

Szakmai zárójelentés

A $\beta(2\rightarrow1)$ kötésekkkel rendelkező oligo- illetve poliszacharidok fontos szerepet játszanak a táplálkozásban. Pozitív élettani hatásuk éppen ebben a specifikus glikozidos kötésben keresendő, mivel a humán emésztőrendszerből hiányoznak ezen kötések bontó enzimek. A kutatási munka fő célkitűzése a mikroba eredetű **inulináz** enzim termelése, előállítása és hatásmechanizmusának tanulmányozása. Az elmúlt 3 évben a kutatási programban vállalt feladatnak megfelelően a következő fontos eredményeket értük el.

Inulináz termelő törzsek szelektálása

Kutatási tárgyként 2 különböző gombát és 1 baktériumot választottunk: a *Thermomyces lanuginosus* termofil gombát és a *Kluyveromyces* élesztőt, valamint egy bélben honosított jótékony baktériumot, a *Bifidobacterium*-ot. Egyik gomba sem patogén és az általuk termelt enzimek élelmiszeripari felhasználási lehetőséggel bírnak. Megvizsgáltuk 10 *Thermomyces lanuginosus* fonalas gomba, 8 *Kluyveromyces* élesztő és 11 *Bifidobacterium* törzs inulináz enzimtermelő képességét inulint tartalmazó, illetve *Bifidobacterium* esetén TPY tápközegeken. A *T. lanuginosus* törzseknél 0,1-0,6 U/ml inulináz aktivitást mértük. Három törzs (ATCC 16455, ATCC 28083 és IMI 140524) mutatott jobb eredményt a többihez képest. A legjobb eredményt az IMI 140524 törzsnél kaptuk a fermentáció 48. órájában.

Három élesztőgomba fajt vizsgáltuk: *Kl. marxianus* (Y00959 törzs), *Kl. thermotolerans* (Y00702, Y00775, Y00715, Y00873, Y00798, Y00963 törzs) és *Kl. waltii* (Y01184 törzs). Az inulináz aktivitások 0,1-0,4 U/ml tartományban alakultak. Azt tapasztaltuk, hogy a *Kl. thermotolerans* Y00715 törzs mutatta a legnagyobb inulináz aktivitást a fermentációs közegben. Az élesztőgombáknál általában a fermentáció 24-48. órájában tapasztaltuk a maximális inulináz aktivitást.

Kutatásunkban 11 *Bifidobacterium* törzs (*B. lactis* Bb-12, *B. bifidum* B7.1, *B. bifidum* B7.2, *B. bifidum* B7.5, *B. bifidum* B8.3, *B. bifidum* B3.2, *B. longum* A1.2., *B. longum* A4.4., *B. breve* típus-törzs, *B. breve* B9.14. és *B. breve* B.10.2) inulináz enzimaktivitását határoztuk meg az extracelluláris frakcióban. A négy különböző fajhoz tartozó törzseket 50 ml TPY táplevesben, álló kultúrában, anaerob körülmények között szaporítottuk fel. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az általunk alkalmazott törzsek mindegyike szintetizál és kiválaszt inulináz enzimet. Legtöbbjük a tenyésztés 48-72 órája között mutatta a legnagyobb aktivitásokat, amelyek 0,3 U/ml és 0,45 U/ml között változtak. A *B. lactis* Bb-12 törzs kicsivel jobb aktivitást mutatott, mint a többi vizsgált *Bifidobacterium* törzs.

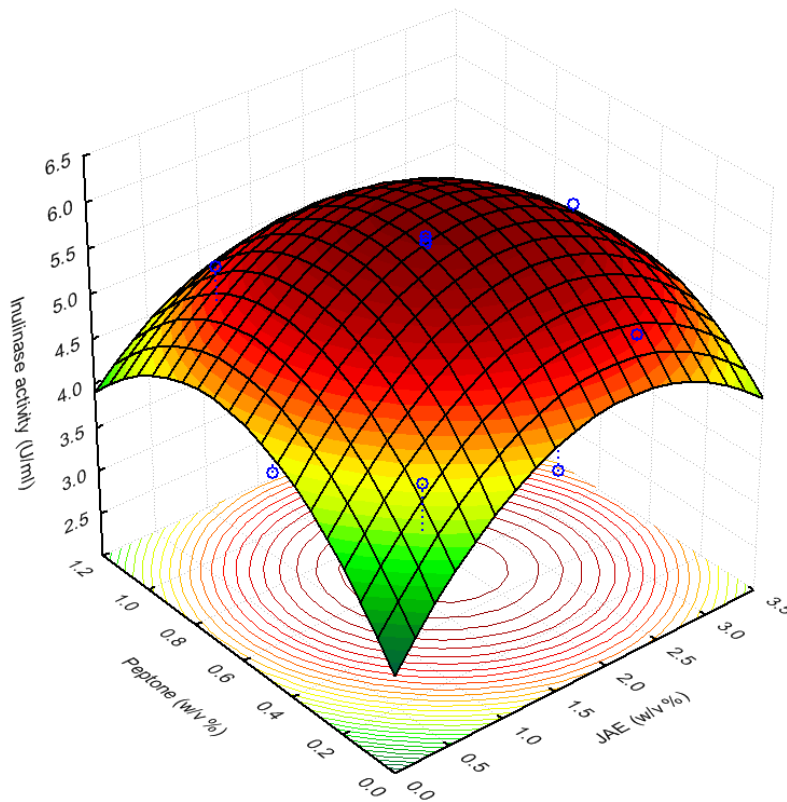
Összegezve három törzset (*T. lanuginosus* IMI 140524, a *Kl. thermotolerans* Y00715 és a *B. lactis* Bb-12) választottunk további kutatásaink tárgyává.

Tápközeg optimalizálása

A *T. lanuginosus* IMI 140524 törzs:

Megvizsgáltuk számos nitrogén és szénforrás az inulináz enzimtermelésére gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy a legjobb nitrogénforrás a pepton, a legjobb szénforrás pedig a csicsókasűrítmény volt.

A fermentációs tápközeg egyes komponenseinek mennyiségi optimalizálására kísérlettervezési módszert alkalmaztunk. A gyakorlatban központi elrendezési módszert (RSM, CCD) használtunk. 1,8 (w/v) % csicsókasűrítményt és 0,6 (w/v) % peptont találtuk az optimális szén- illetve nitrogénforrásnak. Ebben az esetben 6,15 U/ml enzim titert mértünk a fermentáció 48. órájában (**1. ábra**).



1. ábra: A csicsókasűrítmény és a pepton koncentráció hatása az inulináz aktivitásra
(*Thermomyces lanuginosus* IMI 140524 törzs)

Szintén megvizsgáltuk számos felületaktív anyag jelenlétének hatását az enzim szintézisre és megállapítottuk, hogy 1 % Tween 80 hozzáadásával 10 U/ml enzim aktivitás érhető el a fermentlében, amely másfélszeres növekedést jelent.

Javasolt fermentáció tápközeg (1 literben): csicsókasűrítmény 18 g, pepton 6g, KH_2PO_4 3 g, K_2HPO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, 10 ml tween 80 és 1 ml Vogel-féle nyomelem oldat.

A Kl. thermotolerans Y00715 törzs:

Megvizsgáltuk a különböző szénforrások (dália inulin, csicsókasűrítmény, fruktóz, glükóz, szacharóz, maltóz, keményítő, laktóz) hatását az enzim termelésére. Megállapítottuk, hogy a gomba jól szaporodott minden vizsgált szénhidrát szubsztrátumon. A legnagyobb aktivitás értékeket a dália eredetű inulin (0,769 U/ml) és a csicsókasűrítmény (0,481 U/ml) esetében értük el. Mivel a dália eredetű inulin szubsztrátum kereskedelmi ára igen magas, így a továbbiakban csicsókasűrítményt használtuk a kísérletek során. A csicsókasűrítmény széles szénhidrát spektrummal rendelkezik, valamint gazdaságosabb az előállítás, s akár mint a nyers csicsóka lé, a csicsókasűrítmény is felhasználható ipari méreteknél.

Számos nitrogénforrás (ammónium-nitrát, ammónium-foszfát, nátrium-nitrát, élesztőkivonat, malátakivonat, marhahús kivonat, disznóhús kivonat, pepton, karbamid és kukoricaekvár) hatását vizsgáltuk az inulináz aktivitásra. Fő szénforrásként pedig csicsókasűrítményt alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy a marhahús kivonat, az élesztőkivonat és a kukoricaekvár bizonyult a legjobb nitrogénforrásnak.

Kísérlettervezési módszer (RSM, CCD) alkalmazásával optimáltuk az egyes tápközeg összetétel koncentrációját. Az előző kísérletek alapján, szénforrásként csicsókasűrítményt, nitrogénforrásként élesztőkivonatot és foszforforrásként ammónium-foszfátot alkalmaztuk. Matematikai-statisztikai értékelés eredményként a következő tápközeg

összetélt tartottuk optimálisnak: csicsókasűrítvény: 1g; élesztőkivonat 0,22g; ammónium-foszfát: 0,16g; MgSO₄·7H₂O: 0,05g; desztillált vízzel 100 ml-re kiegészítve. A javasolt tápközeg alkalmazásával kb. 1,7 U/ml enzimaktivitás értéket mértük. Megvizsgáltam néhány felületaktív anyag hatását az enzim kiválasztásra nézve. A kísérlet során a kontroll esetében az enzimaktivitás 1,86 U/ml volt, míg 1 % SDS illetve 1 % Tween80 felületaktív anyaggal történő kiegészítéssel csupán 0,703 U/ml, valamint 0,415 U/ml enzimaktivitást mértük. A triton X-100 adagolása nem mutatott jelentős különbséget a kontrollhoz képest. Összefoglalva megállapítható, hogy a felületaktív anyagok hozzáadása a tápközeghez nem eredményezett magasabb enzimhozamot.

Léptéknövelési kísérletek és a fermentációs körülmények optimalizálása

A sikeres rázatott lombikos kísérletek megvalósítása után léptéknövelési kísérleteket hajtottunk végre 2 literes laboratóriumi fermentorban, melyben mind az élesztő, mind a fonalas gomba esetén a fermentáció 24-48. órája között mérhető a maximális inulináz aktivitás.

Megvizsgáltuk a tápközeg pH-jának a hatását a *T. lanuginosus* szaporodására és enzimtermelésére. Megállapítottuk, hogy a szigorúan szabályozott pH nem eredményezett jó/jobbinulináz enzimtermelést. Ezzel szemben, a tápközeg kezdeti pH-jának 6,5-re történő beállításával (50 mM foszfát puffer) szignifikáns pozitív hatás érhető el.

A rázatott kísérleteknél kapott előzetes eredmények alapján a fermentorban megvalósított kísérleteknél is optimalizáltuk az inokulum korának és mennyiségének hatását az inulináz termelésére. Megállapítottuk, hogy a *T. lanuginosus* termofil gomba esetén 40 órás, amíg a *Kl. thermotolerans* esetén a 18 órás inokulum bizonyult a legmegfelelőbbnek. Az élesztőgomba esetén 7,5 v/v % inokulummal indított fermentációval, a termofil fonalagombánál pedig 5 v/v % inokulum mennyiséggel értük el a legjobb enzimtermelést.

Tapasztalatunk szerint az aktív levegőztetési és keverési rendszereknél másként viselkedik a gomba, mint a passzív (rázatott) rendszereknél, ezért megvizsgáltuk a keverési sebesség és a levegőztetéshatását az inulináz aktivitására. A nagy sebességű keverés a gombafonalak törését okozhatja, mely befolyásolja a gomba szaporodását és az enzim szintézisét. Megállapítottuk, hogy a levegőztetés mértéke *T. lanuginosus* esetén 0,75 l/min, a *Kl. thermotolerans* esetén pedig 1 l/min bizonyult optimálisnak.

Enzimfehérje tisztítása és jellemzése

A fermentléből először centrifugával eltávolítottuk a gomba micéliumot (*T. lanuginosus*) vagy sejtet (*Kl. thermotolerans*), majd ammónium-szulfáttal kicsaptuk az enzimfehérjét. Az enzim tisztítására FPLC rendszerhez csatlakoztatott különböző kromatográfiás (DEAE-Sepharose, Q-Sepharose és Phenyl-Sepharose) technikát alkalmaztunk. Az enzimfehérje homogenitását SDS-PAGE segítségével ellenőriztük.

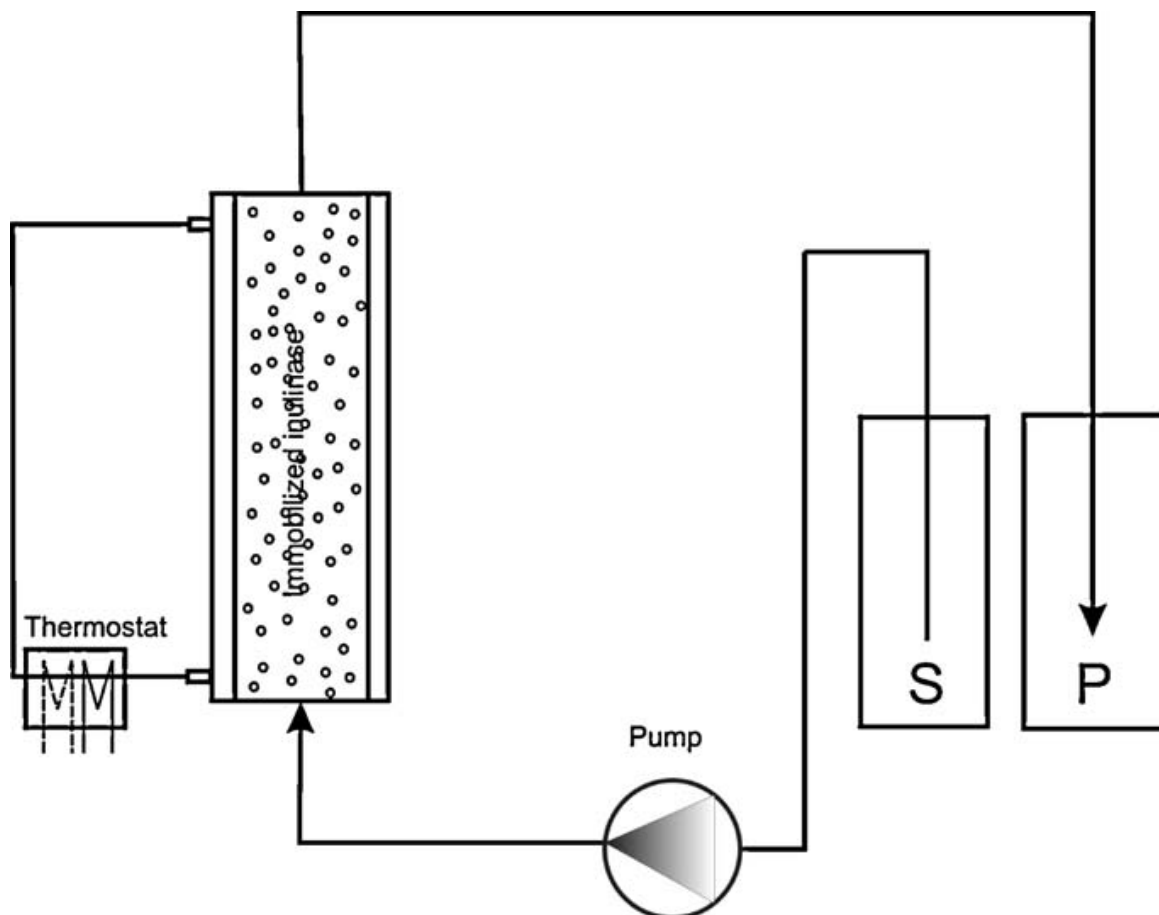
A *Kl. thermotolerans* eredetű inulináz esetén 24 % kitermelést értem el 53-szoros tisztulási faktor mellett. Meghatároztuk a *Kl. thermotolerans* eredetű inulináz optimális működési feltételeit: pH 5,0-5,5 tartományba esett, az optimális hőmérséklet pedig 40 °C volt. A tisztított enzim stabilnak bizonyult 50°C-on is pH 4,5–7,0 tartományban. A megvizsgált ionok közül a Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Na⁺ és K⁺ serkenti az enzim aktivitását, míg a Fe²⁺, Fe³⁺, Co⁺, Ag⁺ erősen gátolja az enzim működését. A kinetikai paraméterek dália inulin szubsztrátum esetén: Km=26,8 mg/ml és V_{max}=0,01 mg/ml/min. A felszabadított termékeket analizálva megállapítottuk, hogy az általunk tisztított inulináz endo-hatású.

Meghatároztuk a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 által termelt inulináz enzim hőmérséklet

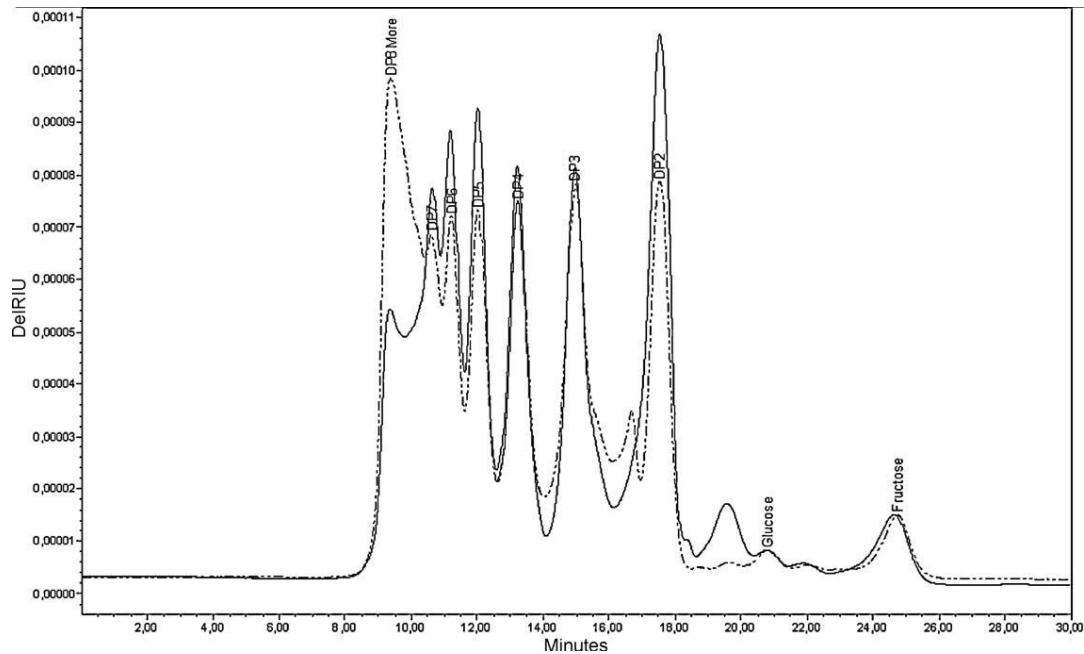
és pH optimumát. Megállapítottuk, hogy az inulináz hőmérséklet optimuma 45 C, pH optimuma pedig pH=5,0 illetve pH=7,0 volt.

Az enzim rögzítése és a biokonverzió megvalósítása

Az irodalmi adatokat, az élelmiszeripari alkalmazhatóságot, a technológiai sajátosságokat és a gazdaságosságot figyelembe véve az inulináz rögzítésére glutáraldehydes kovalens rögzítési módszert és állati eredetű (rákpáncél) hordozót, a kitint alkalmaztuk. A kutatásunk során alkalmazott endo-inulináz készítménynél 66 % aktivitást sikerült visszanyerni a rögzítés után, amely jónak mondható.



2. ábra: Folytonos oligofruktóz termelő rendszer (rögzített inulináz enzimes bioreaktor) sematikus ábrázolása



3. ábra: A folytonos rögzített enzim bioreaktorban megvalósított csicsókasűrítmény hidrolízisének kromatogramja
(szaggatott vonal: csicsókasűrítmény, folytonos vonal: hidrolizátum)

Meghatároztuk az *A. niger* eredetű rögzített endo-inulináz készítmény optimális pH (6,0) és hőmérsékletét (65 °C), valamint kinetikai paramétereiket ($K_m=2,19$ w/v % és $V_{max}=291,58$ U/g). A rögzített enzim felezési ideje 48 nap volt. Bebizonyítottuk, hogy az enzim rögzítésével növelhető a hőstabilitás.

A biokonverzió modellezése során mind a *Kl. thermotolerans*, mind a kereskedelmi *A. niger* eredetű endo-inulázokat használtuk - szabad és rögzített enzimekkel - frukto-oligoszacharidok előállítására. Szubsztrátumként dália eredetű inulint és csicsókasűrítményt alkalmaztunk.

Megterveztük, felépítettük és bebizonyítottuk, hogy a 25 ml-es töltött ágyas bioreaktor (2. ábra) segítségével folytonos, oligoszacharidokban gazdag termék (3. ábra) állítható elő laboratóriumi körülmények között.

Mind a *T. lanuginosus* termofil gomba, mind a *Kl. thermotolerans* élesztő termelt extracelluláris inulináz enzimet a megfelelő tápközegen. Az inulináz enzim alkalmazásával az inulin részleges vagy teljes biokonverziója révén frukto-oligoszacharidok vagy fruktóz szirup állítható elő, amely fontos szerepet játszik az élelmiszer és gyógyászati iparban is.