fast Flow: gyenge anion-cserélő (2,5*50 cm)

pH stabilitás: 2-12

átlagos szemcseméret: 90 µm

áramlási sebesség : 300-600 cm/h

mátrix típusa: 6% keresztkötésű agaróz

összes ionkapacitás: 0,11-0,16 mmolCl⁻/ml gél

Alkalmazott puffer: 50 mM McIlvaine puffer (pH=5,8) 1 M NaCl

Áramlási sebesség: 3 ml/perc

Felvitt minta mennyisége: 1 ml

Frakció térfogat: 9 ml

➤ Phenyl Sepharose: hidrofób kölcsönhatású

pH stabilitás: 3-13

maximális térfogatáram: 3-4 ml/perc

kapacitás: 40 µmol fehérje/ml gél

maximális nyomás: 3 bar

mátrix típusa: 6% térhálosított agaróz

Alkalmazott puffer: 50 mM McIlvaine puffer (pH=5,8) 1,3 M (NH₄)₂SO₄

Áramlási sebesség: 2 ml/perc

Felvitt minta mennyisége: 1 ml

Frakció térfogat: 2 ml

➤ Sephadex G200: molekulaszűrő

pH stabilitás: 2-10

mátrix típusa: dextrán (epiklórhidrinnel keresztkötött)

optimális molekulatömeg elválasztási tartomány: 5-600 kDa

Alkalmazott puffer: 10 mM McIlvaine puffer (pH=5,8)

Áramlási sebesség: 0,5 ml/perc

Felvitt minta mennyisége: 0,5 ml

Frakció térfogat: 8 ml

3.9.2 *Ultraszűrés*

Az ultraszűrést a fehérjék tisztítása során a kromatográfiás lépések között koncentrálásra és sótalanításra használtam. A fehérjeoldatot Amicon ultraszűrővel koncentráltam, melynek a vágási értéke 10 kDa volt. A mintát felülről három bar túlnyomás biztosítása mellett vittem a membránra. Az ultraszűrést jégágyon végeztem.

3.10 Az enzim jellemzéséhez alkalmazott módszerek

3.10.1 *Molekulatömeg meghatározása*

A tisztított enzim molekulatömegének becslése SDS-PAGE gélelektroforézissel történt. Kész gél - Mini-PROTEAN TGX 10 %-os - alkalmaztam, amelyet a BIO-RAD cég forgalmaz.

Az SDS-PAGE gélelektroforézishez használt oldatok:

1. *Futtató puffer: pH=8,3*

| | |
|-------------|--------|
| - Tris Base | 30,3 g |
| - Glicerín | 144 g |
| - SDS | 10 g |

A futtató puffer összetevőit 1000 ml desztillált vízben oldottam, és 10x-es hígításban alkalmaztam.

2. *Mintakezelő puffer:*

| | |
|---------------------------|---------|
| - Desztillált víz | 3,55 ml |
| - 0,5 M Tris/HCl (pH=6,8) | 1,25 ml |
| - Glicerín | 2,5 ml |
| - 10 %-os SDS | 2,0 ml |
| - 0,5 %-os bróm-fenol kék | 0,2 ml |

3. 20 %-os triklór-ecetsav

4. 0,25 %-os Coomassie Blue R-250 festék

5. Mosófolyadék:

| |
|-------------------------|
| - 100 ml ecetsav |
| - 400 ml 96%-os alkohol |

A mosófolyadék összetevőit 1000 ml-re desztillált vízzel felhígítottam.

A tisztított frakciókat ultraszűréssel koncentráltam és liofileztem. A mintákra 50 µl mintakezelő oldatot mértem, majd 5 perc forralás következett. A kész gél zsebeibe 15 µl-t vittem fel a mintából és a molekulamarkerből 10 µl-t, a futtató puffert 10-szeresre hígítottam és beleöntöttem az összeszerelt futtatókádba. A futtatás egyenáramban (200 V) történt.

Ezután 20 %-os triklór-ecetsavban 20 percig áztattam a gélét, hogy fixáljam a mintákat. Majd Coomassie Blue R-250 festékkel (ecetsav, etanol és desztillált víz keverékében feloldva) történt a festés, folyamatos rázatással egy éjszakán keresztül. Azután a gélből a festék felesleget mosófolyadékkal távolítottam el, addig, amíg átlátszó gélét kaptam, és a sávok láthatóvá váltak.

3.10.2 A hőmérséklet és a pH optimum meghatározása

A hőmérséklet optimum meghatározásához McIlvaine puffert (pH=6,5) használtam és 25-60°C között vizsgáltam az alfa-galaktozidáz enzim aktivitás alakulását. A pH optimum meghatározásához kétféle puffert – 200 mM McIlvaine puffer (pH 3,0-7,0) és TRIS/HCL puffer (pH 7,2-9,0) - választottam és 37°C-on mértem az aktivitásokat.

3.10.3 Enzimstabilitás meghatározása

Az enzim stabilitását különböző pH értékek és hőmérséklet értékek mellett az idő függvényében vizsgáltam. McIlvaine puffert pH=5,0 és pH=7,5 közötti tartományban használtam és a tisztított enzimfehérjét 35-50°C között e pufferekben inkubáltam és meghatározott időközönként mintát vettem, majd standard körülmények között meghatároztam az enzim aktivitást. Az enzim stabilitásának értékeléséhez válaszfelületi módszert alkalmaztam [Rezessy-Szabó, 2003], amely segítségével figyelembe tudom venni a pH és a hőmérséklet kölcsönhatását.

3.10.4 Ionok hatása az enzimaktivitásra

A különböző ionok hatásának vizsgálata 37°C-on 50 mM McIlvaine puffer (pH=6,5) jelenlétében enzimaktivitás méréssel történt. Az alábbi vegyületeket használtam fel - AgNO₃, CaCl₂, CoCl₂*6H₂O, CuSO₄, HgCl₂, KCl, MgCl₂*6H₂O, MnSO₄, NiCl₂, ZnSO₄ – amelyeket 10 mM koncentrációban készítettem el McIlvaine pufferben (pH=6,5).

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Sejtfeltárás optimálása

A probiotikus baktériumok nem mindig választják ki a tápközegebe a galaktozidáz enzimeket, hanem sokszor csak a sejten belül a citoplazmában vagy sejtfalhoz kötötten termelik. A vizsgálatokhoz megfelelő sejtfeltérési technika kidolgozására volt szükségem. A megvalósításához nagynyomású homogenizátort (French Press) választottam, amely hatékony és léptéknövelhetőnek bizonyul a biotechnológiai iparban. Az optimáláshoz a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs sejtuszuszenzióját használtam.

A 24 órás TPYG tápközegeben szaporított törzs tenyészetéből nyert sejteket centrifugálással (14000 rpm, 10 perc, 4 °C) gyűjtöttem össze, majd háromszor mostam McIlvaine pufferral. Az összegyűjtött sejteket mechanikus úton French Press berendezéssel több egymást követő ciklusban tártam fel.

Vizsgálataim során megmértem az egyes feltérési ciklusok után kapott minták fehérjetartalmát, α - és β -galaktozidáz aktivitását (18. táblázat)

18. táblázat: A fehérjetartalom és az enzimaktivitások változása a feltérások során

| Feltérési ciklusok száma | Fehérje [mg/ml] | Alfa-galaktozidáz altivitás | | Béta-galaktozidáz aktivitás | |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| | | [U/ml] | [U/mg fehérje] | [U/ml] | [U/mg fehérje] |
| 1 | 37,8 | 3,48 | 0,09 | 2,91 | 0,077 |
| 2 | 50,8 | 8,84 | 0,17 | 3,23 | 0,064 |
| 3 | 58,2 | 8,75 | 0,15 | 3,53 | 0.061 |

A feltérások számával növekedik a mintában lévő fehérjetartalom. A legnagyobb fehérjetartalom 58,2 mg volt, amelyet háromszor feltárt *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 sejteknél mértem. A legnagyobb α -galaktozidáz aktivitást (8,84 U/ml) a kétszeri feltártást követően mértem. A β -galaktozidáz esetében a legnagyobb aktivitást (3,53 U/ml) azonban a háromszorosan feltárt sejteknél tapasztaltam. A fehérjetartalomra vonatkoztatott specifikus aktivitások eltérő lefutást mutattak a két enzim tekintetében. A β -galaktozidáz esetében egy csökkenő tendenciát figyeltem meg az ismételt feltérások során, míg az α -galaktozidáznál a legnagyobb specifikus aktivitást a második feltérás után tapasztaltam. Majd kismértékben csökkent a harmadik feltérást követően. Ezzel a feltérési eljárással elegendő fehérjemennyiség kinyerhető és az aktivitás értékek a harmadik feltérást követően is csak csekély mértékben csökkentek. Ennek alapján a következő

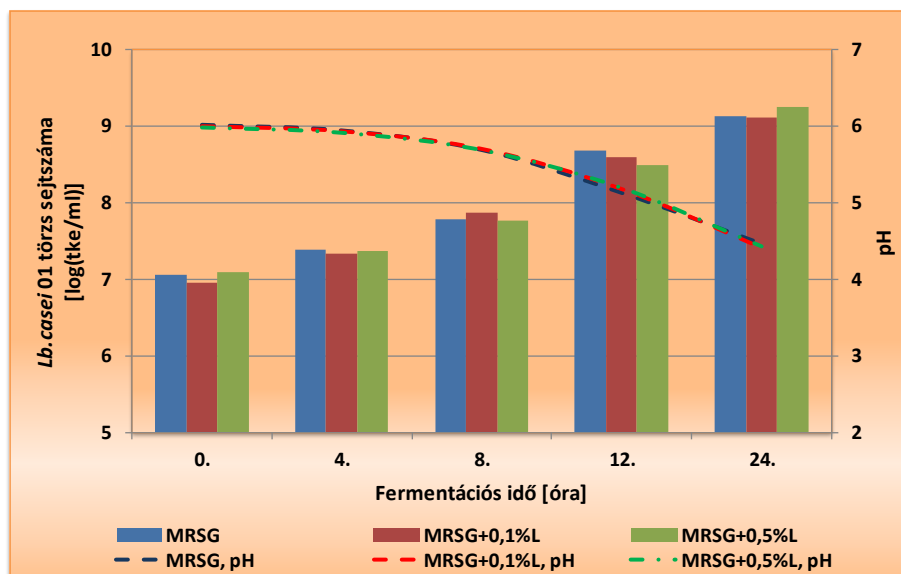
vizsgálataimban a három ciklusos feltérési technikát alkalmaztam mind a bifidobaktérium, mind a tejsavbaktérium törzsek esetében.

4.2 Tejsavbaktérium törzsek galaktozidáz enzim szintézisének kimutatása és indukálása

Kísérleteim során két élelmiszeripari jelentőségű probiotikumként regisztrált tejsavbaktérium törzs (*L. acidophilus* La-5, *L. casei* 01) galaktozidáz aktivitásainak alakulását vizsgáltam különböző környezeti körülmények között. A választott törzsek optimális szaporodási hőmérséklete 37 °C, ezért fermentációs kísérleteimet ezen a hőmérsékleten vezettem.

4.2.1 *Lactobacillus casei* 01 törzs β -galaktozidáz enzim szintézise

A *L. casei* 01 törzs β -galaktozidáz enzim szintézisének vizsgálatára a baktériumot MRSG és a különböző laktóz koncentrációval kiegészített MRSG+L tápközlegeken szaporítottam. A szaporodás értékeléséhez tenyésztési módszerrel meghatároztam az élősejtszámot, valamint követtem a pH alakulását (18. ábra).



18. ábra *L. casei* 01 törzs növekedése különböző mennyiségű és minőségű szénhidrátot tartalmazó MRS tápközegben

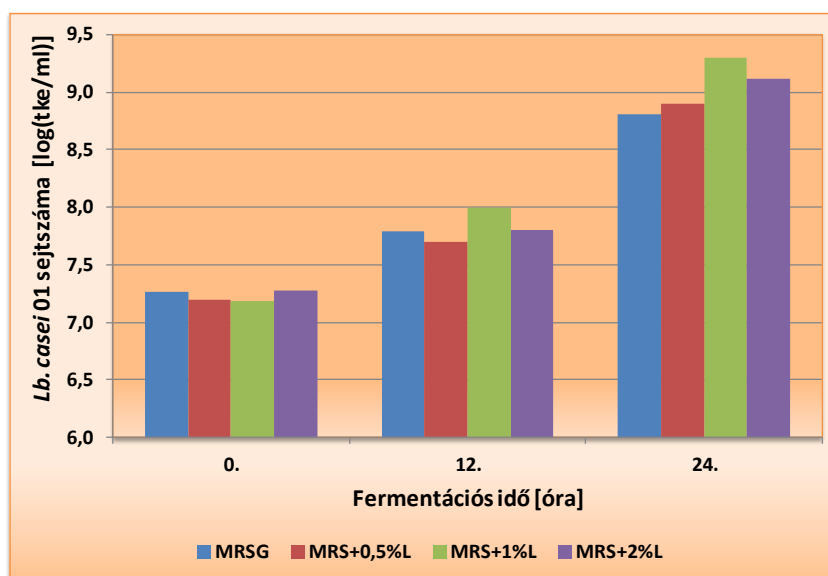
Megállapítható, hogy az *L. casei* 01 törzs mindegyik tápközegben jól szaporodott. A 24 órás fermentáció végére mind a három vizsgált tápközegben a 10^7 tke/ml induló sejtszámról elérte a 10^9 tke/ml értéket. A fermentáció végére a legnagyobb sejtsűrűséget a szénhidrátban leggazdagabb - MRSG+0,5% laktóz - tápközegben detektáltam, amely $1,78 \cdot 10^9$ tke/ml volt. A fajlagos szaporodási sebessége a három tápközegben rendre $0,105 \text{ h}^{-1}$, $0,104 \text{ h}^{-1}$ és $0,108 \text{ h}^{-1}$ értékeknél adódtak, amely nem tekinthető szignifikáns különbségnek. A generációs idők 9,52; 9,61 és 9,25 órának adódtak.

A béta-galaktozidáz aktivitás tekintetében a csupán glükózt tartalmazó MRSG tápközegben 0,03 U/100 ml mértem (19. táblázat). Az induktorként működő szénhidrát (laktóz) jelenlétében a β -galaktozidáz aktivitás növekedett. Az MRSG+0,5% laktózt tartalmazó tápközegben értem el a legnagyobb aktivitás értéket (0,08 U/100 ml). A glükóz jelenlétében elért aktivitás értéket véve alapul megállapítható, hogy a laktóz koncentráció növelésével az elérhető enzimaktivitás egyenes arányban növekedett. A kísérlet során kapott kis aktivitás értékek oka az lehet, hogy mindhárom tápközeg jelentős mennyiségű glükózt (2%) tartalmazott és e szénhidrát elegendőnek bizonyult a sejt növekedéséhez, továbbá katabolit repressziót fejthetett ki béta-galaktozidáz enzim szintézisére.

19. táblázat A *L. casei* 01 törzs β -galaktozidáz enzim aktivitás értékei 24 órás fermentációnál

| Tápközeg | Enzim aktivitás | |
|-----------------|-----------------|-------------|
| | [U/100 ml] | Relatív [%] |
| MRSG | 0,03 | 100 |
| MRSG+0,1%Laktóz | 0,047 | 167 |
| MRSG+0,5%Laktóz | 0,08 | 267 |

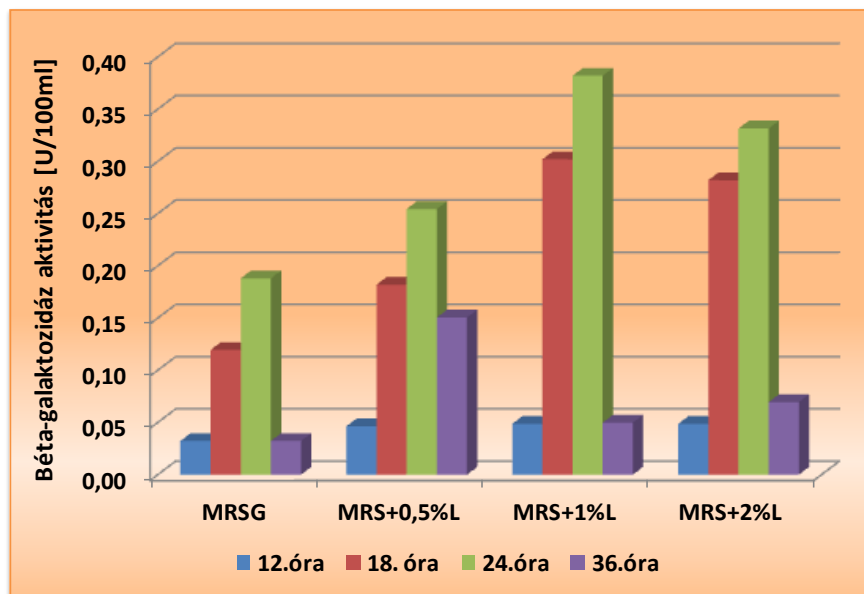
A következő kísérletsorozatban az MRSG tápközeg mellett három glükóz nélküli 0,5 %, 1% és 2% laktózt tartalmazó MRS tápközeget használtam, amelyeket a következő képen jelöltem: MRS+0,5%L, MRS+1%L és MRS+2%L. A fermentáció során mértem a pH, az optikai denzitás (OD) alakulását, valamint az élősejtszám változását. A sejtfeltárást követően meghatároztam a béta-galaktozidáz aktivitását is.



19. ábra *L. casei* 01 törzs növekedésének változása glükózt és laktózt tartalmazó MRS tápközegekben

Mind a négy tápközeg összetétele megfelelő tápanyagot szolgáltatott *L. casei* 01 törzs növekedéséhez (19. ábra). A törzs a 24 órás fermentáció végére mind a négy vizsgált tápközegben 10^7 tke/ml induló sejtszámról elérte a 10^9 tke/ml értéket. A 19. ábrán látható, hogy a *L. casei* 01 törzs az MRS+1%L-os és MRS+2%L-os tápközegben a 24. órára elérte, illetve meghaladta a 10^9 tke/ml-t.

A *L. casei* 01 törzs növekedése mellett a fermentáció folyamán a béta-galaktozidáz enzimaktivitás alakulását is vizsgáltam. Kapott eredményeimet a 20. ábrán szemléltettem.



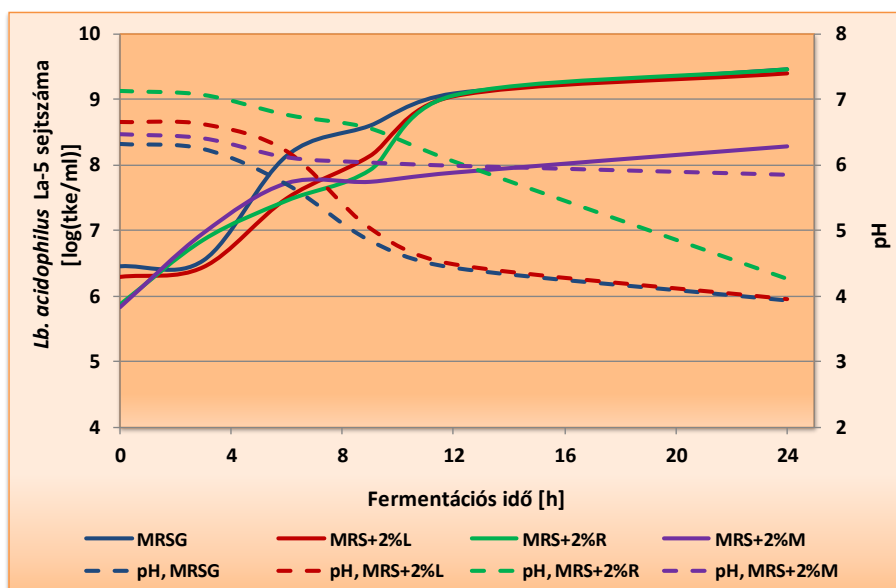
20. ábra *L.casei* 01 törzs β -galaktozidáz enzim aktivitásának alakulása glükóz és laktóz tartalmú tápközegekben

A 20. ábrán megfigyelhető, hogy a törzsnél érvényesül a laktóz indukáló hatása. A glükózt tartalmazó MRS tápközegben alapszintű aktivitásokat mértem, amely 24. órában 0,19 U/100 ml volt. Laktóz jelenlétében (1% és 2%) nagyobb aktivitás volt elérhető a 18. és a 24. órában egyaránt (1% laktóz 0,3 és 0,38 U/100 ml, míg 2% laktóznál 0,28 és 0,33 U/100 ml).

4.2.2 *Lactobacillus acidophilus* La-5 α -galaktozidáz szintézise

Különböző szerkezetű szénhidrátok hatásának vizsgálata során négy féle – glükóz, laktóz, raffinóz, melibióz – szénhidráttal (2%) egészíttem ki az alap MRS tápközeget. Megvizsgáltam a *Lactobacillus acidophilus* La-5 törzs növekedését a 24 órás fermentáció során (3 óránkénti mintavétel mellett), illetve az alfa-galaktozidáz enzimaktivitás időbeni változását. A törzs növekedését a 21. ábrán szemléltettem. Megállapítható, hogy a legjobb szaporodást, a glükózt tartalmazó tápközegben mutatta a törzs és már a fermentáció 9. órájára elérte a stacioner fázist. Ennek magyarázata az lehet, hogy glükózt a törzs a PTS transzport után a sejten belül glükóz-6-P formájában anyagcserefolyamataiban közvetlenül hasznosítja. A laktóz, raffinóz és melibióz a

GPH, illetve ABC transzporton keresztül juthatnak a sejt belülré, ahol az intracelluláris enzimek segítségével monoszacharidokká bontódnak (5. ábra). Ezekben az esetekben a vizsgált törzs később éri el szaporodásának stacioner fázisát, de megállapítható, hogy a fermentáció végére a laktóz és raffinóz szénhidrátokon a glükóz szubsztrátumhoz hasonlóan $2,88 \cdot 10^9$ sejtszám/ml értéket tudtam detektálni. Melibióz diszacharidon a kezdeti $6,92 \cdot 10^5$ sejtszámról a 24 órás fermentáció végére mindössze $1,95 \cdot 10^8$ -ra emelkedett. Ez a növekedés elmaradt a többi vizsgált szénhidrát hasznosításától.



21. ábra: *L. acidophilus* La-5 növekedése különböző szerkezetű szénhidrátokkal kiegészített MRS alaptápközegben

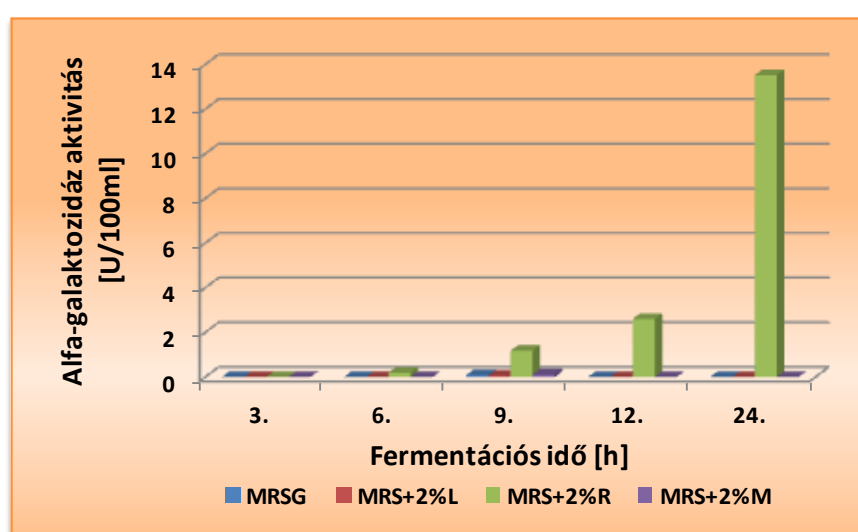
A felvett szaporodási görbék exponenciális szakaszaiból kiszámoltam a maximális fajlagos szaporodási sebességet, továbbá a generációs időt és a sejthozamot (20. táblázat).

20. táblázat: *L. acidophilus* La-5 szaporodásának jellemzői

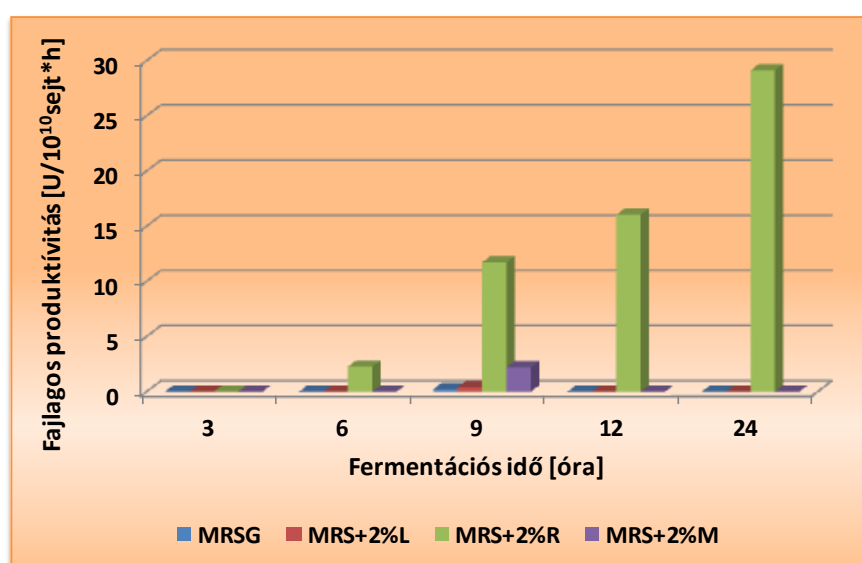
| | Fajlagos szaporodási sebesség [óra ⁻¹] | Generációs idő [óra] | LAG fázis [óra] | LOG fázis [óra] | Sejthozam [log(tke/ml)] |
|-------------------------|--|----------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| $\mu_{\text{MRS+2\%L}}$ | 0,62 | 1,61 | 2,3 | 9,7 | 3,01 |
| $\mu_{\text{MRS+2\%R}}$ | 0,65 | 1,53 | 2 | 10,2 | 3,11 |
| $\mu_{\text{MRS+2\%M}}$ | 0,61 | 1,66 | 0 | 12,2 | 3,60 |
| $\mu_{\text{MRS+2\%L}}$ | 0,73 | 1,38 | 0 | 6,6 | 2,45 |

A glükózon és a laktózon mind a fajlagos szaporodási sebesség, mind a sejthozam tekintetében közel azonos eredményt kaptam a *L. acidophilus* törzs esetében. Továbbá megfigyelhető, hogy a raffinózt és melibiózt tartalmazó tápközegben a törzs növekedésének LAG szakasza nagyon rövid.

A *L. acidophilus* törzs α -galaktozidáz enzim szintézisét is megvizsgáltam a fermentáció során. Arra kerestem a választ, hogy melyik szénhidrát indukálja az enzim szintézisét. Eredményeimet a 22. ábrán szemléltetem. Megállapítható, hogy a *L. acidophilus* La-5 törzs 2% raffinóz jelenlétében 13,51 U/100 ml aktivitást mutatott, amely nem meglepő, hiszen a raffinóz láncvégén alfa térállású galaktozidos kötés található. Jól látható, hogy csak glükózt tartalmazó tápközegben a *L. acidophilus* La-5 törzs nem szintetizálja az α -galaktozidáz enzimet, hiszen a glükóz elegendő (2%) felvehető szén- és energiaforrást biztosít a növekedéshez. Érdekes eredmény viszont, hogy a szintén α -galaktozidos kötést tartalmazó melibiózos tápközegben sem tapasztaltam enzimszintézist.



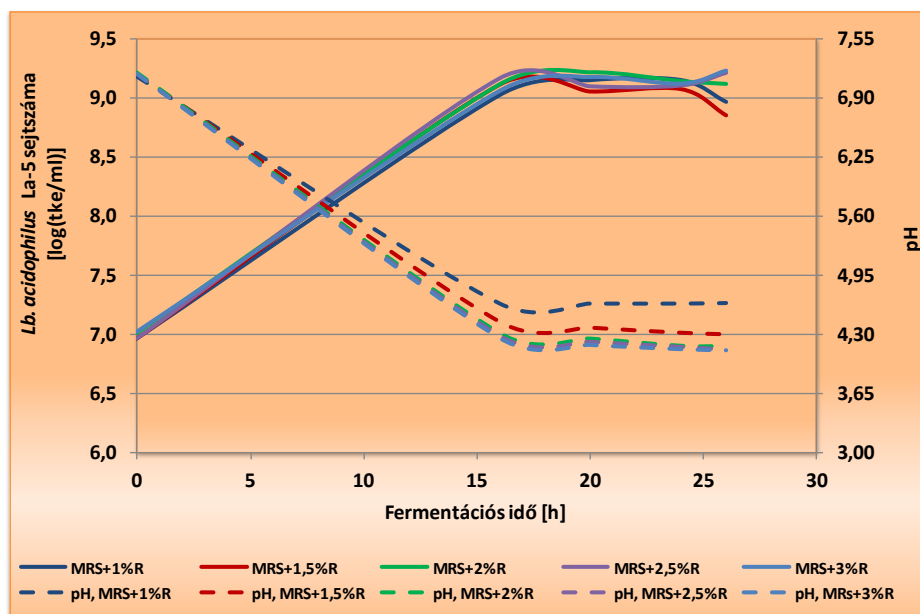
22. ábra: Különböző szerkezetű szénhidrátok jelenlétében a *L. acidophilus* La-5 törzs α -galaktozidáz enzim szintézise



23. ábra: Különböző szerkezetű szénhidrátok jelenlétében a *L. acidophilus* La-5 törzs α -galaktozidáz enzimre vonatkozó fajlagos produktivitásai

A fenti eredmények jól tükrözik, hogy az enzimszintézis szoros összefüggésben állhat a sejt növekedésével. Az intracelluláris természete miatt kiszámoltam az alfa-galaktozidáz enzim fajlagos produktivitás értékeit a 10^{10} sejtre vonatkozóan (23. ábra). Megállapítható, hogy a sejtszámra vonatkoztatott produktivitás értékek tendenciája azonosnak tekinthető a szaporodás dinamikájával. Így bizonyítást nyert, hogy a törzs az α -galaktozidáz enzimet szaporodásához kötötten szintetizálja.

A legjobb produktivitást a raffinóz szubsztrátum esetén értem el, így továbbiakban ezzel a szubsztrátummal foglalkoztam mélyebben. Különböző koncentrációjú (1%, 1,5%, 2%, 2,5% és 3 %) raffinózt tartalmazó MRS tápközegben vizsgáltam a *L. acidophilus* La-5 törzs növekedését és galaktozidáz enzim aktivitásának alakulását. A 25 órás fermentációt 5 óránkénti mintavételezéssel követtem.



24. ábra: *L. acidophilus* La-5 probiotikus törzs növekedése módosított MRS tápközegben

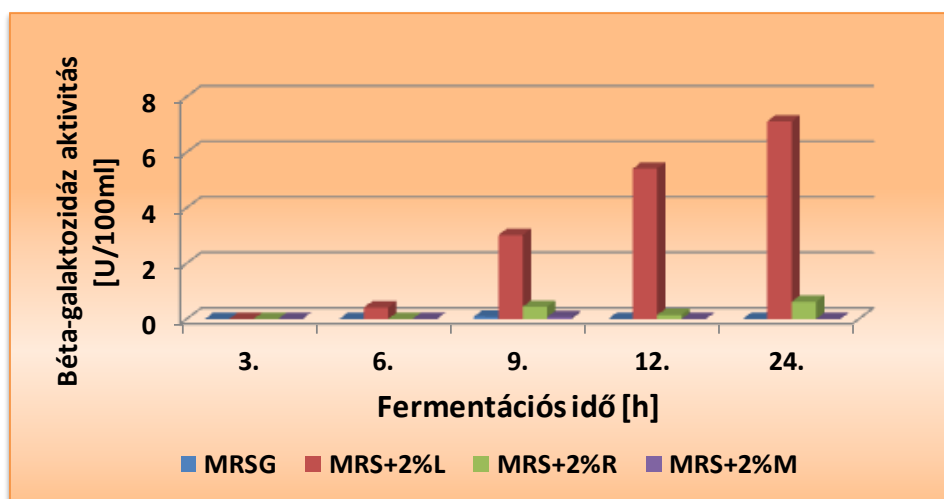
A szaporodási görbéken (24. ábra) jól látható, hogy az eltérő szénhidrát tartalom lényegesen nem befolyásolta a sejtszaporulatot. Mindegyik raffinóz koncentrációjú tápközegben a vizsgált törzs a 16. órában elérte a $1,2\text{--}1,4 \cdot 10^9$ sejt/ml sejtsűrűséget és ezt stabilan megtartotta a fermentáció végéig. A pH értékek egyenletesen csökkentek, a fermentáció 16. órájában már pH 4,2-4,6 tartományban voltak.

Alfa-galaktozidáz enzimaktivitás minden esetben detektálható volt. A legnagyobb aktivitást (23,5 U/100 ml) az MRS+1,5%R tápközegben a fermentáció 20. órájában mértem. A raffinóz koncentráció további növelése (2,5-3 %) a tápközegben az enzim aktivitás csökkenését eredményezte. Yoon és Hwang [2008] megvizsgálták a különböző szubsztrátumok indukáló

hatását az *L. curvatus* R08 törzs alfa-galaktozidáz enzim szintézisére és megállapították, hogy a raffinóz bizonyult a legjobb induktornak. Továbbá a maximális enzimaktivitást a fermentáció 15-20. órája között tapasztalták MRS+1%R tápközegen. Egy másik tejsavbaktérium törzs (*Leuconostoc mesenteroides* JK55) esetében azonban 2 % raffinóz mellett detektálták a legnagyobb aktivitást. Összegezve megállapítható, hogy általában a tejsavbaktériumoknál 1-2 % raffinóz elegendő a sejt szaporodásához és az alfa-galaktozidáz enzim hatékony indukciójához.

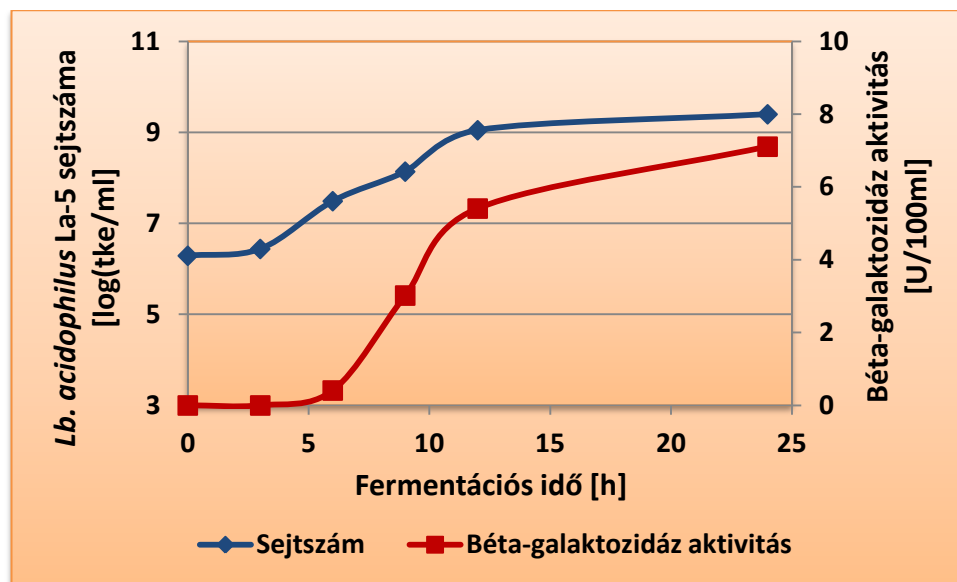
4.2.3 *Lactobacillus acidophilus* La-5 β -galaktozidáz szintézise

A különböző kémiai szerkezetű szénhidrátok hatását vizsgáltam a béta-galaktozidáz enzim szintézisére. A vizsgálataimban négy szénhidráttal (glükóz, laktóz, raffinóz, melibióz) 2%-ban egészíttem ki az MRS alaptápközéget. Megállapítható, hogy a legjobb induktornak a laktóz bizonyult (25. ábra).



25. ábra: Különböző szerkezetű szénhidrátok jelenlétében a *L. acidophilus* La-5 törzs béta-galaktozidáz enzim szintézise

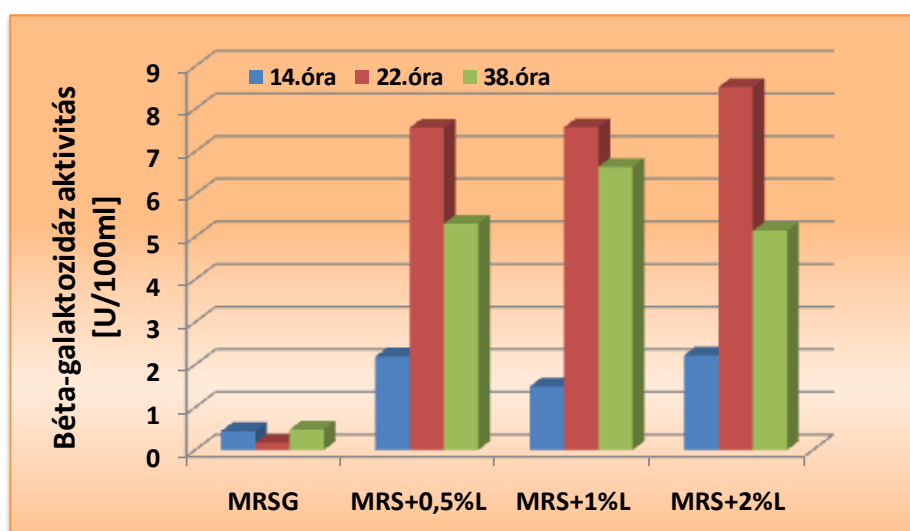
A béta-galaktozidáz esetében a β -galaktozidos kötést nem tartalmazó raffinóz szubsztrátum jelenlétében is megfigyelhető volt minimális enzim aktivitás a fermentáció során. Alazeh és munkatársai [2009] hat *L. reuteri* törzs béta-galaktozidáz aktivitásának változását tanulmányozták néhány szénhidráton és szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a laktóz határozottan indukálja a β -galaktozidáz enzim szintézisét. Érdekes, hogy a *L. acidophilus* La-5 törzshöz hasonlóan, a *L. reuteri* faj törzseinél is kimutatták az enzimaktivitást raffinóz szubsztrátum esetén is. Mivel a raffinóz szerkezetét tekintve alfa-galaktozidos kötés mellett β (2-1) glikozidos kötés található (a glükóz és fruktóz molekula között), így feltételezhető a kapcsolat az alfa-galaktozidáz, a béta-galaktozidáz és invertáz enzimeket kódoló gének aktiválásának folyamatában.



26. ábra: A *L. acidophilus* La-5 törzs szaporodásának és béta-galaktozidáz enzim szintézisének kapcsolata

A törzs szaporodási görbáját és a béta-galaktozidáz enzim aktivitást (26. ábra) együtt ábrázolva megállapítható, hogy mind a 6. órától a 9. óráig mind a 9. órától a 12. óráig kiterjedő intervallumokban körülbelül 2,4-2,6 U/100 ml (0,8-0,87 U/100 ml×h) aktivitás növekedés volt detektálható. Ezzel szemben a 12. órától a 24. óráig csupán 1,7 U/100 ml, mely 0,14 U/100 ml×h-nak felel meg. Megfigyelhető továbbá, hogy a törzs a szaporodásához kötötten szintetizálja a béta-galaktozidáz enzimet.

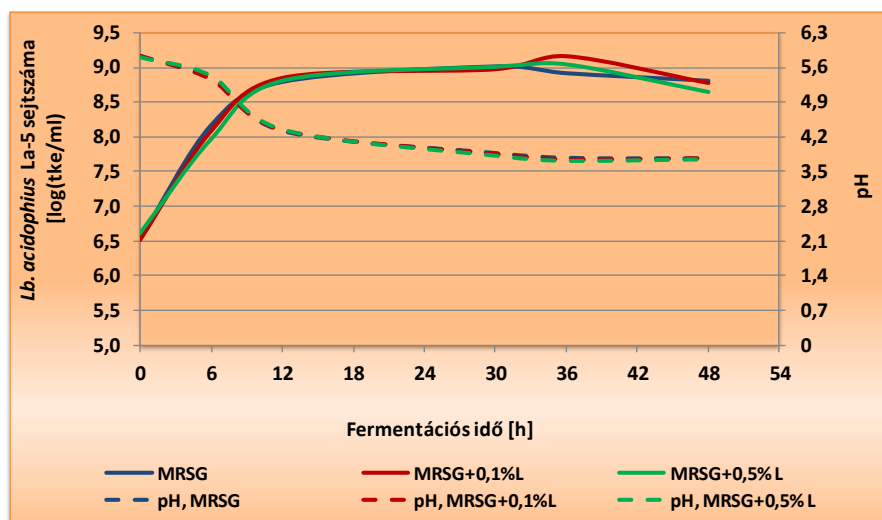
A kísérlet folytatásaként megvizsgáltam a laktóz koncentráció hatását az enzimtermelésre. Különböző mennyiségű (0,5 %, 1,0 % és 2,0%) laktózzal egészítettem ki az MRS alaptápközeget. Fermentáció során meghatároztam a béta-galaktozidáz enzim aktivitásának alakulását.



27. ábra: Laktóz koncentráció hatása az La-5 béta-galaktozidáz enzimének szintézisére

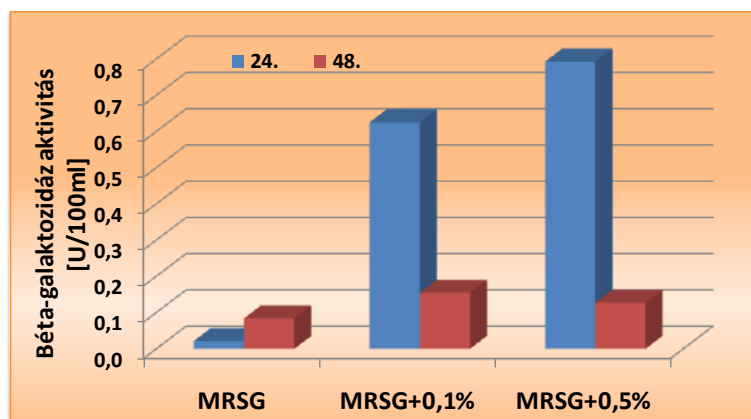
A legnagyobb aktivitást a fermentáció 22. órájában MRS+ 2% laktóz tápvesben detektáltam, mely 8,51 U volt 100 ml fermentléből kinyert biomasszában, de a 0,5%, illetve 1% laktóz tartalmú tápközegeknél is hasonló aktivitások (7,56 illetve 7,57 U/100 ml) mérhetőek. Ez azt jelenti, hogy a laktóz koncentráció növelése (0,5 %-tól) már nem eredményezett jelentős enzimaktivitás növekedést. Összegezve egyértelműen levonható az a következtetés, hogy 0,5% laktóz elegendő a maximális enzimaktivitás eléréséhez. *Lactobacillus acidophilus* törzsek esetében a laktóz indukáló hatását más kutató csoport is tanulmányozta. Akolkar és munkatársai [2005] fermentált ragiból (*Eleusine coracana* Gaertn.) izolált *Lactobacillus acidophilus* törzs β -galaktozidáz enzim aktivitását vizsgálták. A ragi a fűfélékhez tartozik, Afrikában, Nepálban, Indiában és még számos ázsiai országban termesztik. Jól tűri a szárazságot és ellenáll a kártevőknek. Gazdag polifenolokban és kalcium tartalma is jelentős [Chandrashekar, 2010]. Akolkar és munkatársai (2005) azt tapasztalták, hogy a maximális béta-galaktozidáz aktivitást (810 U/ml) érhetnek el, ha az MRS tápközeget 1,5% laktózzal készítik el. Továbbá 6,5-szeres aktivitás növekedést tudtak kimutatni abban az esetben, amikor a laktóz koncentrációt 0,75%-ra csökkentették és a tápközeget 1% ragival egészítették ki.

Csupán glükóz szénhidrátot tartalmazó tápközegben a növekedés mellett minimális béta-galaktozidáz aktivitást detektáltam. A glükóz hatásának kimutatására a következő kísérleti sorozatot valósítottam meg. Az MRSG tápközeget 0,1%, illetve 0,5% laktózzal egészítettem ki és vizsgáltam a törzs növekedését, valamint a 24. és 48. órában a béta-galaktozidáz enzim aktivitásának alakulását.



28. ábra: *L. acidophilus* La-5 törzs növekedésének változása MRSG, illetve 0,1 és 0,5%-ban laktózzal kiegészített tápközegben

A *L. acidophilus* La-5 törzs szaporodási görbéje mind a három vizsgált tápközegben hasonló lefutást mutatott (28. ábra). Feltehetően, az MRSG tápközegben lévő 2% glükóz elegendő szénforrásként szolgált a sejt növekedéshez.



29. ábra: *L. acidophilus* La-5 törzs β -galaktozidáz enzim aktivitásának változása MRSG, illetve 0,1 és 0,5%-ban laktózzal kiegészített tápközegben

A kapott eredmények alapján (29. ábra) megállapítottam, hogy a laktóz jelenléte indukálja a *Lactobacillus acidophilus* La-5 törzs béta-galaktozidáz enzim szintézisét. Csak glükóz jelenlétében a vizsgált enzim a 0,1 U/100 ml aktivitást sem érte el, míg a 0,5% laktózzal 7-szeres aktivitás növekedés volt elérhető. Meghatároztam a fajlagos produktivitást, amelyek a következők (24. óra): MRSG 0,008 U/10¹⁰sejt*h, MRSG+0,1 %L 0,128 U/10¹⁰sejt*h és MRSG+0,5%L 0,185 U/10¹⁰sejt*h. Ezen eredmények megerősítik a *Lb. acidophilus* törzs béta-galaktozidáz enzimének indukálhatóságát. Az előző kísérleti sorozatból kapott eredményekkel összevetve (alap MRS+0,5 % L: 7,5 U/100 ml, MRSG+0,5%L: 0,79 U/100 ml) kimutatható a glükóz jelenlétének gátló hatása a béta-galaktozidáz enzim szintézisére.

Összegzésként megállapítható, hogy mind a két vizsgált *Lactobacillus* törzs képes galaktozidáz enzim/enzimek szintézisére. A glükóz represszáló hatást gyakorolt a galaktozidáz enzimek szintézisére. A két vizsgált *Lactobacillus* törzs közül a *L. acidophilus* La-5 törzsnél detektáltam nagyobb β -galaktozidáz enzimaktivitást.

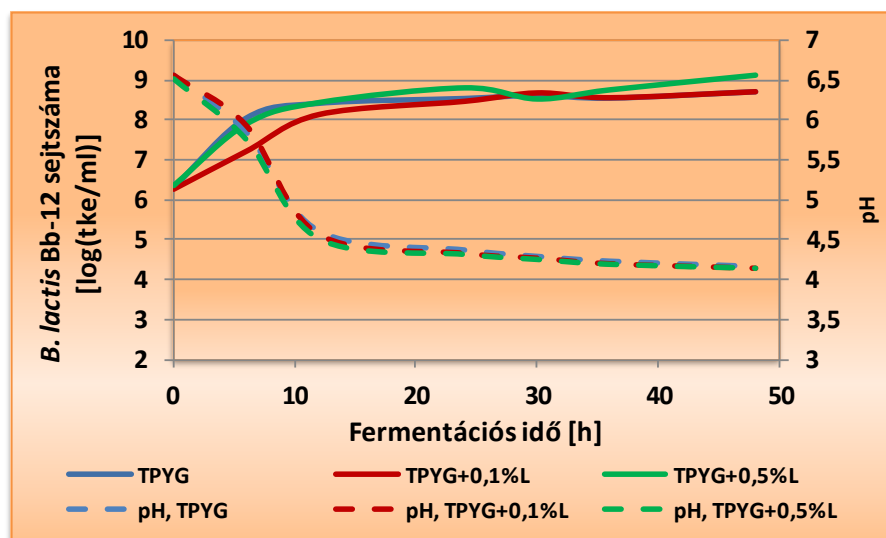
4.3 *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 probiotikus törzs galaktozidáz aktivitásai

4.3.1 A β -galaktozidáz

A bifidobaktériumok szigorúan anaerob mikroorganizmusok, így a növekedésükhöz oxigénmentes környezetet biztosítottam kísérleteimben és az enzim fermentációk 37°C-on zajlottak.

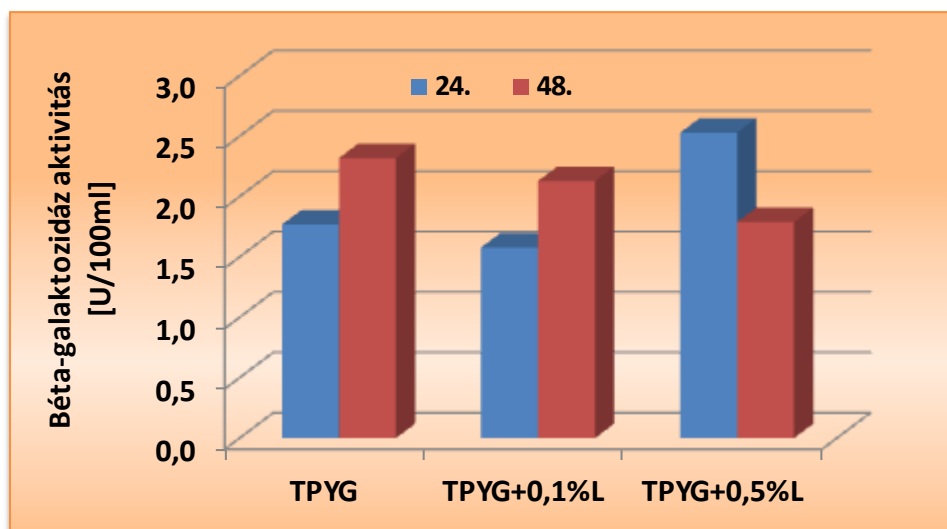
A β -galaktozidáz enzim szintézis mechanizmusának feltárására a TPYG (0,5% glükóz tartalmú) tápközeget 0,1% és 0,5% laktózzal egészítettem ki és vizsgáltam a törzs növekedését és béta-

galaktozidáz aktivitásának alakulását. A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs szaporodási görbáját a 30. ábrán mutatom be.



30. ábra *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs sejtszám és pH változása a fermentáció során

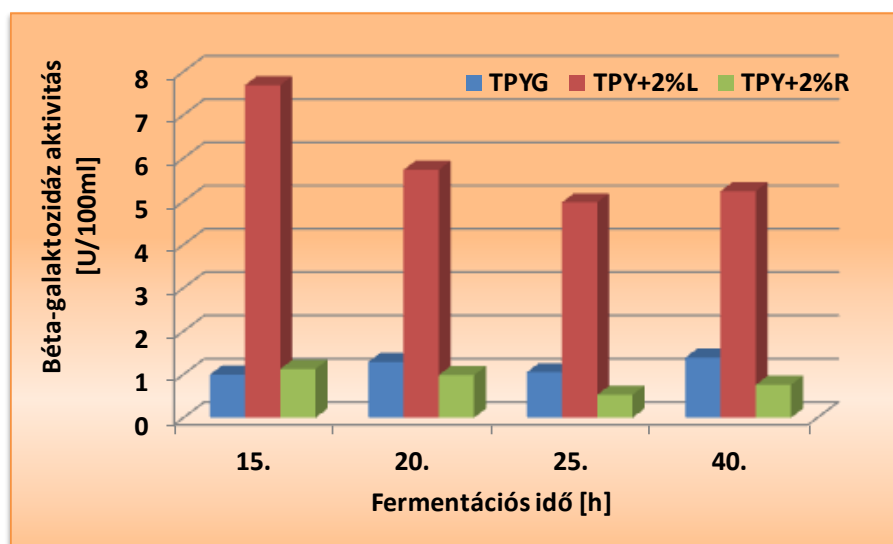
Megállapítható, hogy a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs jól szaporodott a TPYG tápközegekben, függetlenül a laktóz jelenlététől. Minden esetben 24 óra tenyésztés után a sejtszámok elérték az $5-7 \times 10^8$ sejt/ml sejtsűrűséget, közben a tápközeg pH-ja 4,5 alá csökkent. A fajlagos szaporodási sebességek: $\mu_{\text{TPYG}}=0,14 \text{ óra}^{-1}$, $\mu_{\text{TPYG+0,1\%L}}=0,17 \text{ óra}^{-1}$, $\mu_{\text{TPYG+0,5\%L}}=0,2 \text{ óra}^{-1}$ voltak. A növekvő szénhidrát koncentrációnak megfelelően a fajlagos szaporodási sebességek is növekedtek. A hozzáadott 0,5% koncentrációjú laktóznak köszönhetően a 48. órára a TPY+0,5% laktózos tápközegben érte el a legnagyobb sejtszámot a törzs.



31. ábra A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs β -galaktozidáz aktivitásának alakulása glükózt tartalmazó, valamint 0,1%, illetve 0,5% laktózzal kiegészített TPY tápközegekben

A β -galaktozidáz aktivitás 1,5 U/100 ml és 2,5 U/100 ml között változott az alkalmazott tápközeg és a fermentációs idő függvényében (31. ábra). Azt tapasztaltam, hogy a csak glükóz szénhidráton szaporított bifidobaktériumnál is mérhető volt a béta-galaktozidáz aktivitás. Továbbá a laktózzal kiegészített TPYG tápközeg alkalmazása nem eredményezte számottevően a β -galaktozidáz aktivitás növekedését. Ez arra enged következtetni, hogy a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs konstitutívan szintetizálja a β -galaktozidáz enzimet. Hsu és munkatársai [2005] másik három bifidobaktérium törzsnél (*B. longum* CCRC 15708, *B. longum* B6, *B. infantis* CCRC 14633) szintén mutattak ki β -galaktozidáz aktivitást, amikor glükóz és laktóz együttesen volt jelen a tápközegekben.

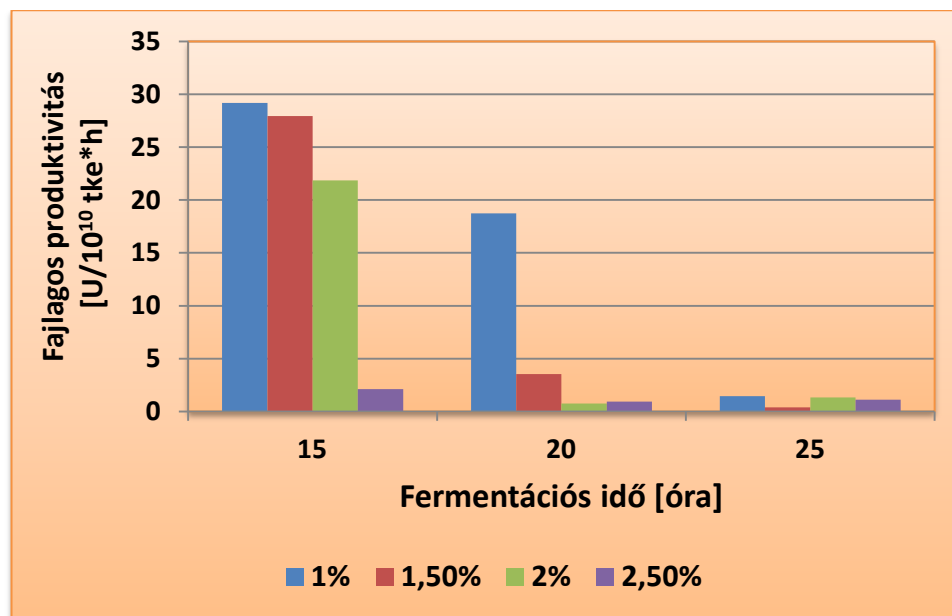
A további kísérleteimben a TPYG mellett 2% laktózt és 2% raffinózt tartalmazó alap TPY tápközegekben is vizsgáltam a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs β -galaktozidáz aktivitásának alakulását (32. ábra).



32. ábra Különböző szerkezetű szénhidrátok jelenlétében a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs béta-galaktozidáz enzim aktivitása

Megállapítottam, hogy a 2% laktóz jelentősen indukálta a β -galaktozidáz enzim szintézisét (5-8-szor nagyobb aktivitás mérhető, mint a glükóz vagy raffinóz esetében). A legnagyobb aktivitást (7,69 U/100 ml) a fermentáció 15. órájában 2% laktóz jelenlétében mértem. A β -galaktozidos kötést nem tartalmazó raffinóz és glükóz jelenlétében is kimutatható volt alap β -galaktozidáz enzimaktivitás (1,13 és 1,39 U/100 ml), ellentétben a tejsavbaktérium törzseknél tapasztaltakkal, ahol mindössze 0,004, illetve 0,23 U/100 ml volt ez az érték.

Az optimális laktóz koncentráció meghatározására, különböző (1 %, 1,5 %, 2 % és 2,5 %) TPYL tápközegeket használtam.

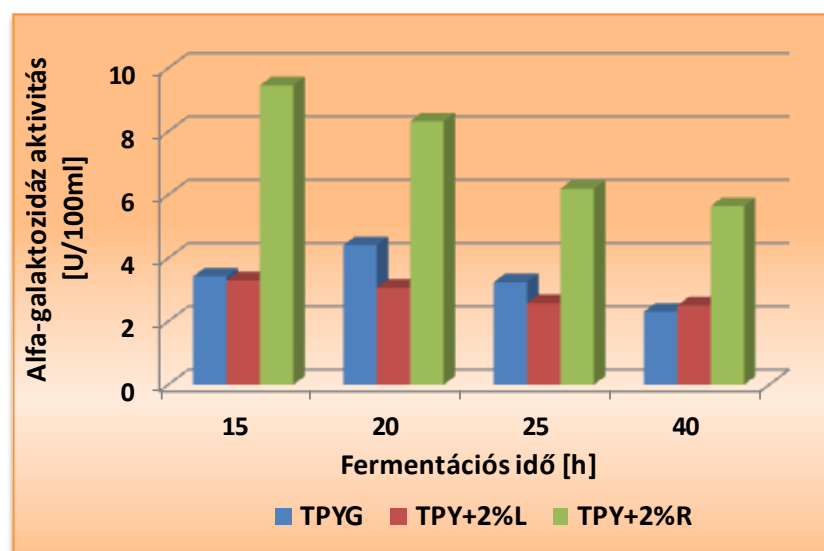


33. ábra A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs által szintetizált β -galaktozidáz enzim produktivitásának alakulása különböző laktóz koncentrációk jelenlétében

Megállapítható, hogy az 1,0 % vagy 1,5 % laktóz elegendőnek bizonyult a maximális aktivitás eléréséhez. Ebben az esetben kapott β -galaktozidáz enzim fajlagos produktivitása 27-29 $U/10^{10} tke \cdot h$ volt. A 2,5 % laktóz koncentráció alkalmazása mellett már nem volt megfelelő az enzim szintézise (33. ábra). Továbbá azt tapasztaltam, hogy az enzim a sejtnövekedéshez kötötten szintetizálódik (általában exponenciális szaporodási szakaszban éri el a maximális aktivitást). Hsu és munkatársai [2005] a szintetikus laboratóriumi tápközegben (2% laktóz, 1% glükóz, 1% élesztőkivonat, 1% pepton, 0,5% $(NH_4)_2SO_4$, 0,3% K_2HPO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot H_2O$ és 0,03% L-cisztein) vizsgálták a három bifidobaktérium törzs (*B. longum* CCRC 15708, *B. longum* B6, *B. infantis* CCRC 14633) béta-galaktozidáz aktivitását. Megállapították, hogy a két *B. longum* galaktozidáz enzim aktivitás értéke mintegy tízszer nagyobb, mint a vizsgált *B. infantis* törzssé. Valamint 4% laktózt tartalmazó tápközegben érték el a legjobb β -galaktozidáz aktivitást a *B. longum* CRCC 15708 törzsnél, azonban esetemben már 1-1,5 % laktóz is elegendőnek bizonyult.

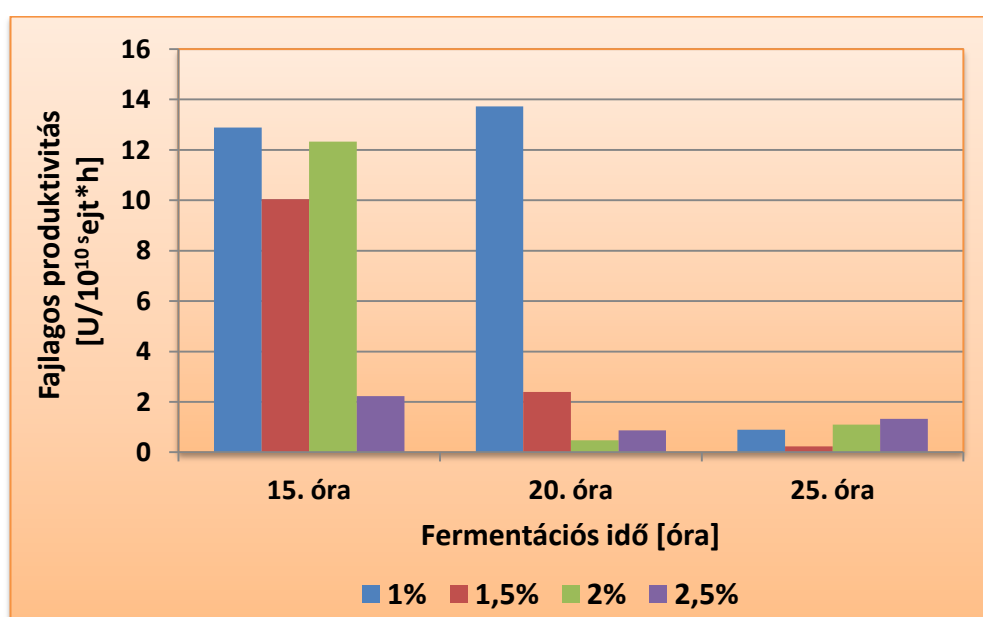
4.3.2 Alfa-galaktozidáz

Különböző szerkezetű szénhidrátok hatásának vizsgálata során háromféle – glükóz (0,5%), laktóz (2%), raffinóz (2%) – szénhidráttal egészítettem ki az alap TPY tápközeget és vizsgáltam a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs α -galaktozidáz aktivitását (34. ábra).



34. ábra Különböző szerkezetű szénhidrátok hatása az alfa-galaktozidáz enzim szintézisére

A legnagyobb aktivitást (9,46 U/ 100 ml) a fermentáció 15. órájában 2% raffinóz jelenlétében mértem. Az eredményeim megegyeznek a Xiao és munkatársai [2000] által publikáltakkal, amikor megvizsgálták a szénhidrátok hatását egy *Bifidobacterium breve* törzs alfa-galaktozidáz aktivitására. A glükóz mellett α -galaktozidos kötéseket nem tartalmazó laktóz jelenlétében is detektáltam az α -galaktozidáz enzim aktivitást. Hasonló megfigyelést más kutatócsoportok is publikáltak a *B. breve* [Xiao *et al.*, 2000] és *B. adolescentis* törzseknél [Holt *et al.*, 2008]. Ennek alapján arra következtettem, hogy a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs konstitutív módon szintetizálja az α -galaktozidáz enzimet. Azonban megjegyzendő, hogy az α -galaktozidos kötést is tartalmazó szubsztrátum jelentősen indukálja az enzim szintézist.

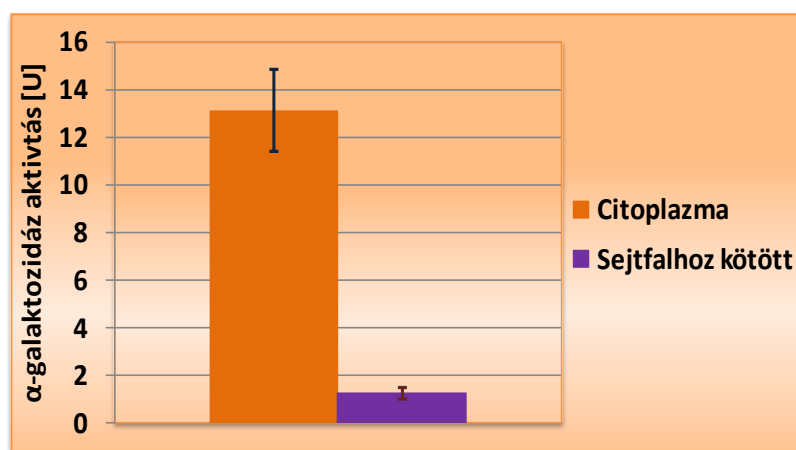


35. ábra A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs által szintetizált α -galaktozidáz enzim produktivitásának alakulása különböző raffinóz koncentrációk hatására

A maximális α -galaktozidáz enzimszintézis eléréséhez optimális raffinóz koncentrációt meghatároztam az alap TPY tápközeg 1 %, 1,5 %, 2 % és 2,5 %-nyi raffinózzal való kiegészítésével. Megállapítottam, hogy már 1% raffinóz elegendő a maximális α -galaktozidáz enzim produktivitás ($13 \text{ U}/10^{10} \text{ sejt} \cdot \text{h}$) eléréséhez (35. ábra). Ez az érték a fermentáció 15-20. órája között stabilan megmaradt. Hasonló eredményekre jutottam, mint a *L. acidophilus* La-5 törzs alfa-galaktozidáz enzim szintézisének, amikor a tejsavbaktérium törzs szintén 1-2 % raffinóz koncentráció jelenlétében mutatta a legjobb aktivitást a fermentáció 20. órájában. Meg kell jegyezni, hogy a Bb-12 törzsnél az α -galaktozidáz aktivitás nem olyan stabil, mint a vizsgált tejsavbaktériumoknál.

Az intracelluláris enzimek a sejten belül kétféleképpen helyezkedhetnek: sejtfalhoz kötöttek vagy a citoplazmában.

Megállapítottam, hogy a törzs által szintetizált α -galaktozidáz enzim a sejt citoplazma részében lokalizálódik, mivel az aktivitás több mint 90%-át a citoplazma frakcióban mutattam ki (36. ábra).



36. ábra: A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs alfa-galaktozidáz enzimének lokalizációja

4.3.3 *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs alfa-galaktozidáz enzimének tisztítása

A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 eredetű α -galaktozidáz enzim tisztítására és jellemzésére kétliteres hasznos térfogatú fermentorban tenyésztettem a baktériumot. Az inokulum tenyésztését 0,5% raffinóz tartalmú TPY tápközegben anaerob körülmények között 37°C -on végeztem. 24 órás 100 ml inokulummal indítottam el a fermentációt 1% raffinózt tartalmazó TPY táplevest alkalmazva. Ezzel a tápközeggel elegendő szén- és energiaforrás biztosítható a probiotikus törzs szaporodásához és a megfelelő alfa-galaktozidáz enzim szintéziséhez.

A sejteket a 20 órás fermentáció végén centrifugálással összegyűjtöttem. Háromszor mostam 0,2M McIlvaine (pH=6,6) pufferral, majd a sejteket pufferban szuszpendáltam. A hatékony feltárás biztosítására, azaz a citoplazmában lévő fehérjék minél jobb kinyerése érdekében

minden mintát három egymást követő ciklusban tartam fel. A feltárás után nyert extraktum körülbelül 11,3 ml volt. A feltárást követően kapott aktivitás és fehérjetartalom értékeit a 21. táblázatban foglaltam össze.

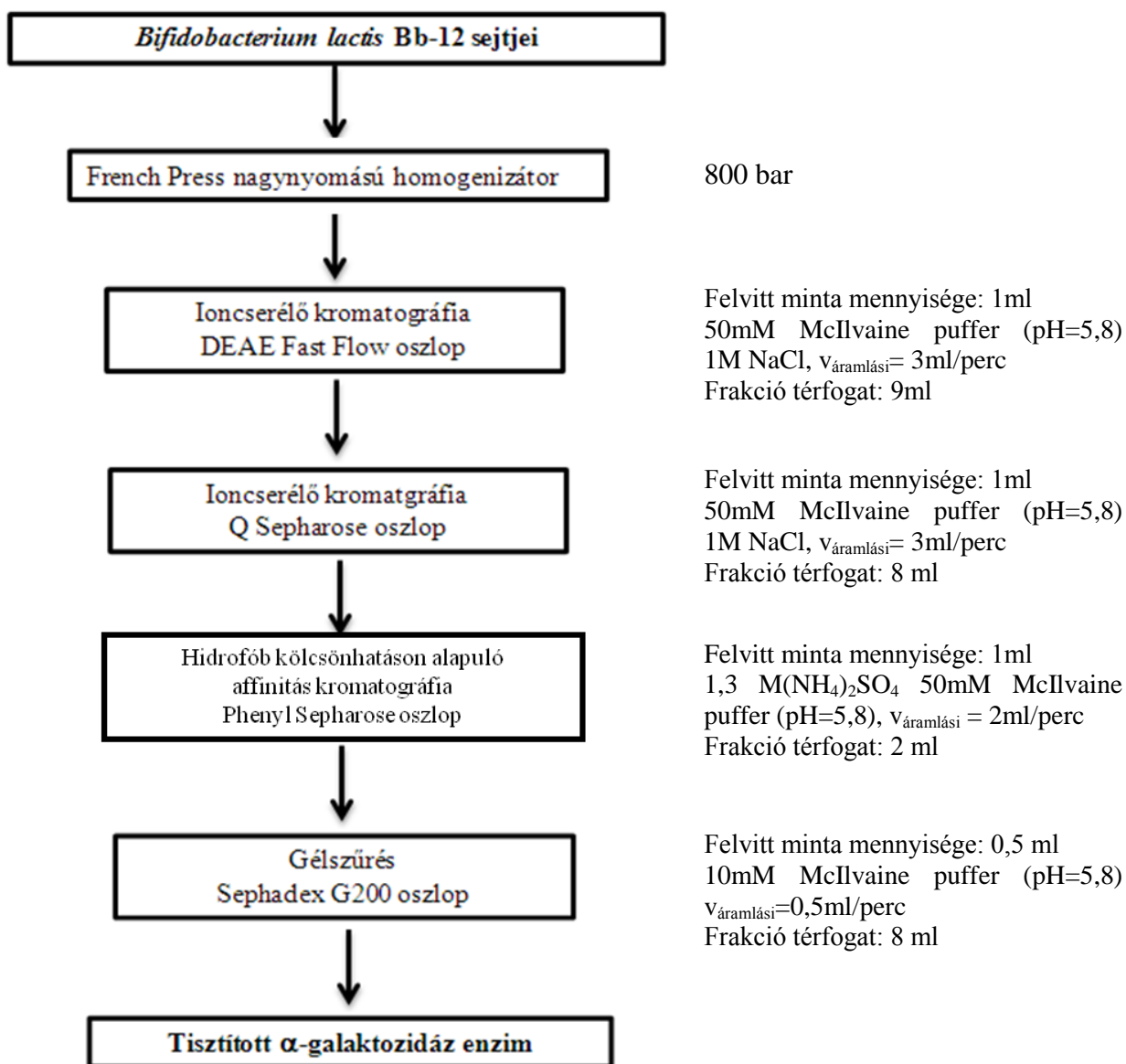
21.táblázat A léptéknöveléssel előállított nyers enzimdát jellemzői

| | Aktivitás [U/ml] | Aktivitás [U] | Fehérjetartalom [mg/ml] | Fehérjetartalom [mg] | Specifikus aktivitás [U/mg fehérje] |
|-------------------------------|---------------------|------------------|----------------------------|-------------------------|--|
| Alfa- galaktozidáz | 14,08 | 158,88 | 23,13 | 254,43 | 0,609 |
| Béta- galaktozidáz | 1,11 | 12,54 | 23,13 | 254,43 | 0,048 |

Megerősítettem, hogy *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs mind alfa-galaktozidáz mind béta-galaktozidáz enzimet szintetizál a raffinózt tartalmazó tápközegen. Sikerült 14,08 U/ml α -galaktozidáz aktivitású enzimfehérjét előállítani laboratóriumi fermentoros kísérlettel, amely 1,11 U/ml β -galaktozidáz aktivitást is mutatott (20. táblázat). Ezt az enzimmennyiséget elegendőnek ítéltam az enzim tisztításához és jellemzéséhez.

Az alfa-galaktozidáz enzim kinyerését és tisztítását sejtfeltárással, ioncserélő kromatográfiával, hidrofób kölcsönhatású alapuló affinitás kromatográfiával és gélszűrés kombinációjával valósítottam meg. A tisztítás lépéseit a 37. ábrán szemléltetem.

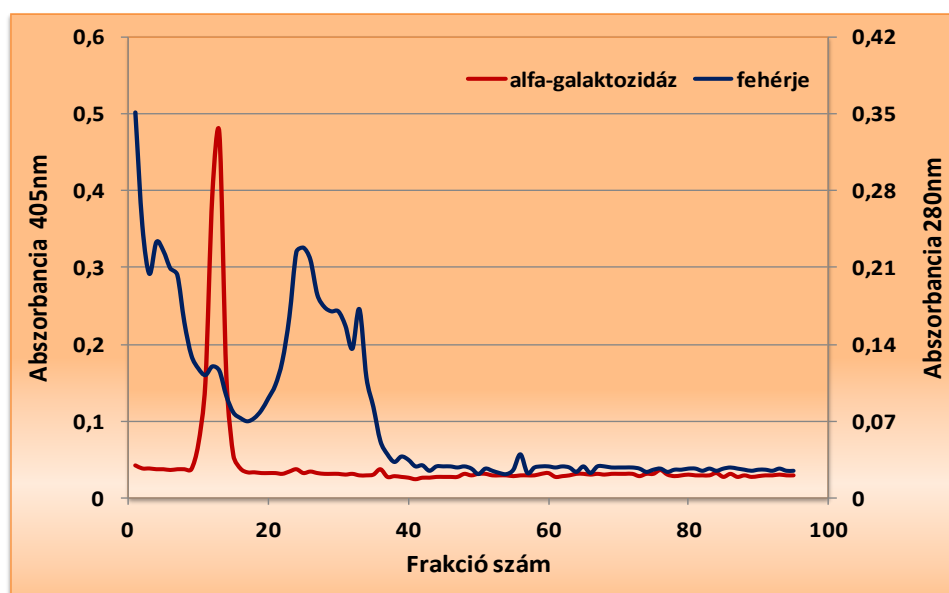
Az oldatban lévő alfa-galaktozidázt FPLC berendezéshez kapcsolt gyenge DEAE Sepharose Fast Flow (2,5*50 cm) anioncserélő oszloptöltetre több lépésben vittem fel. A megkötött fehérjéket 50 mM pH=5,8 McIlvaine pufferben oldott 1M NaCl segítségével gradiens elúcióval 3 ml/perces áramlási sebesség mellett, 9 ml-es frakciókat gyűjtve mostam le. Az alfa-galaktozidáz aktivitást mutató frakciókat összeöntöttem és 50 mM pH=5,8 McIlvaine puffer alkalmazásával 10 kDa-os vágási értékű Amicon ultraszűrő berendezéssel sóalanítottam és koncentráltam. A koncentrátumot 50 mM McIlvaine pH=5,8 pufferral egyensúlyba hozott Q-Sepharose Fast Flow erős anioncserélő oszlopra (1cm*30cm) injektáltam, majd 1M NaCl segítségével előállított gradiens elúcióval fracionáltam a fehérjéket. Áramlási sebességként 3 ml/percet alkalmaztam és 8 milliliteres frakciókat gyűjtöttem.



37. ábra *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs α -galaktozidáz enzim tisztítási lépései

Az előzőekhez hasonlóan az alfa-galaktozidáz aktivitást mutató frakciókat egyesítettem, sótalanítottam és koncentráltam. Ezt követően a mintát a Phenyl Sepharose Fast Flow töltetű oszlopra vittem fel, amely hidrofób kölcsönhatás elve alapján választja el a fehérjét. Az oszlopot előzőleg 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó 50 mM McIlvaine pH=5,8 pufferral hoztam egyensúlyba és 50 mM McIlvaine pH=5,8 puffer segítségével 2 ml/perces áramlási sebesség mellett végeztem az eluálást. A frakciók térfogata 2 ml volt. A tisztítás utolsó lépéseként Sephadex G200 gélszűrő oszlopot használtam, amelyet 10 mM McIlvaine pufferral hoztam egyensúlyba. Az injektálás után ugyanezzel a pufferral történt az eluálás 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett.

A végtisztítási lépés után kapott kromatogramot a 38. ábrán mutattam be. Az így kapott α -galaktozidáz enzim oldatot puffer segítségével koncentráltam.



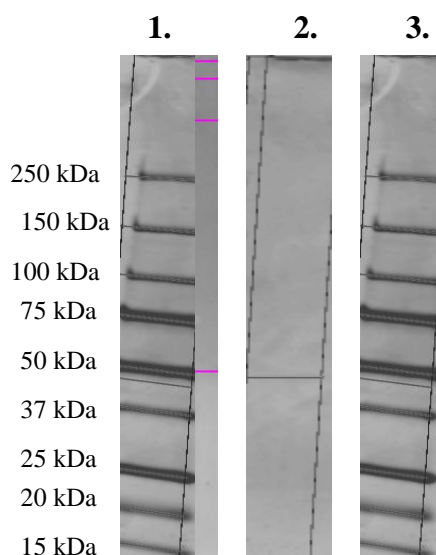
38. ábra A Sephadex G200 géliszűrő oszlopon kapott kromatogram

Az alkalmazott tisztítási eljárás anyagmérlegét a 22. táblázatban foglaltam össze. A kidolgozott és megvalósított tisztítási eljárással igaz homogenitásig sikerült tisztítani a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 eredetű intracelluláris alfa-galaktozidáz enzimet, de a tisztított enzim nem bizonyult stabilnak. Azt tapasztaltam, hogy a kevésbé szennyezett fehérjeoldat gyorsabban elveszítette az alfa-galaktozidáz aktivitást, mint a több komponensű nyers preparátum. Ez lehet a magyarázata annak, hogy egyes tisztítási lépéseknél is jelentős aktivitásvesztést detektáltam, amely nagyon kicsi kitermelést eredményezett. A stabilizáló környezettől megszabadított enzimpreparátum az egyes tisztítási lépések között az aktivitását több mint 90 %-át elveszítette.

22. táblázat *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 eredetű alfa-galaktozidáz enzim tisztítása

| Művelet | Összes aktivitás [U] | Összes fehérje [mg] | Specifikus aktivitás [U/mg] | Kitermelés [%] |
|--------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|
| Feltárt sejtek | 158,88 | 254,43 | 0,609 | 100 |
| DEAE Sepharose Fast Flow | 6,6 | 32,31 | 0,204 | 4,3 |
| Phenyl Sepharose | 0,11 | 2,27 | 0,049 | 0,07 |
| Sephadex G200 | 0,005 | 0,01 | 0,5 | 0,003 |

A kinyert enzim homogenitását az SDS-PAGE alapján kapott egyetlen fehérje sávot mutató elektroforetogram bizonyítja (39. ábra).



39. ábra *Bifidobacterium lactis* Bb-12 eredetű α -galaktozidáz enzim elektroforetogramja

1. Molekulamarker 10 μ l 2. Koncentrált Sephadex G200 minta 15 μ l 3. Molekulamarker 10 μ l

4.3.4 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 eredetű alfa-galaktozidáz enzim jellemzése

4.3.4.1 Molekulatömeg

A tisztított enzim molekulaméretének meghatározásához SDS-PAGE technikát alkalmaztam. Ez az eljárás molekulatömeg szerinti elválasztást tesz lehetővé. A gélelektroforézist megelőzően a tisztított enzimméztményt liofilezéssel koncentráltam. Az így előállított készítményt használtam a molekulatömeg meghatározáshoz.

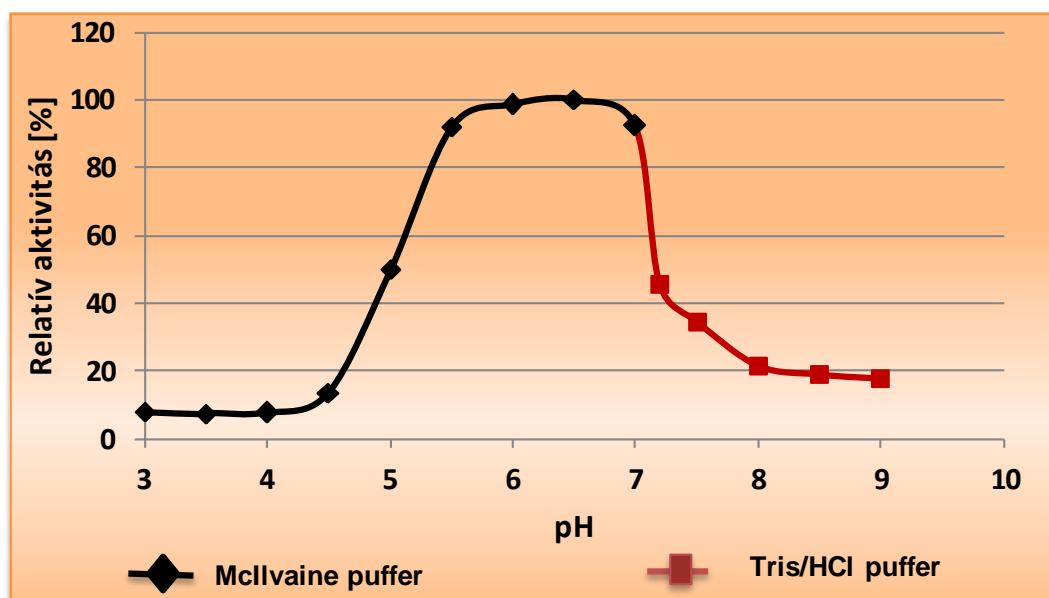
A végtisztítását követően csupán 1 fehérje sáv látható az elektroforetogramon (39. ábra). A zymogram kiértékeléséhez a BioRad USA cég által forgalmazott GelDoc berendezést és a hozzátartozó gélkép feldolgozó szoftvert alkalmaztam a fehérje speciesek azonosítására. Az alkalmazott molekulatömeg marker alapján megállapítottam, hogy a homogenitásig tisztított α -galaktozidáz enzimfehérje molekulatömege 50 kDa. Xiao és munkatársai [2000] publikációja szerint a *B. breve* eredetű α -galaktozidáz enzim struktúráját tekintve homodimer, és molekulatömegét 160 kDa becsülték. Azonban Leder és munkatársai [1994] egy másik törzs, a *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 α -galaktozidáz enzim taulmányozása során megállapították, hogy 145 kDa molekulatömegű tetramer szerkezetű. Más prokarióta szervezetből is izoláltak α -galaktozidáz enzimeket különböző molekulatömegekkel pl. *L. fermentum* CRL251 45 kDa [Garro *et al.*, 1993], *L. reuteri* NCIMB 41152 64 kDa [Tzortzis *et al.*, 2003], a *B. stearootherophilus* NCIM 5146 165,9 kDa (dimer). A fenti eredmények alapján

megállapíthatom, hogy a kapott α -galaktozidáz molekulatömege beleillik a szakirodalomi adatok közé.

4.3.4.2 pH és hőmérséklet optimum

A homogenitásig tisztított enzim hamar elvesztette az aktivitását, ezért az enzim jellemzéséhez egy részlegesen tisztított (Phenyl Sepharose oszlop után kapott preparátum) alfa-galaktozidáz enzimet használtam.

A enzim aktivitásának pH függését pH=3,0-9,0 tartományban vizsgáltam, amelynek érdekében pH=3,0-7,0 McIlvaine puffert, míg pH=7,2-9,0 TRIS/HCl puffert alkalmaztam. A méréseket 37°C-on hajtottam végre. Az α -galaktozidáz aktivitásokat a pH függvényében a 40. ábrán szemléltetem. A maximális aktivitást pH=6,5 értéknél detektáltam. Megállapítható, hogy az enzim széles pH optimummal rendelkezik, hiszen pH=5,5 és pH=7,0 közötti tartományban közel azonos aktivitás értékek voltak. Az általam kapott eredmény összhangban áll más bifidobaktériumok által szintetizált α -galaktozidáz enzim pH optimumával: *B. breve* 203 – pH=5,5-6,5 [Xiao *et al.*, 2000]; *B. adolescentis* DSM20083 – pH=5,5 [Leder *et al.*, 1994].

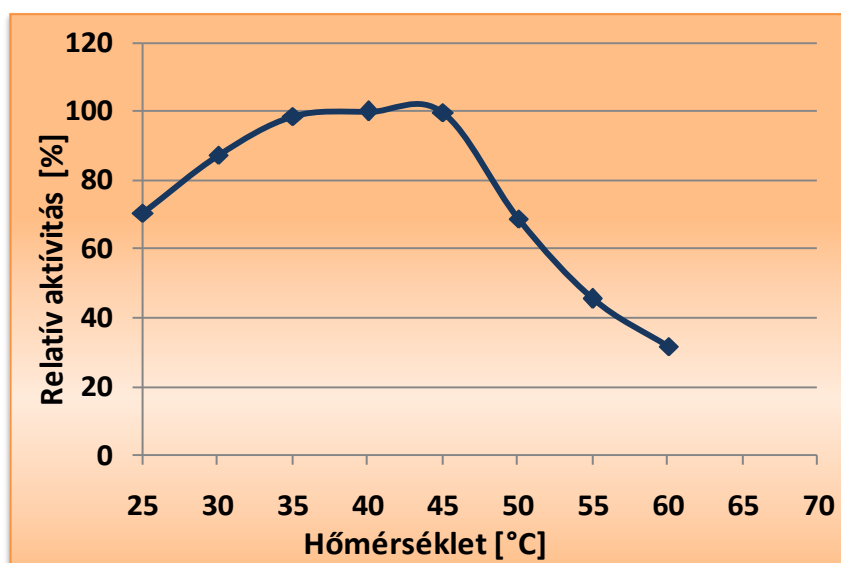


40. ábra Az alfa-galaktozidáz enzim aktivitásának pH optimuma (hőmérséklet=37 °C)

A különböző prokarióta eredetű alfa-galaktozidáz enzimek optimális pH értékeit összevetve megállapítottam, hogy a Bb-12 törzs eredetű α -galaktozidáz gyengén savas pH tartományban mutatott maximális aktivitást. Ez a tulajdonság kombinálva a széles pH optimummal előnyt jelenthet az enzim ipari alkalmazása szempontjából.

Az enzim hőmérséklet optimumát az előzőekben megállapított optimális pH érték mellett (pH=6,5) 25-60°C közötti tartományban (41. ábra) határoztam meg. Az optimális hőmérséklet

tartomány 35-45°C között található, 45°C felett lényeges aktivitás csökkentés volt megfigyelhető. Leder és munkatársai [1994] közölték, hogy a *B. adolescentis* DSM 20083 eredetű alfa-galaktozidáz optimális hőmérséklete 55°C volt, amely magasabb a *B. lactis* Bb-12 törzsénél. A tejsavbaktériumokból kinyert α -galaktozidázok is magasabb hőmérséklet optimumot mutatnak (50°C a *Lactobacillus reuteri* és *L. fermentum* CRL 722 törzseknél) [Tzortzis *et al.*, 2003; Carrera-Silva *et al.*, 2006]. Az eredményem azonban megegyezik a Yoon és Hwang [2008], valamint Garro és kutató csoportja [1996] által publikált adatokkal (*L. curvatus* és egy *Leuconostoc* törzs által szintetizált enzimek optimális hőmérséklete 37°C volt, míg a *L. fermentum* törzs eredetű optimális hőmérsékletét 45 °C-ra becsülték).

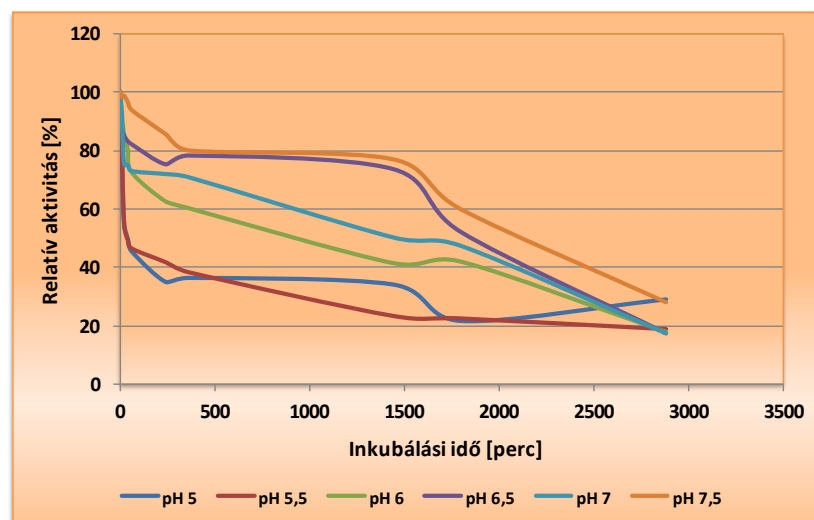


41. ábra A kapott α -galaktozidáz enzim aktivitásának hőmérséklet optimuma (pH=6,5)

4.3.4.3 Az enzim stabilitásának vizsgálata

Az α -galaktozidáz enzim stabilitását különböző hőmérsékleten (35°C - 50°C) és pH =5,0-7,5 közötti tartományban vizsgáltam. A meghatározott időpontokban történő mintavételezést követően meghatároztam az enzimaktivitást. A relatív aktivitást ábrázoltam az idő függvényében a felezési idő becslésére. Az inaktiválódási sebesség meghatározásához egyenest illesztettem a felvett pontokra és az egyenes meredekségből olvastam le az inaktiválódási sebességet (22. táblázat).

Megállapítható, hogy 35 °C-on, valamint pH=5,0 és pH=5,5 kémhatás mellett az enzim felezési ideje 250 perc volt, míg a semleges kémhatású közegben az enzim a 30 órás inkubálás után is megtartotta az aktivitásának többmint 50 %-át. Ezen a hőmérsékleten pH=6,5 érték mellett detektáltam a legnagyobb stabilitását, amelyhez 50 órás felezési idő tartozott.



42. ábra Az alfa-galaktozidáz enzim aktivitásának alakulása 40 °C-on különböző pH-jú körülmények között

A 40 °C-on történő inkubálás esetén az enzim pH=5,0 és pH=5,5 kémhatású közegben már a 40. percre elvesztette az aktivitásának felét. A pH=6,0 és pH=7,0 mellett a felezési idő 15,33 óra és 24 óra volt. Az enzim stabilitása jobbnak bizonyult pH=7,5 közegben, hiszen mintegy 60% aktivitást megtartotta a 30 órás kísérlet végéig (42. ábra).

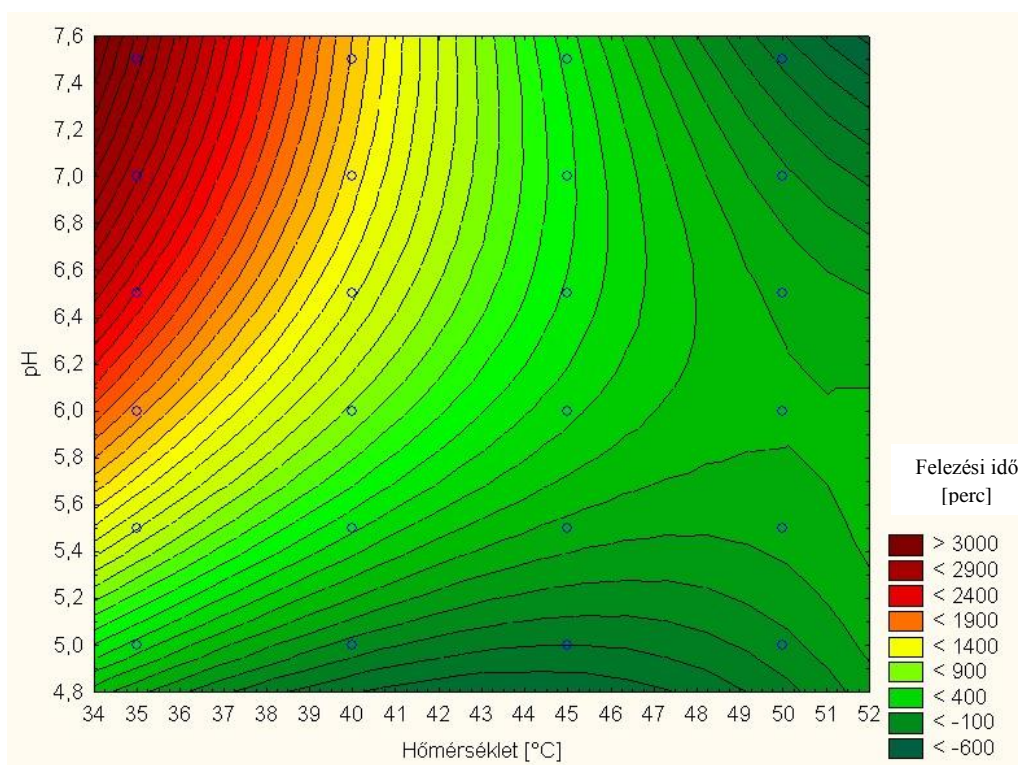
Jelentős stabilitás csökkenés tapasztalható a 45 °C-on történő inkubálás során. Az enzim a pH=5 – pH=5,5-n már 8 perc alatt elvesztette aktivitásának felét. A felezési idő megduplázódott a pH=6 –pH=6,5 kémhatásnál és a pH=7,5 értéknél már 5,5 órára növekedett.

Az 50°C-os inkubálási hőmérséklet mellett az enzim nagyon rövid ideig tartotta az aktivitást minden vizsgált pH értéken. A felezési idő csak 7-11 perc volt.

Carerra-Silva és kutató csoportja [2006] *L. fermentum* CRL 722 α -galaktozidáz stabilitásának vizsgálatával megállapították, hogy az enzim 50°C-on 30 perc után is megtartotta aktivitásának 100%-át, míg *L. reuteri* NCIM341152 törzs eredetű 60°C-on csupán 10 percig [Tzortzis *et al.*, 2003]. A felezési idő a *L. curvatus* R08 törzsnél 37 °C-on 1 órának adódott. Kiemelendő, hogy közel azonos (35°C) hőmérsékleten a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 eredetű α -galaktozidáz 30 órás inkubálás után is megtartotta az aktivitásának több mint 60 %-át. Gote és munkatársai [2006] *B. stearothermophilus* NCIM-5146 törzs α -galaktozidáz enzimének stabilitás vizsgálatokor arra a megállapításra jutottak, hogy az enzim 50°C-on 60 percig 100%-ig megtartotta az aktivitását, míg 60°C-on a felezési ideje 1 óra volt, addig 70°C-on ez már 30 percre csökkent le.

A meghatározott felezési időket a STATISTICA 9.0 statisztikai programcsomag segítségével válaszfelület módszer alkalmazásával ábrázoltam a hőmérséklet és a pH függvényében (43. ábra). Megállapítható, hogy a hőmérséklet növelésével a felezési idő jelentősen csökken. Ezzel ellentétben a pH emelésével a felezési idők növekedése figyelhető meg. Tekintettel az

enzimaktivitás hőmérséklet és pH függésére javasolható, hogy a 35-37°C-os és pH=6,5 és 7-es tartományban megfelelő az enzim aktivitása és stabilitása. E környezeti feltételek mellett az enzim 1-2 napig biztonsággal használható.



43. ábra Az enzim preparátum stabilitása a felezési idők alapján különböző környezeti körülmények mellett

A felezési idő mellett meghatároztam az enzim inaktiválódási sebességét, amelyet a 23. táblázatban foglaltam össze.

23. táblázat Inaktiválódási sebesség alakulása különböző hőmérsékleteken és pH-n

| Inaktiválódási sebesség [perc ⁻¹] | | Inkubálási hőmérséklet [°C] | | | |
|--|-----|-----------------------------|--------|-------|-------|
| | | 35 | 40 | 45 | 50 |
| pH | 5,0 | -1,87 | -1,19 | -3,86 | -3,52 |
| | 5,5 | -2,53 | -2,28 | -3,86 | -3,52 |
| | 6,0 | -2,04 | -2,01 | -3,07 | -3,04 |
| | 6,5 | -0,62 | -0,8 | -2,71 | -2,88 |
| | 7,0 | -0,565 | -0,82 | -2,9 | -2,99 |
| | 7,5 | -0,39 | -0,096 | -2,11 | -4,94 |

A legnagyobb értéket (-4,94) a pH=7,5-on és 50°C-on mértem. Azt jelenti, hogy ilyen körülmények között az enzim meredeken veszti az aktivitást. A legkisebb értéket (-0,096) pH=7,5-on 40°C-on tapasztaltam, ami azt jelzi, hogy lassan inaktiválódott az enzim. Ezen a pH

értéken a 35°C-on detektált inaktiválódási sebesség is csekélynek tekinthető. Magasabb hőmérsékleteken (45 és 50°C) történő inkubálás hatására az inaktiválódási sebesség növekedett.

4.3.4.4 Ionok hatása az alfa-galaktozidáz aktivitásra

A különböző ionok hatását az alfa-galaktozidáz enzim aktivitására a 24. táblázatban foglaltam össze.

24. táblázat Fémionok hatása az α -galaktozidáz aktivitásra

| Fém ionok [10mM] | Relatív aktivitás [%] |
|------------------|-----------------------|
| Kontroll | 100 |
| Mn ²⁺ | 91,6 |
| Mg ²⁺ | 87,9 |
| Ni ²⁺ | 87,0 |
| Ca ²⁺ | 86,3 |
| Zn ²⁺ | 86,2 |
| Cu ²⁺ | 85,5 |
| K ⁺ | 80,9 |
| Co ²⁺ | 36,1 |
| Ag ⁺ | 27,3 |
| Hg ²⁺ | 25,2 |

Eredményeim alapján elmondható, hogy a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs alfa-galaktozidáz enzimére a vizsgált koncentráció mellett egyik fémion sem mutatott aktiváló hatást. Legnagyobb gátló hatással a Co²⁺, Ag⁺, Hg²⁺ ionok rendelkeztek. A Hg²⁺ ion mintegy 75%-kal, a Ag⁺ 72%-kal és a Co²⁺ 64%-kal csökkentette az alfa-galaktozidáz aktivitását. Garro és munkatársai [1996] vizsgálták a *L. fermentum* CRL 251 törzs α -galaktozidáz enzimére az ionok hatását és hasonló megállapításra jutottak. A Hg²⁺ ion mintegy 99,9%-kal csökkentette az aktivitást. Ellentétben az általam használt 10 mM koncentrációval ők csupán 0,1 mM koncentrációban vizsgálták a Hg²⁺ ion hatását. Ezen szulfhidril-reaktív ionok (ezüst, higany) enzim inaktiváló tulajdonságát más szakirodalmak is alátámasztják [Cao *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2010; Gote *et al.*, 2006; Carerra-Silva *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2000]. Ebből következtethető, hogy az alfa-galaktozidáz enzim katalitikus régiójában tiol csoportot tartalmazó aminosav állhat (pl. cisztein). A higany ezen aminosav funkciós csoportjához kötődve módosíthatja az aktív centrumot, amely eredményezheti az enzim aktivitás teljes vagy jelentős részének elvesztését. Számos szakirodalom számol be arról, hogy a Mn²⁺ ion jelenléte növeli az alfa-galaktozidáz enzim aktivitását (Garro *et al.*, 1993; Garro *et al.*, 1994). Azonban voltak példák, hogy a Mn²⁺ ion bár csekély mértékben, de a *L. fermentum* CRL722 törzs eredetű α -galaktozidáz aktivitását

8%-kal csökkentette. Hasonló hatást tapasztaltak Mg^{2+} ion jelenlétében is [Carrera-Silva *et al.*, 2006].

Általában 12-20% közötti enzimaktivitás csökkenést tapasztaltam a Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} és K^+ ionok vizsgálatánál. Gote és munkatársai [2006] megállapították, hogy Mg^{2+} jelenléte nem változtatta a *B. stearothermophilus* eredetű enzim aktivitását. Míg *L. fermentum* törzsek alfa-galaktozidáz enzim aktivitását kisebb mértékben gátolták (93,8% illetve 97,6% maradék aktivitás) [Carrera-Silva *et al.*, 2006, Garro *et al.*, 1996]. A Ca^{2+} ion enyhe gátló hatására más irodalmi adatok is utalnak (*L. fermentum* CRL 722 és *B. stearothermophilus*) [Gote *et al.*, 2004, Carrera-Silva *et al.*, 2006]. A Zn^{2+} ion jelenléte egyes esetekben akár 25 % enzimaktivitás csökkenést is eredményezett [Garro *et al.*, 1996, Carrera-Silva *et al.*, 2006].

4.4 Új tudományos eredmények

1. Bebizonyítottam, hogy a *Lactobacillus acidophilus* La-5 probiotikus törzs jól szaporodik glükóz, laktóz, raffinóz és melibióz szénhidrát szubsztrátumokon. A fermentáció végén $5,0 \times 10^8$ és $5,0 \times 10^9$ tke/ml sejtsűrűség érhető el. Továbbá az alfa-galaktozidáz enzim indukálható raffinózzal, a béta-galaktozidáz enzim pedig laktózzal. Az enzimek szintézise a szaporodásához kötötten történik. A galaktozidázok szintézisének kimutattam a glükóz represszálo hatását. Az optimális laktóz koncentráció 1% és 2% közötti tartományban található, ahol az aktivitás a *L. acidophilus* törzs esetében 7,56 és 8,51 U/100 ml. Nagyobb laktóz koncentráció gátolja a béta-galaktozidáz aktivitását. Az alfa-galaktozidáz enzim azonban induktív módon szintetizálódik és a raffinóz bizonyult a legjobb induktornak, mely optimális koncentrációja 1,5 (w/v) %.
2. A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs szintetizál béta-galaktozidáz enzimet a glükózt és laktózt tartalmazó tápközegben, azonban megállapítottam, hogy a laktóz szubsztrátum alkalmazásával ötször-nyolcszor nagyobb enzimaktivitás érhető el, mint a többi vizsgált szénhidrátokon tapasztalt értékeknél. Az optimális laktóz koncentráció 1,0 (w/v) % és 1,5 (w/v) % közé esik. Valószínűsítettem, hogy a baktérium konstitutív módon szintetizálja a béta-galaktozidáz enzimet.
3. Megállapítottam, hogy a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs konstitutív módon szintetizálja az α -galaktozidáz enzimet. Azt tapasztaltam, hogy már 1% raffinóz elegendő a maximális alfa-galaktozidáz produktivitás ($13 \text{ U}/10^{10} \text{ sejt} \cdot \text{h}$) eléréséhez, amely maximum érték 15-20. órás fermentációnál meghatározható. Az intracelluláris alfa-galaktozidáz

enzimének jelentős része (aktivitás 91%-a) a citoplazmában található és csupán 9%-a a sejtfalhoz kötött.

4. Több kromatográfiás lépésben tisztítottam a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs alfa-galaktozidáz enzimét. A homogenitásig tisztított α -galaktozidáz enzim molekulatömegét 50 kDa-ra becsültem. Az enzim optimális hőmérséklete 35-45°C között található. Továbbá megállapítottam, hogy az enzim széles pH optimummal rendelkezik (pH=5,5-7,0). A Co^{2+} , az Ag^+ és a Hg^{2+} ionok gátolják az alfa-galaktozidáz enzim működését.
5. Hatásfelületi módszer alkalmazásával vizsgáltam a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs eredetű alfa-galaktozidáz enzim stabilitását. Megállapítottam, hogy a leghosszabb felezési idő (50 óra) akkor érhető el, amikor az enzimet 35 °C-os hőmérsékleten 6,5 pH mellett inkubálom. A felezési időt és az inaktiválódási sebességet együtt értékelve a 35-37°C-os és pH=6,5-7 közötti tartományt javaslom a biokonverziós kísérletek megvalósításához.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A PhD kutatási munkám a kereskedelmi forgalomban kapható három probiotikus törzs– a *Lactobacillus acidophilus* La-5, a *L. casei* 01 és a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 - által szintetizált galaktozidáz enzimekre fókuszáltak. A probiotikus baktériumok képesek voltak hasznosítani és növekedni számos alfa- és béta galaktozidos kötéseket tartalmazó szacharidokon, azaz rendelkeztek galaktozidáz aktivitásokkal. Ezen aktivitások szaporodáshoz kötötten, intracelluláris módon szintetizálódtak. A *L. acidophilus* La-5 és *Lactobacillus casei* 01 törzsek induktív módon termelték az α -galaktozidázt, de konstitutívan (általában invertázzal együtt) a β -galaktozidáz enzimet. Ezzel szemben, a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs pedig induktívan termelte a β -galaktozidázt és konstitutívan az α -galaktozidázt. Ezek azt bizonyítják, hogy a két fajta probiotikus baktériumban más és más a genom (legalább is a galaktozidáz kódoló géneknél) szerveződése. A tisztított *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs eredetű α -galaktozidáz enzim gyorsan elvesztette az aktivitását, amely megerősíti az általánosan elfogadott szabályt, hogy a tisztított intracelluláris enzimek instabilisak. Tekintettel ezen törzsek ipari jelentőségére és az irodalomban található hiányos tudományos információkra, az elért eredményeim kétségkívül hozzájárulnak a legnépszerűbb probiotikus baktériumok (α - β)-poli/oligo-galaktozidokat bontó képességüknek a megértéséhez.

Az eredményeim hasznosíthatók lehetnek olyan szinbiotikumok tervezésénél, amelyekben a *L. acidophilus* La-5, *Lactobacillus casei* 01 vagy *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzsek probiotikumként míg a GOS prebiotikumként szerepelnek. Az intracelluláris jellege miatt a GOS polimerizáltságának rövid (maximum DP5) kell lenni, különben nem tudja az alkalmazott törzs hasznosítani.

Megítélésem szerint a munka folytatásaként érdemes a galaktozidáz enzimek transzgalaktozidáz tulajdonságukat tanulmányozni a hidroláz aktivitásuk mellett. Ezen az úton haladva, lehetőség nyílna az integrált szinbiotikum rendszerének fejlesztésére, amely fontos szerepet játszik nemcsak az élelmiszergyártásban (élelmiszeriparban), hanem a gyógyszeriparban, sőt a megelőzési (preventív) gyógyászati módszerek alkalmazásában is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az egészségjavító és megőrző célú funkcionális élelmiszerek egyik meghatározó kategóriáját képezik a probiotikus termékek, amelyek előállításánál a leggyakrabban a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* probiotikus baktérium törzseit alkalmazzák. A probiotikumok kedvező élettani hatásai (bélrendszeri fertőzések megelőzése, laktóz intolerancia tüneteinek enyhítése, koleszterinszint csökkentés, immunmoduláló hatás) mellett kiváló technológiai előnyökkel is rendelkeznek. Noha a szakirodalomban számos tanulmány foglalkozik a törzsek technológiai tulajdonságainak és élettani hatásainak leírásával, a hidrolizáló enzimeikről azonban kevés adatot találhatunk, pedig anyagcseréjük során a tápanyaganyagok igen széles skáláját hasznosítják. A probiotikus baktériumok galaktozidáz enzimeire vonatkozóan csekély számban találhatóak tudományos közlemények. A fenti gondolatoktól motiválva, a PhD kutatómunkámban három probiotikus starter kultúra (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *L. casei* 01 és a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) által termelt galaktozidáz enzimek tanulmányozását tűztem ki célul. A munkám lényeges eredményeit a következőkben foglalom össze.

Az intracelluláris galaktozidáz enzimek kinyerését nagynyomást alkalmazó fizikai sejtfeltárással, French Press homogenizátor segítségével valósítottam meg. Megállapítottam, hogy a maximális fehérje és a megfelelő galaktozidáz aktivitások kinyeréséhez három egymást követő feltárási ciklus alkalmazása szükséges.

A *Lactobacillus casei* 01 törzs

A *L. casei* 01 törzs növekedési képességének vizsgálata során megállapítottam, hogy a törzs mind a glükózt, mind a glükóz+laktózt tartalmazó tápközegben megfelelően szaporodott. Általában a 10^7 tke/ml induló sejtszámról a fermentáció 24. órájában elérte a 10^9 tke/ml értéket. A legmagasabb sejtkoncentrációt az MRSG+0,5 (w/v)% laktóz tartalmazó tápközegben detektáltam, amely $1,78 \cdot 10^9$ tke/ml volt. Ebben a rendszerben a legkisebb béta-galaktozidáz aktivitást (0,03 U/100 ml) csak glükózt tartalmazó, míg a legnagyobb 0,08 U/100 ml-t MRSG+0,5% laktóz tartalmazó tápközegben mutatta a törzs. A kapott kis aktivitás értékek azzal magyarázhatóak - a másik *L. acidophilus* La-5 törzsnél tapasztaltakhoz hasonlóan –, hogy a tápközeg jelentős mennyiségű glükózt (2 w/v %) tartalmaz, amely elegendő szénforrásnak bizonyulhatott a sejt növekedéséhez, valamint katabolit repressziót fejthetett ki béta-galaktozidáz enzim szintézisére. A maximális béta-galaktozidáz aktivitás elérésére meghatároztam az optimális laktóz koncentrációt. Megállapítottam, hogy az optimális laktóz koncentráció 1 (w/v) % volt, amelynek alkalmazásával körülbelül 0,38 U/100 ml béta-galaktozidáz enzim aktivitás érhető el. Az enzimszintézisben a *L. casei* 01 törzsnél is megerősítettem a laktóz indukáló hatását.

A *Lactobacillus acidophilus* La-5 törzs

A törzs növekedési képességét vizsgáltam négy különböző szénhidráton (glükóz, laktóz, raffinóz és melibióz). Mind a négy vizsgált szénhidrát megfelelő növekedési szubsztrátumnak bizonyult. A glükózt tartalmazó tápközegekben a fermentáció 9. órájára a tenyészet elérte a stacioner növekedési fázist. Az oligoszacharidok hasznosításánál a fermentáció kezdeti szakaszában eltéréseket tapasztaltam, amelyek a szénhidrátok felvételéhez kapcsolódó eltérő transzport rendszerek mechanizmusával és a hasznosításukhoz szükséges glikozilhidroláz enzimek bioszintézisével magyarázhatók. Azonban a fermentáció végére mind a laktózon, mind a raffinózon is körülbelül $2,88 \cdot 10^9$ sejtszám érhető el, amely megegyezik a kontroll (glükózt tartalmazó) tápközeg alkalmazásánál kapott értékkel. Figyelemre méltó eredménynek tartom azt, hogy melibiózt tartalmazó tápközegekben a La-5 törzs csak mindegy 10^8 nagyságrendű sejtszámot ért el a 24 órás fermentáció végére. A törzs szaporodási képességének vizsgálata mellett galaktozidáz enzimek szintézisének módját is tanulmányoztam. Az alfa-galaktozidáz enzimaktivitás alakulását értékelve megállapítottam, hogy 2 (w/v)% raffinóz jelenlétében 13,51 U/100 ml aktivitás érhető el, míg csupán glükóz jelenlétében a *L. acidophilus* La-5 nem szintetizált alfa-galaktozidáz enzimet. Ennek oka, hogy a tápközegekben található 2 (w/v)% könnyen felvehető glükóz elegendő szén- és energiaforrásnak bizonyult a La-5 törzs számára. Megállapítottam, hogy az alfa-galaktozidáz enzim szintézise indukálható és a szaporodáshoz kötötten történik. Az enzim indukciója szempontjából az optimális raffinóz koncentrációt 1,5 (w/v)%-nak határoztam meg, ahol az alfa-galaktozidáz enzim aktivitása 23,5 U/100 ml volt. A raffinóz koncentráció további növelése az alfa-galaktozidáz aktivitás csökkenését eredményezte. A *L. acidophilus* La-5 törzs a négy szénhidrát szubsztrátum közül csak a laktózon és raffinózon mutatott béta-galaktozidáz aktivitást (7,11 és 0,62 U/100 ml), a glükózon és melibiózon pedig nem. A β -galaktozidos kötést tartalmazó laktóz szubsztrátumon több mint tízszeres béta-galaktozidáz aktivitást - 7,11 U/100 ml - mutattam ki a raffinóz szénhidráton tapasztaltnál képest. Optimáltam az induktorként számon tartott laktóz koncentrációját, amely 0,5 (w/v)%-nak adódott. Nagyobb laktóz koncentrációk alkalmazása (1 w/v %-2 w/v %) szignifikánsan nem növelte az enzim aktivitást (7,56 illetve 7,57 U/100 ml). A glükóz repressziós hatását bizonyítottam a béta-galaktozidáz enzim szintézise esetén. Abban az esetben, mikor a laktóz mellett glükóz is jelen volt a tápközegekben, a béta-galaktozidáz aktivitás csupán 0,75 U/ 100 ml, míg glükóz hiányában ez az érték 7,5 U/ 100 ml volt.

A *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs

A β -galaktozidáz enzim szintézis mechanizmusának feltárására a TPYG tápközeget laktózzal (0,1 w/v % és 0,5 w/v %) egészítettem ki. A Bb-12 törzs jól szaporodott a tápközegekben és a 24 órás tenyésztés után a sejtszámok elérték az $5-7 \cdot 10^8$ tke/ml sejtsűrűségét. A β -galaktozidáz

aktivitás 1,5 U/100 ml és 2,5 U/100 ml között változott az alkalmazott tápközeg és a fermentációs idő függvényében. Csak glükóz szénhidrátan szaporított bifidobaktériumnál is mérhető volt a béta-galaktozidáz aktivitás. Továbbá a laktóz kiegészítés nem eredményezett számottevő β -galaktozidáz aktivitás növekedését, ugyanakkor hatással van az enzimszintézis időbeni lefolyására. Különböző kémiai szerkezetű szénhidrátokkal (glükóz, laktóz, raffinóz) 2 (w/v)%-ban kiegészített TPY alaptápközegekben vizsgáltam a béta-galaktozidáz aktivitások alakulását. Azt tapasztaltam, hogy a béta-galaktozidos kötéseket nem tartalmazó szubsztrátumokon is jelentős béta-galaktozidáz aktivitás mérhető, amely a konstitutív enzimszintézisre utal. Azonban megállapítottam, hogy a laktóz szubsztrátum alkalmazásával ötször-nyolcszor nagyobb enzimaktivitás érhető el az egyéb szénhidrátokon tapasztalt értékeknél. Az optimális laktóz koncentráció 1,0 (w/v) % és 1,5 (w/v) % közé esik. Általában 1,5 (w/v) % laktóz elegendőnek bizonyult a maximális enzim produktivitás eléréséhez. Ezekben az esetekben a β -galaktozidáz produktivitásai 27-29 U/10¹⁰ tke*h között változtak. A 2,5 (w/v)% laktóz koncentráció (vagy ennél nagyobb) alkalmazása már gátolta az enzimszintézist.

Minden általam vizsgált szénforrás jelenlétében (glükóz, laktóz, raffinóz) kimutatható volt alfa-galaktozidáz enzimaktivitás. Megállapítottam, hogy a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs konstitutív módon szintetizálja az α -galaktozidáz enzimet. A legnagyobb aktivitást (9,46 U/100 ml) a fermentáció 15. órájában 2 (w/v)% raffinóz jelenlétében mértem. Azt tapasztaltam, hogy már 1% raffinóz elegendő a maximális α -galaktozidáz produktivitás (13 U/10¹⁰ sejt*h) eléréséhez, amely maximum érték 15-20 órás fermentációnál tapasztalható.

A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs intracelluláris α -galaktozidáz enzimének lokalizációját vizsgálva megállapítottam, hogy az aktivitás 91%-a a citoplazmában található és csupán 9%-a volt a sejtfalhoz kötött. Négylépéses kromatográfiás eljárással nyertem ki és tisztítottam enzimjellemzés céljából a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs eredetű α -galaktozidáz enzimet. Az enzimfehérje homogenitását SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztem és ennek alapján 50 kDa-ra becsültem annak molekulatömegét. A környezetétől megszabadított, homogenitásig tisztított enzim instablnak bizonyult, mivel gyorsan elvesztette az aktivitását.

A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 eredetű alfa-galaktozidáz enzim fizikokémiai jellemzése céljából meghatároztam az enzimműködés optimális környezeti paramétereit, amelyek a pH 5,5-7,0 és 35-45°C közötti hőmérsékleti tartományban vannak. 45 °C feletti hőmérsékleten történő aktivitás mérésnél mintegy 35%-os aktivitás csökkenést tapasztaltam.

Az enzim a legnagyobb stabilitást 35 °C-on és pH=6,5 érték mellett mutatta. Ebben az esetben a felezési idő 50 óra volt. Ezen a hőmérsékleten, pH=5,0 és pH=5,5 kémhatás mellett az enzim 4,2 óra inkubálás után elvesztette az aktivitásának 50%-át. A felezési idő drasztikusan csökkent (40 perc) 40 °C-on és pH=5,0 vagy pH=5,5 kémhatású közegben történő inkubálás során. Ezen

értékek a pH=6,0 és pH=7,0 mellett már 15,33 és 24 órának adódtak. Figyelemre méltó, hogy enyhén lúgos közegben az enzim aktivitásának mintegy 60%-át megtartotta 30 órán keresztül. Magasabb hőmérsékleten (45 °C) az enzim stabilitása csökkent és pH=5 – pH=5,5 között már 8 perc alatt elvesztette aktivitásának felét. Ez az idő mintegy kétszeresére növekedett pH 6 –pH 6,5 kémhatásnál. Viszont pH 7,5 értéknél 5 és fél órára volt becsülhető a felezési idő. Az 50°C-os inkubálási hőmérséklet mellett már minden vizsgált pH értéken az enzim nagyon rövid idő alatt inaktiválódott.

A felezési idők mellett meghatároztam az inaktiválódási sebességet is. Az adatok értékelésére hatásfelületi módszert alkalmaztam. A felezési időt és az inaktiválódási sebességet együtt értékelve a 35-37°C-os és pH=6,5-7 közötti tartomány javasolható a biokonverziós kísérletek megvalósításához.

Megvizsgálva 10 mM-os koncentrációban a különböző fémionok enzimaktivitásra gyakorolt hatását azt tapasztaltam, hogy az adott koncentrációban egyik általam vizsgált ion sem fokozta az aktivitást. Ugyanakkor a Co^{2+} , az Ag^+ és a Hg^{2+} ionok gátolták az enzim működését. A Hg^{2+} ion mintegy 75%-kal, az Ag^+ 72%-kal és a Co^{2+} 64%-kal csökkentette az alfa-galaktozidáz aktivitását.

A PhD kutatómunkám során kapott eredmények számos újdonságot hordoznak és hozzájárulnak az alkalmazott probiotikus törzsek enzimrendszerének megértéséhez, és ezen keresztül a funkcionális élelmiszerek (probiotikus, prebiotikus és szinbiotikus) tervezéséhez és fejlesztéséhez.

7. SUMMARY

Probiotic strains, which mainly belong to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera, are one of the essential parts of health-enhancing and preventive functional foods. Besides the beneficent physiological effects (prevention of intestines infections, mitigation of the symptoms of lactose intolerance, decrease of the cholesterol level, immune stimulating) the use of probiotics offers outstanding technological advantages. Although numerous studies consider the description of strain features and effects on human physiology there are insufficient information about the hydrolyzing enzymes however wide range of nutrients were metabolized by these strains. There are only few publications available about the galactosidase enzymes of probiotic bacteria. Therefore the aim of my PhD research is to evaluate the galactosidase enzyme production of three probiotic starter cultures (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *L. casei* 01 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12). The relevant results of my work are as follows. The extraction of the intracellular galactosidase enzymes were carried out by a high pressure homogenizer (French Press). To maximize protein content and proper galactosidase activity three extraction cycles are needed.

***Lactobacillus casei* 01 strain**

The evaluation of growth properties of *L. casei* 01 strain revealed proper growth on both glucose and glucose+lactose containing nutrient broth. During 24 hour of fermentation the cell concentration increased from 10^7 to 10^9 CFU/mL. The highest cell concentration ($1.78 \cdot 10^9$ CFU/mL) was detected, if MRSG nutrient broth supplemented with 0.5 (w/v)% lactose was applied. In this system the lowest beta-galactosidase activity (0.03 U/100 mL) was detectable, if only glucose was presented and the highest (0.08 U/100 mL), if the nutrient broth contained MRSG with 0.5% lactose. The low enzyme activity values, similar as in case of *L. acidophilus* La-5, are probably due to the glucose content (2 (w/v)%) of the nutrient medium, which provides enough carbon source for the microbial growth and also causes catabolic repression on the synthesis of beta-galactosidase enzyme. The optimal lactose concentration for the highest beta-galactosidase activity (0.38 U/100 mL) was 1 (w/v)%. I found the inducer effect of lactose on enzyme synthesis in case of *L. casei* 01 strain.

***Lactobacillus acidophilus* La-5 strain**

The growth properties of this strain were evaluated on four different carbohydrates (glucose, lactose, raffinose, melibiose). All the examined substrates provided proper growth. In glucose containing broth the culture reached a stationery growth phase at the 9th hour of fermentation.

There are differences in utilization of oligosaccharides at the initial phase of fermentation, which differences are supposedly derived from the different mechanism of the uptake transport systems and the biosynthesis of the necessary glycosylic hydrolase enzymes. However at the end of the fermentation on both lactose and raffinose the cell number were approximately $2.88 \cdot 10^9$, which is similar as in case of control broth (glucose substrate). It is interesting that in melibiose containing broth La-5 strain produced only 10^8 order of magnitude cell number at the end of the fermentation. Beside the evaluation of growth properties the process of galactosidase synthesis also were studied. According the result of alpha-galactosidase enzyme activity in presence of 2 (w/v)% raffinose 13.51 U/100 mL activity was detectable, while in case of glucose as sole carbon source *L. acidophilus* La-5 alpha-galactosidase was not synthesized. This can be explained that the broth with 2 (w/v)% glucose, which can easily be taken up, serve enough energy for La-5 strain. The synthesis of alpha-galactosidase can be induced and its production growth-associated. For the enzyme induction the optimal raffinose concentration is 1.5 (w/v)% which ensures 23.5 U/100 mL alpha-galactosidase activity. Further increase of raffinose concentration result an alpha-galactosidase activity decrease.

L. acidophilus La-5 strain showed only on lactose and raffinose beta-galactosidase activity (7.11 and 0.62 U/100 mL, respectively) among the four applied substrates, on glucose and mellibiose no activity was detected. On lactose substrate, which contains β -galactosidic bound, more then 10-fold higher beta-galactosidase activity was detected referring to raffinose substrate. The inducer concentration was optimized, which resulted 0.5 (w/v)% lactose concentration. Further increase of lactose concentration (1 w/v %-2 w/v %) did not significantly affect the enzyme activity (7.56 and 8.51 U/mL, respectively). I was verified the repressing effect of glucose on beta-galactosidase enzyme synthesis. If both lactose and glucose present in the culture medium beta-glucosidase activity was only 0.75U/ 100 mL, while in absence of glucose the enzyme activity was 7.5 U/ 100 mL.

***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 strain**

To reveal the mechanism of beta-galactosidase enzyme activity TPYG nutrient broth supplemented with lactose (0.1 and 0.5 w/v% concentration) was used. Bb-12 strain was grown well in the nutrient medium and after 24-hour fermentation the cell concentrations reached a level of $5\text{-}7 \cdot 10^8$ CFU/mL. β -galactosidase activity varied in range of 1.5 to 2.5 U/mL depending on the applied medium and fermentation time. Beta-galactosidase activity was also detectable if glucose was the sole carbohydrate. Supplementation with lactose did not result relevant beta-galactosidase activity increase, however lactose influenced the dynamic of enzyme synthesis. Beta-galactosidase activity change were evaluated in TPY medium supplemented with 2% of

carbohydrates with different chemical structure (glucose, lactose, raffinose). Beta-galactosidase was detectable also in media, which did not contain molecules with beta-galactosidic linkage. This phenomenon indicates the constitutive enzyme synthesis. Application of lactose substrate resulted 5-8-fold higher enzyme activity referring to the values of other carbohydrates. The optimal lactose concentration is between 1.0 (w/v) % és 1.5 (w/v) %. In almost all cases 1.5 (w/v)% lactose concentration was enough to maximize the enzyme production. In these cases the productivity of β -galactosidase varied between 27-29 U/10¹⁰·CFU·h. 2.5 (w/v)% concentration of lactose (or above) inhibited the enzyme synthesis.

In presence of all examined carbohydrate (glucose, lactose, raffinose) the activity of alpha-galactosidase were detectable. So I was suggested that Bb-12 strain constitutively synthesize alpha-galactosidase enzymes. The highest activity (9.46 U/100 mL) were measured at the 15th hour of fermentation in presence of 2(w/v)% of raffinose. According to the results 1% of raffinose is enough to maximize the enzyme productivity (13 U/10¹⁰·CFU·h), which is observable at 15-20 hour of fermentation. The evaluation of alpha-galactosidase location *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 strain revealed that 91% of activity is located in the cytoplasm and only 9% is located linked to the cell wall. A four steps including chromatographic method was used to extract and purify beta-galactosidase enzyme from *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 strain for the characterization purpose of the enzyme. The homogeneity of the enzyme protein was checked by SDS-PAGE method. According this result the molecule weight of beta-galactosidase which produced by *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 strain is approximately 50 kDa. Removed from the environment and purified to homogeneity the enzyme lost its stability, rapidly lost the activity.

To characterize the physical and chemical properties of alpha-galactosidase from *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 strain the optimal environmental conditions were evaluated. The range of optimal pH is 5.5-7.0 and the range of temperature optimum is 35-45 °C. Temperature over 45°C resulted in 35% activity loss.

The highest stability was detected at 35 °C and pH 6.5. At this circumstances the half-time is 50 hours. At this temperature on pH 5.0-5.5 the enzyme lost its 50% of activity after 4.2 hours of incubation. Half –time decrease rapidly (to 40 minutes) due to incubation at 40 °C on pH 5.0-5.5. This values on pH range of 6.0-7 are 15.33 and 24 hours. An interesting observation that in mildly alkali milieu the enzyme keeps 60% of its activity to 30 hours. At higher temperature (45°C) the enzyme lost is half of activity after 8 min on pH 5-5.5. This time doubled, if the pH was 6-6.5 however on pH 7.5 the half-time was approximately 5.5 hours. At 50°C incubation temperature in the whole analyzed pH range the enzyme inactivated rapidly.

Beside the half-time values the rate of inactivation were also examined. To evaluate the data the result response surface method was applied. The half-time and rate of inactivation values were evaluated together and the temperature range of 35-37°C and pH range of 6.5-7 can be proposed to bioconversion experiments. Several metal ions were examined to reveal the effect on enzyme activity in 10 mM concentration. In this concentration none of the examined metals increased the enzyme activity. However Co^{2+} , Ag^{2+} Hg^{2+} ions have inhibited the enzyme functions. Hg^{2+} ion 75%, Ag^{2+} 72% and Co^{2+} 64% decreased the enzyme activity of alpha-galactosidase.

The results of my PhD research contain numerous novelty and contribute to the research to reveal and understand the enzyme systems of the applied probiotic strains and to design and develop functional foods (prebiotics, probiotics and synbiotics).

8. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Akolkar S. K., Sajgure A., Lele S. S.** (2005) Lactase production from *Lactobacillus acidophilus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**, 1119-1122
- Alander M., Mättö J., Kneifel W., Johansson M., Kögler B., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Saarela M.** (2001) Effect of galacto- oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal* **11**, 817-825
- Alazzeh A. Y., Ibrahim S. A., Song D., Shahbazi A., AbuGhazaleh A. A.** (2009) Carbohydrate and protein sources influence the induction of α - and β -galactosidases in *Lactobacillus reuteri*. *Food Chemistry* **4**, 654-659
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.065>
- Anisha G. S., Prema P.** (2007) Production of α -galactosidase by a novel actinomycete *Streptomyces griseoloalbus* and its application in soymilk hydrolysis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **23**, 859-864 <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9310-6>
- Arunachalam K. D.** (1999) Role of *Bifidobacteria* in nutrition, medicine and technology. *Nutritional Research* **19**, 1559-1597
- Balasubramaniam S., Lee H. C., Lazan H., Othman R., Ali Z. M.** (2005) Purification and properties of a β -galactosidase from carambola fruit with significant activity towards cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* **66**, 153-163 <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.11.005>
- Barrangou R., Azcarate-Peril M. A., Duong T., Connors S. B., Kelly R. M, Klaenhammer T. R.** (2006) Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** (10) 3816-3821 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0511287103>
- Beerens, H. (1990):** An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium spp.* *Letters Applied Microbiology* **11**, 155-157 p.
- Bernardeau M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S., Guéguen M.** (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. **126**, 278-285 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015>
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V.** (2000) *Bifidobacteria*: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* **50**, 117-131
- Biswas S., Kayastha A. M., Seckler R.** (2003) Purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. *Journal of Plant Physiology* **160**, 327-337. <http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-00748>
- Borthakur, A., Gill R. K., Tyagi S., Koutsouris A., Alrefai W. A., Hecht G. A., Ramaswamy K., Dudeja, P. K.** (2008) The probiotic *Lactobacillus acidophilus* stimulates chloride/hydroxyexchange activity in human intestinal epithelial cells. *Journal of Nutrition* **138**, 1355–1359.

- Bradford M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248
- Campuzano S., Serra B., Llull D., Garcia J. L., Garcia P.** (2009) Cloning, expression, and characterization of a peculiar choline-binding beta-galactosidase from *Streptococcus mitis*. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 5972-5980 [http://dx.doi.org/ 10.1128/AEM.00618-09](http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00618-09).
- Cao Y., Yuan T., Shi P., Luo H., Li., Meng K., Bai Y., Yang P., Zhou Z., Zhang Z., Yao B.** (2010) Properties of a novel α -galactosidase from *Streptomyces* sp. S27 and its potential for soybean processing. *Enzyme and Microbial Technology* **47**, 305-312 [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.enzmictec.2010.09.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.007)
- Carrera-Silva E. A., Silvestroni A., LeBlanc J. G., Piard J. C., Savoy de Giori G., Sesma F.** (2006) A thermostable α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* CRL722: genetic characterization and main properties. *Current Microbiology* **53**, 374-378 [http://dx.doi.org/ 10.1007/s00284-005-0442-y](http://dx.doi.org/10.1007/s00284-005-0442-y)
- Chandrashekar A.** (2010) Chapter 6-Finger millet: *Eleusine coracana*. *Advances in Food and Nutrition Research*. **59**, 215-262 [http://dx.doi.org/ 10.1016/S1043-4526\(10\)59006-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526(10)59006-5)
- Cheikhoussef A., Cheikhoussef N., Chen H., Zhao J., Tang J., Zhang H., Chen W.** (2010) Bifidin I – A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: Purification and partial amino acid sequence. *Food Control* **21**, 746-753 [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.foodcont.2009.11.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.003)
- Chen W., Chen H., Xia Y., Zhao J., Tian F., Zhang H.** (2008) Production, purification, and characterization of potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus steatothermophilus*. *Journal of Dairy Science* **91**, 1751-1758 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-617>
- Cummings J. H., Macfarlane G. T.** (2002) Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition* **87** (2) 145-151 <http://dx.doi.org/10.1079/BJN/2002530>
- Davies G., Henrissat B.** (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3** (9) 853-859 [http://dx.doi.org/ 10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- Deák Tibor** (2006) Élelmiszer-mikrobiológia Mezőgazda Kiadó Kft.
- Deutscher J.** (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 87-93 [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.mib.2008.02.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.007)
- de Verse M., Marteau P. R.** (2007) Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *The Journal of Nutrition*. **137**, 803-811
- Djouzi Z., Andrieux C., De Givry M. C., Bouley C., Szylit O.** (1997) The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* 01 DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *Journal of Nutrition* **127**, 2260-2266

- Dumortier V., Brassart C., Bouqueret S.** (1994) Purification and properties of a beta-D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **19**, 341-354
- Elisha, B. G., Courvalin, P.** (1995) Analysis of genes encoding dalanine: dalanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene* **152**, 79–83. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00692-L](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(94)00692-L)
- FAO/WHO** (2006): Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, Rome
- Farzadi M., Khatami S., Mousavi M., Amirmozafari N.** (2011) Purification and characterization of α -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus*. *African Journal of Biotechnology* **10**, 1873-1879 <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.357>
- Ferreira J. G., Reis A. P., Guimaraes V. M., Falkoski D. L., Fialho L. D. A. S., de Rezende S. T.** (2011) Purification and characterization of *Aspergillus terreus* alpha-galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**, 1111-1125 <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-011-9198-y>
- Fredslund F., Hachem M. A., Larsen R. J., Sørensen G. P., Coutinho P. M., Leggio L. L., Svensson B.** (2011) Crystal structure of α -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: Insight into tetramer formation and substrate binding. *Journal of Molecular Biology* **412**, 466-480 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.057>
- Freitas F. F., Marquez L. D. S., Ribeiro G. P., Brandão G. C.** (2011) A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase. *Biochemical Engineering Journal* **58-59**, 33-38 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.08.011>
- Fuglsang A., Rattray F. P., Nilsson D., Nyborg N. C.** (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. *Antonie Leeuwenhoek* **83**, 27–34.
- Fujimoto Z., Kaneko S., Kim W-D., Park G-G., Momma M., Kobayashi H.** (2009) The tetramer structure of glycoside hydrolase family 27 α -galactosidase I from *Umbelopsis vinacea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **73** (10) 2360-2364 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.057>
- Garro M. S., de Giori G. S., de Valdez G. F., Oliver G.** (1993) Characterization of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Applied Bacteriology* **75** (5) 485-488. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02805.x>
- Garro M. S., de Valdez G. F., Oliver G., de Giori G. S.** (1996) Purification of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Biotechnology* **45**, 103-109
- Garro M. S., De Giori G. S., De Valdez G. F., Oliver G.** (1994) α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* **19**, 16-19 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00892.x>
- Gilman J., Cashman K. D.** (2006). The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **7**, 1–5.

Goldin B. R., Gorbach S. L., Saxelin M., Barakat S., Gualtieri L., Salminen S. (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. Digestive Diseases Sciences **37**, 121–128. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01308354>

Golubev A. M., Nagem R. A. P., Neto J. R. B., Neustroev K. N., Eneyskaya E. V., Kulminskaya A. A., Shabalin K. A., Savel'ev A. N., Polikarpov I. (2004) Crystal structure of α -galactosidase from *Trichoderma reesei* and its complex with galactose: Implications for catalytic mechanism. Journal of Molecular Biology **339**, 413–422 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.062>

Gomes A. M. P., Malcata F. X. (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. Trends in Food Science & Technology **10**, 139–157 [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00033-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00033-3)

Gote M. M., Khan M. I., Gokhale D. V., Bastawde K. B., Khire J. M. (2006) Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). Process Biochemistry **41**, 1311–1317 <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.003>

Gote M., Umalkar H., Khan I., Khire J. (2004) Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. Process Biochemistry **39**, 1723–1729 <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.07.008>

Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G., Gibson, G. R. (2009) A novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties: gene molecular cloning and heterologous expression Applied Microbiology and Biotechnology **82**, 471–477 <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1750-5>

Granato D., Branco G. F., Cruz A. G., Faria J. A. F., Shah N. P. (2010) Probiotic dairy products as functional foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **9**, 455–470 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>

Guce A. I., Clark N. E., Salgado E. N., Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Brumer H., Garman S. C. (2010) Catalytic Mechanism of human α -galactosidase. The Journal of Biological Chemistry. **285**, 3625–3632 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.060145>

Gul-Guven R., Guven K., Poli A., Niclaus B. (2007) Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. Enzyme and Microbiol Technology **40**, 1570–1577

He T., Priebe M. G., Zhong Y., Huang C., Harmsen H.J.M., Raangs G.C., Antoine J.-M., Welling G.W., Vonk R.J. (2007) Effect of yoghurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. Journal of Applied Microbiology **104**, 595–604 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03579.x>

Hinz S. W. A., van den L. A. M., Beldman G., Vincken J-P., Voragen A. G. J. (2004) β -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 prefers β (1,4)-galactosides over lactose. Applied Microbiology and Biotechnology **66**, 276–284

- Hirayama, K., & Rafter, J.** (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, **2**, 681–686.
- Holt S. M., Teresi J. M., Cote G. L.** (2008) Influence of alternansucrase-derived oligosaccharides and other carbohydrates on α -galactosidase and α -glucosidase activity in *Bifidobacterium adolescentis*. Letter in *Applied Microbiology* **46**, 73-79 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02266.x>
- Hsu C. A., Yu R. C., Chou C. C.** (2005) Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* **104**; 197-206 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.010>
- Hsu C.-A., Yu R.-C., Chou C.-C.** (2006) Purification and characterization of a sodium-stimulated β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **22**, 355-361 <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9041-0>
- Hung M.-N., Lee B. H.** (2002) Purification and characterization of recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 439-445 <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-001-0911-6>
- Husain Q.** (2010) Beta-galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* **30** (1) 41-62 <http://dx.doi.org/10.3109/07388550903330497>
- Ibrahim, S. A., Alazzeah A. Y., Awaisheh S. S., Song D., Shahbazi A., AbuGhazaleh A. A.** (2010) Enhancement of α - and β -galactosidase activity in *Lactobacillus reuteri* by different metal ions. *Biological Trace Element Research* **136**, 106-116 <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-009-8519-2>
- Iqbal S., Nguyen T.-H., Nguyen T. T., Maischberger T., Haltrich D.** (2010) β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. **345**, 1408-1416
- Itsaranuwat P., Al-Haddad K. S. H., Robinson R. K.** (2003) The potential therapeutic benefits of consuming health promoting fermented dairy products: a brief update. *International Journal of Dairy Technology* **56**, 203-210 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00106.x>
- Jiang T., Mustapha A., Savaiano D. A.** (1996) Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science* **79**, 750-757
- Kestwal R. M., Bhide S. V.** (2007) Purification of β -galactosidase from *Erythrina indica*: Involvement of tryptophan in active site. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**, 1506-1512 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.07.002>
- Kim W. D., Kobayashi O., Kaneko S., Sakakibara Y., Park G. G., Kusakabe I., Tanaka H., Kobayashi H.** (2002) Alpha-galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. *Nipponbare*) cells. *Phytochemistry* **61**, (6) 621-30
- Kishore D., Kayastha A. M.** (2012) Optimisation of immobilisation for chick pea β -galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its

- application in lactose hydrolysis. Food Chemistry **3**, 1650-1657
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.055>
- Konsoula Z., Liakopoulou Kyriakides M.** (2007) Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. Bioresource Technology **98**, 150-157
- Krewinski F., Brassart C., Gavini F., Bouquelet S.** (1997) Glucose and galactose transport in *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. Current Microbiology **35**, 175-179
<http://dx.doi.org/10.1007/s002849900234>
- Kurakake M., Moriyama Y., Sunouchi R., Nakatani S.** (2011) Enzymatic properties and transglycosylation of α -galactosidase from *Penicillium oxalicum* SO. Food Chemistry **126**, 177-182
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.095>
- Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F., van Sinderen D.** (2005) Getting better with *bifidobacteria*. Journal of Applied Microbiology **98**, 1303-1315
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x>
- Leblanc J. G., Milani C., de Giori G. S., Sesma F., van Sinderen D., Ventura M.** (2013) Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. Current Opinion in Biotechnology **24**, 160-168
- Leder S., Hartmeier W., Marx S. P.** (1994) α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. Current Microbiology **38**, 101-106
- Lee J. H., Lee S. K., Park K. H., Hwan I. K., Ji G. E.** (1999) Fermentation of rice using amylolytic *Bifidobacterium*. International Journal of Food Microbiology **50** (3) 155-161
- Lee J. H., Li X., O'Sullivan D. J.** (2011) Transcription analysis of a lantibiotic gene cluster from *Bifidobacterium longum* DJO10A. Applied and Environmental Microbiology **77**, 5879-5887. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00571-11>
- Li Y., Wang H., Lu L., Li Z., Xu X., Xiao M.** (2009) Purification and characterization of a novel beta-galactosidase with transglycosylation activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1. Applied Biochemistry and Biotechnology **158**, (1) 192-9
- Ljungh A., Wadström T.** (2006) Lactic acid bacteria as probiotic. Current Issues Intestinal Microbiology **7**, (2) 73-89
- Lu L., Xiao M., Xu X., Li Z., Li Y.** (2007) A novel β -galactosidase capable of glycosyl transfer from *Enterobacter agglomerans* B1. Biochemical and Biophysical Research Communications **356** (1) 78-84
- Macfarlane S., Macfaelane G. T., Cummings J. H.** (2006) Review article: prebiotic in the gastrointestinal tract. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. **24**, 701-714
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03042.x>
- Maciuńska J., Czyz B., Synowiecki J.** (1998) Isolation and some properties of β -galactosidase from the thermophilic *Thermus thermophilus*. Food Chemistry **63** (4) 441-445
[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00069-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00069-7)

- Maischberger T., Leither E., Nitisinprasert S., Juajun O., Yamabhai T. H., Nguyen T. H., Haltrich D.** (2010) Beta-galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. *Biotechnology Journal* **5**, 838-847 <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201000126>
- Makras L., De Vuyst L.** (2006) The *in vitro* inhibition of Gram-positive pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, **16** (9) 1049-1057. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.006>
- Manzanares P., de Graaff L. H., Visser J.** (1998) Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger* purification of a novel α -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 383-390
- Marraccini P., Rogers W. J., Caillet V., Deshayes A., Granato D., Lausanne F., Lechat S., Pridmore D., Pétiard V.** (2005) Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 909-920 <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.08.010>
- Marteau, P., Pochart, P., Flourie, B., Pellier, P., Santos, L., Desjeux, J.F., Rambaud, J.C.** (1990). Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* **52**, 685–688.
- Maksimainen M., Paavilainen S., Hakulinen N., Rouvinen J.** (2012) Structural analysis, enzymatic characterization, and catalytic mechanisms of β -galactosidase from *Bacillus circulans* sp. *alkalophilus*. *FEBS Journal* **279** (10) 1788-1798 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08555.x>
- Matthews B. W.** (2005) The structure of *E. coli* β -galactosidase. *Comptes Rendus Biologies* **328**, 549-556. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2005.03.006>
- Martinez F. A. C., Balciunas E. M., Converti A., Cotter P. D., Oliveira R. P. S.** (2013) Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances* **31** (4) 482-488
- Milchová Z., Rosenberg M.** (2006) Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*. **2**, 47-54
- Möller C., De Vrese M.** (2004) Review: probiotic effects of selected acid bacteria. *Milchwissenschaft* **59**, 597-601
- Mussatto S. I., Mancilha I. M.** (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* **68**, 587-597 <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>
- Nagy Z., Kiss T., Szentirmai A., Biró S.** (2001) β -galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, and characterization of the enzyme. *Protein Expression and Purification* **21**, 24-29 <http://dx.doi.org/10.1006/prep.2000.1344>
- Nguyen T., Splechtna B., Steinboeck M., Kneifel W., Lethner H. P., Kulbe K. D., Haltrich D.** (2006) Purification and characterization of two novel beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4989-4998.

Nguyen T., Splechna B., Krasteva S., Kneifel W., Kulbe K. D., Divne C., Haltrich D. (2007) Characterization and molecular cloning of a heterodimeric beta-galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiology Letters* **269**, 136-144.

Numanoğlu Y., Sungur S. (2004) β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. *Process Biochemistry* **39**, 703-709

Ouwehand A. C., Kirjavainen P. V., Shortt C., Salminen S. (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* **9**, 43-52 [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00043-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00043-6)

Park A-R., Oh D-K. (2010) Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 1279-1286 <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2356-2>

Patil A. G., K. Pk, Mulimani V. H., Veeranagouda Y., Lee K. (2010) Alpha-galactosidase from *Bacillus megaterium* VHM1 and its application in removal of flatulence-causing factors from soymilk. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**, (11) 1546-54 <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.0912.12012>

Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C. (2005) Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **22**, 495-512 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>

Pokusaeva K., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. (2011) Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutrition* **6**, 285-306 <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>

Prashnath S. J., Mulimani V. H. (2004) Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate. *Process Biochemistry* **40**, 1199-1205 <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.011>

Puchart V., Vrsanska M., Bhat M. K., Biely P. (2000) Purification and characterization of alpha-galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1524**, 27-37 [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00138-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00138-0)

Rabiu B. A., Jay A. J., Gibson G. R., Rastall R. A. (2001) Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides from *Bifidobacterium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2526-2530 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.6.2526-2530.2001>

Rezessy-Szabó J. (2003) *Thermomyces lanuginosus* eredetű α -galaktozidáz enzim előállítás és jellemzése. Doktori disszertáció Budapesti Corvinus Egyetem

Rezessy-Szabó J. M., Nguyen D. Q., Hoschke Á., Breat C., Hajós Gy., Claeysens M. (2007) A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**, 55-62

Rhimi M., Aghajari N., Jauoadi B., Juy M., Boudebouze S., Maguin E., Haser R., Bejar S. (2009) Exploring the acidotolerance of β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus: an attractive enzyme for lactose bioconversion. *Research in Microbiology* **160**, 775-784

Richmond M. L., Gray J. I., Stine C. M. (1981) Beta-galactosidase: Review recent research related to technological application, nutritional concerns and immobilization. *Journal of Dairy Science* **64**, 1759-1771 [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82764-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82764-6)

Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y. (2011) Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* **27**, 1-11 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>

Roberfroid M. B. (2008) Prebiotics: Concept, definition, criteria, methodologies, and products. *Handbook of prebiotics*. CRC Press, **Part 3**, 39-69.

Rolfe R. D. (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition* **130**, 396-402.

Saavedra J. M., Bauman N. A., Oung I., Perman J.A., Yolken R. H. (1994) Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet*, **344**, 1046-1049 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91708-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91708-6)

Saleh F. A., El-Sayed E. M. (2004) Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12 and *Bifidobacterium longum* BB-46. 9th Egyptian Conference for Dairy Science and Technology. Cairo. Research Papers; 323-37.

Sako T., Matsumoto K., Tanaka R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal* **9**, 69-80 [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00046-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00046-1)

Santos A., Ladero M., García-Ochoa F. (1998) Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 558-567 [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00236-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00236-6)

Savard P., Lamarche B., Paradis M-E., Thiboutot H., Laurin É., Roy D. (2011) Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* **149** (1) 50-57 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.026>

Scigelova M., Crout D. H. G. (2000) Purification of α -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **8**, 175-181 [http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00055-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00055-7)

Shah, N. P. (2006). Functional cultures and health benefits. In *Scientific and week book of abstracts* (pp. 35-36). Sirmione, Italy, 15-19 May 2006

Shaikh S. A., Khire J. M., Khan M. I. (1999) Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp.. *Biochimica et Biophysica Acta* **1472**, 314-322 [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00138-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00138-5)

Shen W., Jin Z., Xu X., Zhao J., Deng L., Chen H., Yuan C., Li D. (2008) New source of α -D-galactosidase. Germinating coffee beans. Food Chemistry **110** (4) 962-966 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.002>

Sheu B.-S., Cheng H.-C., Kao A.-W., Wang S.-T., Yang Y.-J., Yang H.-B., Wu J.-J. (2006) Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. The American Journal of Clinical Nutrition **83**, 864-869

Shivam K., Mishra S. K. (2010) Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase with transglycosylation activity from *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796. Process Biochemistry **45**, 1088-1093 <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.027>

Simerská P., Monti D., Čechová I., Pelantová H., Macková M., Bezouška K., Riva S., Křen V. (2007) Induction and characterization of an unusual α -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. Journal of Biotechnology **128**, 61-71 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.09.006>

Song C., Liu G.-L., Xu J.-L., Chi Z.-M. (2010) Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. Process Biochemistry. **45**, (6) 954-960 <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.02.025>

Soh C. P., Ali Z. M., Lazan H. (2006) Characterisation of an alpha-galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. Phytochemistry **67** (3) 242-54

Smart J. B., Pillidge C. J., Garman J. H. (1993) Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of β -galactosidase and phospho- β -galactosidase. Journal of Dairy Research **60**, 557-568 <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900027904>

Szakály, S. (2004) A probiotikumokkal kapcsolatos alapismeretek. –in: Szakály, S. (Ed): Probiotikumok és humánegészség. Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet kiadványa, Mosonmagyaróvár, pp.4-17.

Taniguchi A. Y., Takano K. (2004) Purification and properties of β -galactosidases from *Tilapia intestine*: Digestive enzyme of Tilapia-X. Fisheries Science **70**, 688-694.

Terra V. S., Homer K. A., Rao S. G., Andrew P. W., Yesilkaya H. (2010) Characterization of novel beta-galactosidase activity that contributes to glycoprotein degradation and virulence in *Streptococcus pneumoniae*. Infection and Immunity **78**, 348-357 <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00721-09>

Thippeswamy T., Mulimani V. H. (2002) Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. Process Biochemistry **38**, (5) 635-640 [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00010-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00010-9)

Torres D. P. M., Gonçalves M. P. F., Teixeira J. A., Rodrigues L. R. (2010) Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **9**, 438-454 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>

Tózsér J., Emri T., Csősz É., Tózsér J. (2011) Protein biotechnology. University of Debrecen

- Turpin W., Humblot C., Thomas M., Guyot J-P.** (2010) *Lactobacilli* as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* **143**, 87-102 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.032>
- Tzortzis G., Jay A. J., Baillon M. L. A., Gibson G. R., Rastall R. A.** (2003) Synthesis of α -galactooligosaccharides with α -galactosidase from *Lactobacillus reuteri* of canine origin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**, 286-292 <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1426-0>
- Van Den Broek L. A. M., Voragen A. G. J.** (2008) Bifidobacterium glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **9** (4), 401-407 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2007.12.006>
- van Laere K. M. J., Hartemink R., Beldman G., Pitson S., Dijkema C., Schols H. A., Voragen A. G. J.** (1999) Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 α -galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 681-688 <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051579>
- Vasiljevic T., Shah N. P.** (2008) Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* **18**, 714-728 <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
- Ventura M., O'Connel-Motherway M., Leahy S., Moreno-Munoz J. A., Fitzgerald G. F., van Sinderen D.** (2007) From bacterial genome to functionality, case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **120**, 2-12 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.011>
- Vitali B., Ndagijimana M., Cruciani F., Carnevali P., Candela M., Guerzoni M. E., Brigidi P.** (2010) Impact of a symbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. *BMC Microbiology*. **10**, 1-13 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-4>
- Xiao M., Tanaka K., Qian X. M., Yamamoto K., Kumagai H.** (2000) High-yield production and characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* grown on raffinose. *Biotechnology Letters* **22**, 747-751
- Yildirim Z., Winters D. K., Johnson M. G.** (1999) Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 45-54. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00629.x>
- Yoon M. Y., Hwang H.-J.** (2008) Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology* **25**, 815-823 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.008>
- Zárate G., Chaia A. P., Oliver G.** (2002) Some characteristics of practical relevance of β -galactosidase from potential probiotic strains of *Propionibacterium acidipropionici*. *Anaerobe* **8**, (5) 259-267 <http://dx.doi.org/10.1006/anae.2002.0440>
- Zhao H., Lu L., Xiao m., Wang Q., Lu Y., Liu C., Wang P., Kumagai H., Yamamoto K.** (2008) Cloning and characterization of a novel α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* 203 capable of synthesizing Gal- α -1,4 linkage. *FEMS Microbiology Letters* **285**, (2) 278-283

Zhou Q. Z. K., Chen X. D. (2001) Effects of temperature and pH on the catalytic of immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biochemical Engineering Journal **9**, 33-40 [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00118-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00118-8)

<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium>)

www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html

http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#bibkey_Gebler1992

<http://patricbrc.org/portal/portal/patric/TaxonomyTree?cType=taxon&cId=186826>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom konzulensemnek **Rezessyné Dr. Szabó Judit** egyetemi magántanárnak aki széleskörű szakmai ismereteivel, gyakorlati tapasztalataival és hasznos tanácsaival segítette munkámat. Köszönöm, hogy bármikor fordulhattam Hozzá, mindig segítőkészen fogadott, és biztatott. Segítsége nélkül nem készülhetett volna el dolgozatom.

Köszönetet szeretnék mondani másik konzulensemnek **Dr. habil. Nguyen Duc Quang** egyetemi docensnek aki szakmai képességeinek köszönhetően segítette kísérletes munkámat, eredményeim statisztikai kiértékelését és megosztotta velem szaktudását doktori munkám előrelépéséhez.

Köszönettel tartozom a **Sör- és Szeszipari Tanszék** munkatársainak, hogy kellemes légkört teremtve dolgozhattam velük.

Külön szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kun Szilárdnak** és **Styevkó Gabriellának**, hogy önzetlen segítségükkel, tanácsaikkal támogattak és lelkesítettek a nehezebb időszakokban is.

Köszönöm hallgatóimnak, **Solymosi Péternek**, **Fischer Edinának**, **Kováts Viktóriának**, **Kovács Rékának** és **Kocsis Tímeának** hogy az általuk elvégzett munkával hozzájárultak a dolgozatom eredményeinek megszületéséhez.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani **szüleimnek**, **testvéremnek** és nem utolsósorban férjemnek **Zombori Zsoltnak** támogatásukért, segítségükért, biztatásukért, valamint, hogy a dolgozatom elkészülése alatt mindvégig mellettem álltak.