



**BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM**  
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KERESKEDELMI FORGALOMBAN KAPHATÓ PROBIOTIKUS BAKTÉRIUMOK  
GALAKTOZIDÁZ ENZIMEINEK TANULMÁNYOZÁSA

**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

**Témavezető:** **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 MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmel, valamint a galaktomannán gélesítő tulajdonságainak javításában, a Fábry betegség kezelésében vagy a vércsoport átalakításában is alkalmazzák az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet. A  $\beta$ -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 vízáktivitás, 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 kereskedelemben kapható ipari béta-galaktozidáz enzimek készítmények *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 galaktozidáz enzimekkel kellene TrGOS-ot előállítani, így növelhető annak esélye, hogy az prebiotikum lehessen. Egy másik megoldás lehet ha probiotikus szabad/rögzített sejtek alkalmazásával állítunk elő prebiotikus TrGOS-t. 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) 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)  $\alpha$ - és  $\beta$ -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

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálataim során a Chr. Hansen cég által forgalmazott három probiotikumot – *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Lactobacillus casei* 01, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 használtam.

### *Mikrobiológiai vizsgálatok*

A bifidobaktérium mennyiségi meghatározásához TPY tápagart, míg a tejsavbaktériumokéhoz MRS agart alkalmaztam.

### *Enzimfermentációs kísérletek megvalósítása*

Az enzim fermentációs 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.

### *Sejtfeltárás*

A tejsavbaktériumok és a bifidobaktériumok galaktozidáz enzimeit intracellulárisak, ezért detektálásukhoz a sejtek feltárása szükséges. Sejtek feltárására a mechanikai eljárások közé tartozó French Press nagynyomású homogenizátort alkalmaztam. A sejtfeltárás előtt centrifugálással elválasztottam a sejteket (12000 rpm, 10 perc, 4 °C-on), majd a sejteket háromszor mostam pufferrel (0,2 M McIlvaine pH=6,6) és a mosási lépések után centrifugálással összegyűjtött sejteket használtam fel a sejtfeltáráshoz. A sejtfeltárást három egymást követő ciklusokban végeztem el 800 Psi nyomás mellett.

### *Galaktozidáz enzim aktivitások meghatározása*

A galaktozidáz enzimek aktivitásának meghatározásához McIlvaine puffer (pH=6,6) alkalmaztam. A 0,5 ml szubsztrátumból ( $\alpha$ -galaktozidáz esetében: 15mM p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid;  $\beta$ -galaktozidáz esetében 15mM p-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid) és 0,3 ml McIlvaine pufferből (pH=6,6) álló elegyet 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oldattal állítottam le a reakciót majd 405 nm spektrofotométer segítségével

mértem az oldat abszorbanciáját. Egy egységnyi galaktozidáz az az enzimmennyiség, mely 1 $\mu$ M p-nitrofenolt szabadít fel egy perc alatt a reakció körülményei között.

#### *Fehérjetartalom meghatározása*

A fehérjetartalom meghatározására Bradford módszert illetve 280 nm-en történő fényelnyelésen alapuló módszert alkalmaztam.

#### *Enzim lokalizációjának meghatározása*

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

#### *Enzim tisztítási eljárások*

Az alfa-galaktozidáz enzim kinyerését és tisztítását sejtfeltárással, ioncserélő kromatográfiával (DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose), hidrofób kölcsönhatás (Phenyl Sepharose) és gélszűrés (Sephadex G200) kombinációjával valósítottam meg. Az enzimmtisztítás során alkalmazott kromatográfiás lépéseket FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) berendezéshez (Pharmacia, Uppsala Sweeden) csatlakoztatott oszlopok segítségével valósítottam meg 4°C-on. A kromatográfiás oszlopokra a sejtfeltárás után kapott feltárt sejteket lecentrifugáltam és a kapott felülúszót vittem fel több lépésben az oszlopokra. Az ultraszűrést a fehérjék tisztítása során a kromatográfiás lépések között koncentrálásra és sóalanításra használtam. A fehérjeoldatot Amicon ultraszűrővel koncentráltam, mely vágási értéke 10 kDa volt. A mintát felülről három bar túlnyomás biztosítása mellett vittem a membránra. Az ultraszűrést jégágyon végeztem.

#### *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 enzim hőmérséklet és pH optimumának meghatározása*

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

#### *Az enzim stabilitásának meghatározása*

Az enzimstabilitását 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, amely segítségével figyelembe tudtam venni a pH és a hőmérséklet kölcsönhatását.

#### *Ionok hatása az enzimaktivitásra*

A különböző ionok hatásának vizsgálata 37°C-on 50 mM McIlvaine puffer (pH=6,5) jelenlétében enzimaktivitás mérésel történt. A alábbi vegyületeket használtam fel - AgNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> – melyeket 10 mM koncentrációban készítettem el McIlvaine pufferben (pH=6,5).

## **AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

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/100ml) 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 szénhidrát (glükóz, laktóz, raffinóz és melibióz). Mind a négy vizsgált szénhidrát megfelelő növekedési szubsztrátumnak bizonyult. A glükózt tartalmazó tápközegben a fermentáció 9. órájára a tenyészet elérte a stationer 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 tápközegben 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 tápközegben 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  $\beta$ -galaktozidos kötést tartalmazó laktóz szubsztrátumon több mint tízszeres béta-galaktozidáz aktivitást - 7,11 U/100 ml - mutattam ki a raffinóz szénhidrátan 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 tápközegben, 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás növekedését, ugyanakkor hatással van az enzimszintézis időbeni lefolyására. Különböző kémiai szerkezetű szénhidrátokkal (glükóz, laktóz, raffinóz) 2 (w/v)%-ban kiegészített TPY alaptápközegben 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  $\beta$ -galaktozidáz produktivitásai 27-29 U/10<sup>10</sup>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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -galaktozidáz produktivitás (13 U/10<sup>10</sup> sejt\*h) eléréséhez, amely maximum érték 15-20 órás fermentációnál tapasztalható.

A *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs intracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének lokalizációját vizsgálva megállapítottam, hogy az aktivitás 91%-a a citoplazmában található és csupán 9%-a volt a sejtfalhoz kötötten. Négylépéses kromatográfiás eljárással nyertem ki és tisztítottam enzimjellemzés céljából a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs eredetű  $\alpha$ -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  $\text{Co}^{2+}$ , az  $\text{Ag}^+$  és a  $\text{Hg}^{2+}$  ionok gátolták az enzim működését. A  $\text{Hg}^{2+}$  ion mintegy 75%-kal, az  $\text{Ag}^+$  72%-kal és a  $\text{Co}^{2+}$  64%-kal csökkentette az alfa-galaktozidáz aktivitását.

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

#### **Az eredmények továbbfejlesztési lehetőségei:**

- A tisztított enzim további jellemzésének megvalósítása, úgymint a kinetikai paraméterei, szubsztrátum specifitás, katalitikus mechanizmus feltárása.
- Biokonverziós kísérletek kivitelezése beleértve a hidrolízis és a transzfer reakciók kimutatását
- Optimalizálni a biokonverziós kísérletek körülményeit

## 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  $\alpha$ -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 kötötten.
4. Több kromatográfiás lépésben tisztítottam a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 törzs alfa-galaktozidáz enzimét. A homogenitásig tisztított  $\alpha$ -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  $\text{Co}^{2+}$ , az  $\text{Ag}^+$  és a  $\text{Hg}^{2+}$  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.

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

### Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

#### *Impakt faktoros folyóiratcikk*

Slačanac, V., Hardi J., Lučan, M., S. Kun, **Havas, P.**, Kristanovic, V. (2011) Effect of honey addition on fermentation activity of *Lactobacillus casei* Lc-01 in cow's and goat's milk: kinetic study. *Acta Alimentaria*, **40** (2) 270-281

**P. Havas**, Sz Kun, G. Styevkó, V. Slačanac, J. Hardi, J. Rezessy-Szabó (2014) Fruit and vegetable juice fermentation with Bifidobacteria. *Acta Alimentaria* **43**, 64-72

#### *Nem impakt faktoros folyóiratcikk*

**Havas P.**, Solymosi P., Nguyen Duc Quang, Rezessy-Szabó J. M. (2010) Probiotikus baktériumok béta-galaktozidáz enzimszintézisének tanulmányozása. *Élelmiszer Tudomány Technológia* LXIV. évf. 1 Különszám 19-20 o.

### Idegen nyelvű könyvrészlet

Quang D. Nguyen, Szilárd Kun, Erika Bujna, **Petra Havas**, Ágoston Hoschke, Judit M. Rezessy-Szabó (Inpress): Power of bifidobacteria in food applications for the health promotion. In: *Microbial Bioresources*, Eds: Vijai Kumar Gupta, Devrajan Thangdurai and Gauri Dutt Sharma. CABI, Wallingford, UK

### Magyar nyelvű könyvrészlet

**Havas Petra**, Kun Szilárd, Rezessyné Szabó Judit (2014) Pro- és prebiotikumok szerepe az egészségmegőrzésben. Természetes eredetű hatóanyagok a modern orvoslásban. *Szent István Egyetem Kiadó*, 105-109 o.

### Konferencia kiadványban megjelent teljes terjedelmű közlemények

**Petra Havas, Sz. Kun, I. Perger-Mészáros, Q. D. Nguyen, J. Rezessy-Szabó** (2011) Role of bifidobacteria in soymilk fermentation. *CHINESE–EUROPEAN cooperation for a long-term sustainability*

### Konferencia kiadványban megjelent összefoglalók

#### *Magyar nyelvű*

**Havas P.**, Solymosi P., Nguyen Duc Quang, Rezessy-Szabó J. M. (2009) Probiotikus baktériumok béta-galaktozidáz enzimszintézisének tanulmányozása. *Lippay- Ormos-Vas Tudományos Ülésszak*, 88-89o.

**Havas P.**, Till H. (2009) Kecsketej laktofermentációja *Bifidobacterium lactis* Bb-12 starterkultúrával. *XXIX. OTDK Agrártudományi szekció* 147o.

*Idegen nyelvű*

**Havas P.**, Nguyen Q. D., Rezessy-Szabó J. M. (2009) Some properties of galactosidase enzymes synthesised by probiotic bacteria *B. lactis* Bb-12. *International Scientific Conference on Nutraceuticals and Functional Foods*, 70 o.

**Havas P.**, Nguyen Duc Quang, Rezessy-Szabó J. M. (2009) Inducibility of galactosidase enzymes from *Lactobacillus acidophilus* La-5. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 163 o.

Sz. Kun, E. Bujna, **P. Havas**, J. Hardi, J. Rezessy-Szabó (2010) Fermented vegetable juices with *Bifidobacterium* strains and their antagonistic effect against enteric and pathogenic bacteria. *Power of Microbes in Industry and Environment* 98 o.

**Havas P.**, Nguyen Duc Quang, Rezessy-Szabó J. M. (2011) Purification and some biochemical properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium lactis* Bb-12. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 150o.

**P. Havas**, Sz. Kun, I. Perger-Mészáros, Q. D. Nguyen, J. Rezessy-Szabó (2011) Role of bifidobacteria in soymilk fermentation. *CHINESE–EUROPEAN cooperation for a long-term sustainability*

**P. Havas**, Sz. Kun, Cs. Kalinák, I. Tóth, J. Rezessy-Szabó (2013) Investigation of interaction between probiotic bacteria and pathogen microorganisms. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 148o.