



Néhány hidroláz, az α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-
metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazhatóságának
vizsgálata

BALOGH TERÉZ
PHD ÉRTEKEZÉS

Alkalmazott Kémia Tanszék
Budapest, 2004

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fekete András**
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: **Dr. Kosáry Judit**
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
RÖVIDÍTÉSEK	7
1 BEVEZETÉS	9
1.1 Az enzimek élelmiszeripari alkalmazásának kialakulása	9
1.2 Célkitűzések	12
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
2.1 A hidrolázok rövid jellemzése	13
2.2 Glükózidázok	13
2.2.1 A β -glükózidáz (EC 3.2.1.21)	14
2.2.1.1 A β -glükózidáz aktivitásmérése	16
2.2.1.2 A β -glükózidáz izolálása és tisztítása	17
2.2.2 Az α -glükózidáz (EC 3.2.1.20)	18
2.2.2.1 Az α -glükózidáz aktivitásmérése	19
2.2.2.2 Az α -glükózidáz izolálása és tisztítása	19
2.3 A pektin-metil-észteráz	19
2.3.1 A pektin molekula szerkezete	19
2.3.2 A pektinek lebomlása	20
2.3.2.1 A pektinbontást katalizáló enzimek családja és hatásmechanizmusuk	21
2.3.2.2 A pektin-metil-észteráz működése	23
2.3.2.3 A pektin-metil-észteráz aktivitásmérése	25
2.3.2.4 A pektin-metil-észteráz izolálása és tisztítása	25
2.4 Az enzimek rögzítése	27
2.4.1 A glükózidázok rögzítése	28
2.4.1.1 Akrix C-100 típusú rögzítőszer alkalmazása	29
2.4.1.2 A felületi réteg típusú hordozó alkalmazása	30
2.4.2 A pektin-metil-észteráz rögzítése	31
2.5 A hidrolázok élelmiszeripari vonatkozásai	31
2.5.1 A glükózidázok élelmiszeripari felhasználása	32
2.5.1.1 Az α - és β -glükózidáz hidrolitikus alkalmazása az élelmiszeriparban	32
2.5.1.2 Az α - és β -glükózidáz hidrolitikus alkalmazása borászatban	33
2.5.2 A pektin-metil-észteráz élelmiszeripari jelentősége	37
2.5.3 Élelmiszertartósítási eljárások	39
2.5.3.1 Hőkezeléses élelmiszer tartósítás	40
2.5.3.2 Alternatív élelmiszervezelési eljárások	40
2.5.3.3 A nagynyomású (HP) technika	41
2.6 A hidroláz enzimek preparatív célú alkalmazása	44
2.6.1 A glükózidázok preparatív alkalmazása, <i>O</i> -glükozidok szintézise	45
2.6.1.1 A <i>O</i> -glükozidok előállítása transzglykozilezéssel	46
2.6.1.2 A <i>O</i> -glükozidok előállítása reverz hidrolízissel	47
2.6.2 A pektin-metil-észteráz reverz hidrolitikus felhasználása	50
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	51
3.1 A kísérletek helye és azok műszerezettsége	51
3.1.1 A kísérletek helye	51
3.1.2 A kísérletek helyének műszerezettsége	51

3.1.2.1	Belgiumi berendezések	51
3.1.2.2	Magyarországi berendezések	51
3.2	A natív α - és β -glükózidáz	52
3.2.1	A glükózidázok vizsgálatához alkalmazott vegyszerek	52
3.2.2	A glükóz tartalom meghatározása	53
3.2.2.1	A glükóz koncentráció meghatározása DINISA módszerrel	53
3.2.2.2	A glükóztartalom meghatározása módosított enzim módszerrel	53
3.2.3	Az <i>o</i> -alkil-glükózidok koncentrációjának közvetlen meghatározása HPTLC módszerrel	54
3.2.4	A natív α - és β -glükózidáz vizsgálata	54
3.2.4.1	A natív glükózidázok aktivitásmérése	54
3.2.4.2	A natív α - és β -glükózidáz stabilitásának vizsgálata a reverz hidolitikus folyamatok során	55
3.2.4.3	Növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok α - és β -glükózidáz aktivitásának vizsgálata	55
3.3	A natív pektin-metil-észteráz	55
3.3.1	A pektin-metil-észteráz vizsgálatához alkalmazott vegyszerek	55
3.3.2	Különböző növényi kivonatok készítése pektin-metil-észteráz aktivitás vizsgálatok céljából	56
3.3.2.1	Sárgarépából készített kivonat a natív sárgarépa PME kinetikai vizsgálatához	56
3.3.2.2	A hőkezelt, szeletelt sárgarépából készült kivonatok pektin-metil-észteráz aktivitás méréshez	57
3.3.2.3	Pektin-metil-észteráz izolálása a nagynyomással kezelt szeletelt sárgarépából	57
3.3.2.4	Néhány növényi eredetű élelmiszeripari alapanyag pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálata	57
3.3.3	A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz inaktiválódásának vizsgálata	58
3.3.3.1	A pektin-metil-észteráz aktivitásmérése	58
3.3.3.2	A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz hőinaktiválása	59
3.3.3.3	A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz inaktiválása nagynyomással	59
3.4	Az α - és β -glükózidáz rögzítése	60
3.4.1	A glükózidázok rögzítése Akrilex C-100 típusú hordozóra	60
3.4.2	A β -glükózidáz rögzítése felületi rétegre glutáraldehides keresztkötések kialakításával	60
3.4.3	A felületi rétegre rögzített β -glükózidáz kalcium-alginát gyöngyökbe zárása	61
3.4.4	Az Akrilex C-100 típusú hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz aktivitásának meghatározása, illetve azonnali és inkubálási inaktiválódásának vizsgálata a reverz hidrolízis körülményei között	61
3.5	Az α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazásának modellezési kísérletei	62
3.5.1	A rögzített β -glükózidáz készítmények tesztelése a borok aromaprofiljának módosítására	62
3.5.1.1	A borok kezelése rögzített β -glükózidáz készítményekkel	62
3.5.1.2	Az aromaanyagok extrakciója a rögzített β -glükózidáz készítményekkel kezelt borokból	62
3.5.1.3	Gázkromatográfiás bor aroma komponens analízis	62
3.5.2	Pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazásának modellezése	63

3.5.2.1	A szeletelt sárgarépa PME tartalmának hőinaktiválása	63
3.5.2.2	A szeletelt sárgarépaiban lévő PME inaktiválása nagynyomással	63
3.5.3	Hőkezelési kísérletek egyes növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagokban	64
3.6	A felületaktív <i>o</i> -glükózidok szintézise α - és β -glükózidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal	64
3.6.1	Közös reakcióelegy a natív, illetve az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - vagy β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának és az <i>o</i> -glükózidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének vizsgálatára	64
3.6.1.1	Közös reakcióelegy a natív α - vagy β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának és az <i>o</i> -glükózidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének vizsgálatára	64
3.6.1.2	Közös reakcióelegy az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - vagy β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának és az <i>o</i> -glükózidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének vizsgálatára	65
3.6.1.3	Az <i>o</i> -helyettesített- β -D-glükopiranozidok preparatív léptékű szintézise reverz hidrolízissel	65
3.6.1.4	A preparatív léptékű reverz hidrolízissel előállított <i>o</i> -glükózidok szerkezetazonosítása	66
4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS	67
4.1	A natív α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz vizsgálata	67
4.1.1	A reakcióelegyek glükózkoncentrációjának, illetve <i>o</i> -glükózid tartalmának meghatározása	67
4.1.2	A natív α - és β -glükózidáz vizsgálata	68
4.1.2.1	A natív glükózidázok stabilitásának vizsgálata	69
4.1.3	A natív pektin-metil-észteráz vizsgálata	72
4.1.3.1	A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz enzimkinetikai állandói	72
4.1.3.2	A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz enzimkinetikai adatainak elemzési módszere	73
4.1.3.3	A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz hőinaktiválódása	74
4.1.3.4	A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz nagynyomás hatására bekövetkező inaktiválódásának kinetikája	76
4.2	Az α - és β -glükózidáz rögzítése	79
4.2.1	Az α - és β -glükózidáz rögzítése Akrilex C-100 hordozóra	79
4.2.2	A β -glükózidáz rögzítése felületi rétegre	79
4.2.3	A felületi réteghez kötött β -glükózidáz kalcium-alginát gyöngyökbe zárása	81
4.2.4	Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz aktivitásának meghatározása, illetve azonnali inaktiválódásának vizsgálata	81
4.3	Az α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazhatóságának modellezése	84
4.3.1	Rögzített β -glükózidáz készítmények tesztelése borok aromaprofiljának módosítására	84
4.3.1.1	Alkohol tartalom hatása a β -glükózidáz aktivitására	84
4.3.1.2	Dekantálási vizsgálatok	85
4.3.1.3	A borok kiválasztása	85
4.3.1.4	A borok kezelése rögzített β -glükózidáz készítményekkel	85
4.3.2	A sárgarépaiból készült élelmiszeripari készítmények minőségjavítása a pektin-metil-észteráz tartalom csökkentésével	86

4.3.2.1	Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben lévő pektin-metil-észteráz hőinaktiválása.....	87
4.3.2.2	A szeletelt sárgarépában lévő pektin-metil-észteráz hőinaktiválása.....	88
4.3.2.3	Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben lévő pektin-metil-észteráz nagynyomású kezelése.....	89
4.3.2.4	A szeletelt sárgarépa pektin-metil-észteráz nagynyomású inaktiválása.....	89
4.3.3	Az élelmiszeriparban alkalmazott növényi eredetű alapanyagok saját α - és β -glükózidáz, illetve pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálata.....	90
4.3.3.1	A különböző célokra szolgáló növényi kivonatok készítésének egységesítése.....	91
4.3.3.2	A hazai primőr sárgarépa (<i>Daucus carota</i>) vizsgálata.....	92
4.3.3.3	A brokkoli (<i>Brassica oleracea convar. Botrytis provar. Italica</i>) előfőzési kísérletei.....	93
4.3.3.4	A karfiol (<i>Brassica cretica</i>) β -glükózidáz és pektin-metil-észteráz aktivitása.....	95
4.3.3.5	A mandula (<i>Amygdalus communis</i>) hidroláz enzimkészletének vizsgálata.....	95
4.3.3.6	A borkészítésre kiválasztott szőlők (<i>Vitis vinifera</i>) β -glükózidáz és pektin-metil-észteráz aktivitása.....	96
4.4	A felületaktív <i>o</i> -glükózidok szintézise α - és β -glükózidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal.....	97
4.4.1	Az α - és β -glükózidáz inkubálási inaktiválódása.....	97
4.4.2	Az α - és β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának kinetikai elemzése.....	100
4.4.3	Az <i>o</i> -glükózidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének optimalizálása.....	103
4.4.3.1	A reakciókörülmények kiválasztásának szempontjai.....	104
4.4.3.2	Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz katalizálta, kisléptékű reverz hidrolitikus reakciók optimalizált eredményei.....	106
4.4.3.3	A natív β -glükózidáz katalizálta, kisléptékű reverz hidrolitikus reakciók optimalizált eredményei.....	108
4.4.3.4	Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz katalizálta, kisléptékű reverz hidrolitikus reakciók optimalizált eredményei.....	109
4.4.4	Az <i>o</i> -helyettesített- β -D-glükopiranozidok preparatív léptékű szintézise reverz hidrolízissel.....	110
5	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	113
	ÖSSZEFOGLALÁS.....	115
	SUMMARY.....	116
	I. MELLÉKLET (IRODALOMJEGYZÉK).....	117
	II. MELLÉKLET (A β -GLÜKOZIDÁZ SZERKEZETE).....	126
	III. MELLÉKLET (AZ α -GLÜKOZIDÁZ SZERKEZETE).....	127
	IV. MELLÉKLET (A SÁRGARÉPA PME HÁROMDIMENZIÓS KÉPE).....	128
	V. MELLÉKLET.....	129
	AZ S-LAYER SZERKEZETE.....	129
	VI. MELLÉKLET (A PME VIZSGÁLATA SORÁN ALKALMAZOTT BERENDEZÉSEK).....	130
	VII. MELLÉKLET (A REVERZ HIDROLÍZISRE ALKALMAZOTT OLDÓSZEREK TULAJDONSÁGAI).....	131
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	132

RÖVIDÍTÉSEK

Rövidítés	Magyar megfelelő	Eredeti angol összetétel
A_0	Kezdeti enzim aktivitás, ml min ⁻¹	
A	Enzim aktivitás t időben, ml min ⁻¹	
a_w	Vízaktivitás	
D	Tizedelődési idő, min	
DAE	Diacetoxi-etán (etilénglikol-diacetát)	
DINISA	A redukáló cukor tartalmat meghatározó dinitro-szalicilsavas módszer	
DMSO-d ₆	Teljesen deuterizált dimetil-szulfoxid	
FPLC	Gyors fehérte folyadékromatográfia	Fast Protein Liquid Chromatography
FWO	Flamand Alapítvány a Tudományos Kutatásért	Fund for Scientific Reserch – Flandres
GC-MS	Gázkromatográfiával összekapcsolt tömegspektrometria	Gas Cromathopgraphy & Mass Spectrometry
¹ H-NMR	Proton mágneses rezonancia spektrum	
HP	Nagynyomás	High-pressure
HPP	Nagy nyomású technika	High-pressure processing
HPTLC	Nagy hatékonyságú vékonyrétegekromatográfia	High Performance Thin Layer Cromathography
k	Enzim inkativálódás konstansa, 10 ⁻³ h ⁻¹	
K_M	Michaelis-Menten féle reakciósebességi állandó, mg ml ⁻¹	
Natív glükozidáz	Kereskedelmi forgalomban kapható, liofilezett por formájú enzim	
Natív pektin-metil-észteráz	Izolált, tisztított enzim (jelen esetben sárgarépbából)	
ND	Nem detektálható mennyiség	
P	Nyomás, Mpa	Pressure
page	poliakrilamid gélelektroforézis	Polyacrylamide Gel electrophoresis
PEG	Polietilén-glikol	
PME	Pektin-metil-észteráz enzim (EC.3.1.1.11)	
PNPG	p-Nitro-fenil- β -D-glükopiranozid	
R_f	Retenciófaktor	
SDS	Na-dodecil-szulfát	Sodium Dodecyl Sulphate
S-layer	Felületi réteg	Surface-layer
T	Hőmérséklet, °C	
t	Idő, min	
TMS	Belső standard az ¹ H-NMR-hez	
TRA	Triacetin (Glicerol-triacetát)	
TRISZ	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán	
Triton X-100	Helyettesített polietilén-glikol (fantázia név)	
V_{max}	Maximális sebesség, ml min ⁻¹	
z_p	z -Érték konstans hőmérsékleten, MPa	
z_T	z -Érték konstans nyomáson, °C	

1 BEVEZETÉS

1.1 Az enzimek élelmiszeripari alkalmazásának kialakulása

A természetben fellelhető enzimeket az régóta használják élelmiszer előállításra, például sajt-, kovász-, sör-, bor- és ecetkészítés esetében. Az élet más területein is kihasználták az enzimek nyújtotta lehetőségeket őseink (pl. bőrkészítés, len megmunkálás, indigó előállítás). Azonban csak a múlt század végén tudtak a fermentációs technológiák fejlődésének következtében viszonylag tiszta enzimek készítményeket ipari méretben előállítani. Ez az eredmény tette lehetővé az enzimek ipari méretekben való felhasználását a textil-, detergens-, valamint az élelmiszeripar számára. Az enzimek tudományosan megalapozott technológiai felhasználása 1984-ben kezdődött a takadiasztáz alkalmazásával az Egyesült Államokban, de Németországban már 1915-ben adtak enzimadalékot a mosószerkehez. Az elmúlt négy évtizedben az enzimológia és a biotechnológia tudománya egymást támogatva fejlődött. A géntechnológiák és a fehérjemérnökség fejlődésével új dimenziók nyíltak meg az enzimizipar számára [CRUEGER & CRUEGER, 1987].

Jelenleg az iparban használt enzimek túlnyomó többségbe a 3. enzimosztályba (hidrolázok) tartozik, ennek értelmében szerepük különböző biomolekulák hidrolitikus lebontása. A proteázokat kiterjedten alkalmazzák a detergensiparban, mosószeriparban, húsiparban, tejiparban, stb. A második legnagyobb csoportba a szénhidrátbontó enzimek tartoznak – főként az amilázok és a cellulázok – mivel a keményítő-, textil-, üzemanyag-, sütő- és detergens ipar jelentős mennyiségben alkalmazza azokat. Az élelmiszeriparban, a legnagyobb mértékben felhasznált enzimek a proteáz, lipáz (sajtgyártásban), laktáz (tejiparban), pektin-metil-észteráz (gyümölcs alapanyagok puhításához, lényéréshez és derítéshez), pektináz, transzglutamináz.

A modern élelmiszeriparban tehát jelentős szerep jut az enzimeknek, mivel széles körben, sokrétű feladatmegoldásra alkalmazzák őket. Az élelmiszeriparral ezért szinte párhuzamosan fejlődött az enzimizipar és az azt kiszolgáló enzimkutató. Egyre újabb és újabb termékek jelennek meg. Enzimek alkalmazásakor egy gyártási technológia során sok zavaró tényező léphet fel, ezeket ki kell küszöbölni. Az enzimek fehérje jellegükből adódóan hő, pH és só-érzékenyek, így stabilitásukról és a működési paraméterek optimalásáról is gondoskodni kell. Problémát jelenthet az is, hogy az enzimek önmaguk is szennyezést jelenthetnek az élelmiszerben, amennyiben

eltávolításuk nem megoldható. A rögzített enzimek megjelenésével a stabilitás, valamint az újrafelhasználhatóság és a könnyű eltávolítás kérdése megoldható és ebből kifolyólag a költségek is jelentősen csökkenhetnek.

Az élelmiszer feldolgozás során más, enzimekkel kapcsolatos problémák is felmerülhetnek. Ugyanis az élelmiszer alapanyagok maguk is élő szervezetekből származnak, saját enzim készletük egy része aktív maradhat és ezek inaktiválása szükséges lehet. A zöldségek és gyümölcsök tárolás, raktározás, szállítás alatt végbemenő romlási folyamatai nagy problémát jelentenek az élelmiszeripar számára. Ezek a nem kívánatos változások általában enzimek által katalizált folyamatok. Hagyományos élelmiszeripari technológiákban ezt a problémát hőkezeléssel oldották meg, amely nemcsak a csírátlanítás elvégzésére volt hivatott, hanem a hőérzékeny és nem kívánatos enzimek inaktiválására is, ugyanakkor ezen eljárások során számos, az élelmiszerek minőségét befolyásoló tényező is megváltozhat.

Az új fogyasztói igények megjelenése miatt azonban az élelmiszerek minőségével szemben támasztott elvárások jelentős mértékben megváltoztak. Fontos szempont az élelmiszerek megítélése során, hogy aránylag kis számú és kíméletes feldolgozási lépésen keresztül jutva, – az eredeti tulajdonságok, úgymint íz, illat, konzisztencia, tápérték megtartásával – kerüljenek a fogyasztókhoz. A hagyományos élelmiszertechnológiai eljárások azonban, ahol az élelmiszereket magas hőmérsékleten, valamint tartósítószerrel hozzáadásával kezelik, ezeknek az elvárásoknak nem felelnek meg. Ezen igények kielégítésére új eljárásokat, kíméletesebb feldolgozási módszereket alakítottak ki. Ilyen technikák a nagynyomású technika, a pulzáló elektromos mezőt alkalmazó technika, stb.

Doktoranduszi kutatómunkám célja néhány, az élelmiszeriparban fontos szerepet betöltő hidroláz enzim, közelebbről az α - és β -glükozidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazhatóságának modellezése volt egyes folyamatokban. Ahhoz, hogy ilyen jellegű modellezési kísérleteket végezhessek, a vizsgálandó enzimek viselkedését a modellrendszerek tervezett körülményei között tesztelnem kellett. Modellként mind a glükozidázokra, mind a pektin-metil-észterázra egy-egy jellegzetes élelmiszeripari példát választottam, a glükozidázokra a borok aromaprofiljának módosítását, a pektin-metil-észterázra pedig a zöldségek közül elsősorban a sárgarépa készítmények minőségjavítását a PME inaktiválásával.

A glükóz alifás alkoholokkal képzett *O*-glükozidjai a nem ionos, felületaktív anyagok egyik nagyon fontos csoportját képezik, amelyek ráadásul nem toxikusak és biológiailag lebonthatók. Mivel közülük néhányat nemcsak a gyógyszeriparban, hanem az élelmiszeriparban is

sikeresen alkalmazzák detergensként, ezért szintézisük glükózidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal élelmiszeripari jellegűnek is tekinthető. Ezért doktoranduszi kutatómunkám céljának tekintettem a felületaktív *O*-glükózidok glükózidázok katalizálta olyan reverz hidrolitikus szintézisének kidolgozását is, amely lehetővé teszi korábban eddig ilyen módon nem szintetizálható *O*-glükózidok előállítását akár preparatív léptékben is.

A fenti célok érdekében részletesen kellett tanulmányoznom a natív α - és β -glükózidáz, valamint egyes rögzített formáinak felhasználhatóságát (stabilitását és reverz hidrolitikus hajlandóságát) a reverz hidrolízishez szükséges szerves oldószeres közegekben. Ugyancsak vizsgálnom kellett egyes rögzített β -glükózidáz készítmények alkalmazhatóságát a borkezelés körülményei között. A sárgarépbából izolált natív pektin-metil-észteráz hőinaktiválási kinetikája, valamint a nagynyomás hatására bekövetkező viselkedése a különböző répakészítmények minőségjavító kezelésének paramétereire vonatkozó információkat szolgáltatott.

A témaválasztásomban és célkitűzéseimben számos tényező játszott szerepet. A reverz hidrolitikus folyamatok tanulmányozására sarkallt az a kiterjedt kutatómunka, amelyet a korábbi tíz évben az Alkalmazott Kémia Tanszéken ezzel kapcsolatban folytattak különböző pályázatok keretében:

- OTKA I/3 (1991-94) *Műveleti paraméterek hatásának vizsgálata többfázisú bioreaktorban enzimatikus peptidszintézis megvalósítása során*, Dr. Sisak Csaba témavezető;
- OTKA I/5 (1993-96) *Alkil-glikozidok enzimes szintézise reverz-hidrolitikus folyamatokkal*, Dr. Kosáry Judit témavezető;
- OTKA I/7 (1995-98) *Enzimkinetikai paraméterek és fehérjestabilitás vizsgálatok nem vizes közegben*, Dr. Boross László témavezető;
- 3. Copernicus Joint research Project: ERBCIPA 923011 (1993-1997) *Synthesis of flavour esters by extractive bicatalysis reactor systems*; Dr. Boross László témavezető.

A reverz hidrolízissel kapcsolatos kutatásom az alábbi nemzetközi kutatás része: Cost Action D25 (2002-2006) *Applied Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions Catalysed by Enzymes* pályázat, az altéma vezetői Dr. Kosáry Judit és Dr. Boross László.

A 2002. naptári évet Marie Curie ösztöndíjasként az alábbi kutatóhelyen töltöttem: Leuveni Katolikus Egyetem, Élelmiszermikrobiológia és Élelmiszertechnológia Tanszékén Belgium. Itt egy a pektin-metil-észterázzal kapcsolatos EU és FWO által támogatott kutatásba kapcsolódtam bele (QLK1-CT-2000-60014, Dr. Marc Hendrickx témavezető).

1.2 Célkitűzések

A hidrolázok közül az α - és a β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz vizsgálatát terveztem. A Tanszék korábbi eredményeire is alapozva az alábbi konkrét célokat tűztem ki:

- Az élelmiszeripari alapanyagok közül felületaktív, *o*-alkil-glükózidok szintézisét terveztem reverz hidrolízissel, azaz glükózból és hidroxil-vegyületből, szerves oldószerben végrehajtott kapcsolási reakcióval. A korábbi tapasztalatokra alapozva mind az α -, mind a β -glükózidáz alkalmazhatóságát kívántam vizsgálni és célul tűztem ki olyan új, preparatív szintézis kidolgozását, amely az alkalmazható hidroxil-vegyületek körét az eddigiekhez képest nagymértékben tágítja.
- A glükózidázok élelmiszerre vonatkozó minőség javító hatását a borok aromapotenciáljának növelésével kívántam vizsgálni.
- A kitűzött feladataimhoz új glükózidáz preparátum előállítását terveztem egy eddig kevésbé ismert hordozó, a felületi réteg (surface-layer, azaz S-layer) bevezetésével.
- A pektin-metil-észteráz segítségével az élelmiszerekben minőségrontó hidroláz hatást kívántam vizsgálni, a gyümölcs- és zöldséglevelekben a pektin-metil-észteráz aktivitás ugyanis nem kívánatos. Célul tűztem ki a natív sárgarépa PME stabilitási vizsgálatának tapasztalatait, figyelembe véve a sárgarépából készült termékekben az enzim inaktiválhatóságának tanulmányozását.
- Az élelmiszeriparban alkalmazott növényi eredetű alapanyagok gazdag, saját enzimkészletének vizsgálata számos információval szolgálhat. Ezen vizsgálatok alapján nemcsak jelenlegi állapotokra és eltarthatóságukra lehet következtetni, hanem más növényi jellemzőkre is. A Tanszéken folyamatban lévő, ezzel kapcsolatos kutatásba (*Növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok tárolásának vizsgálata biokémiai módszerekkel*, témavezető Dr. Kosáry Judit) bekapcsolódva kívántam felhasználni a glükózidázokkal és a pektin-metil-észterázzal kapcsolatos tapasztalataimat.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A hidrolázok rövid jellemzése

A harmadik enzimosztályba tartozó hidrolázok a szubsztrát molekulát víz molekula segítségével hasítják ketté. Tulajdonképpen transzfert végeznek: a víz molekula hidroxil csoportját a szubsztrát molekulára viszik át, míg a víz protonja a szubsztrát másik részére kerül. A biopolimerek lebontásának első lépése a hidrolízis. A fehérjékben lévő peptidkötések lebontásáért a proteázok, a poliszacharidokban lévő glikozidos kötések lebontásáért az glikozidázok, míg a trigliceridekben lévő észterkötések lebontásáért az észterázok csoportjába tartozó lipázok felelősek [WIESMAN, 1975].

Az első ipari enzimek a keményítőt hidrolizáló enzimek, azaz az amilázok, valamint az ugyancsak a szénhidrátok bontásában szerepet játszó invertáz enzim, ezen kívül a proteázok voltak. Az 1945-1970 terjedő időszakban újabb enzimeket kezdtek ipari szinten alkalmazni (pl. celluláz, lipáz, glükóz-oxidáz, stb). Az 1970-től napjainkig terjedő időszakban további enzimek terjedtek még el az ipari használatban: pullulanáz, hemicelluláz, penicillin aciláz, dextranáz, lignináz, laktáz, stb. Az iparban alkalmazott enzimek javarészt a hidrolázok csoportjába tartoznak. A hidroláz enzimeket elterjedten alkalmazzák más iparágakban, a legjellemzőbb felhasználási területek: a mezőgazdaság (pl. mezőgazdasági nyersanyagok hidrolázok segítségével végzett biokonverziója), a gyógyszeripar (pl. a különböző szteroid transzformációk), a szerves vegyipar (pl. a szennyvízkezelés, bioszenzorok), stb. [CRUEGER & CRUEGER, 1987].

2.2 Glükózidázok

A *glikozidázok* szénhidrátok hidrolízisére szolgálnak, *O*-, *N*- és *S*-glikozid szerkezetű szubsztrátokat hidrolizálnak. A karbohidrolázok az egyszerű cukrokból felépített összetett szénhidrátokat hidrolizálják. Az általuk megtámadott kötés az a glikozidos kötés, mely az egyszerű cukorrészeket kapcsolja össze. A szénhidrát bontó enzimeken belül megkülönböztetünk heterozidázokat, amelyek nem szénhidrát aglikon tartalmú glikozidokat is képesek bontani, valamint holozidázokat, amelyek kizárólag szénhidrátok tartalmozó glikozidok bontására specializálódtak. A glikozidázokat aszerint

is csoportosíthatjuk, hogy az általuk katalizált reakció során megtartják-e, vagy izomerizálják az anomer hely konfigurációját. Például a β -galaktozidáz, invertáz és lizozim invertáló enzimek, míg a trehaláz és β -amiláz nem változtatják meg az anomer hely konfigurációját, tehát úgynevezett „megtartó glikozidázok” [VAN RANTWIJK et al., 1999].

A *glükozidázok* olyan holozidáz enzimek, melyek glükóz polimerek hidrolízisét hajtják végre. Általában a holozidáz enzimekkel is lehet heterozidokat bontani, ezt a tulajdonságukat az iparban használják ki. Számtalan holozid típusú szénhidrát bontó enzimet használnak az élelmiszeriparban, például α -, β - és glükóamilázt.

A glükozidok a természetben szinte mindenütt jelen vannak. Legelterjedtebbek a növényvilágban, ahol alkoholok, fenolok és merkaptánok fordulnak elő glükozidos kötésben. Ilyen glikozidok képezik például a gyümölcsökben az aromavegyületek prekursorait. Egyes növényekből izolált glükozidokat sav- és hőálló édesítőszerként alkalmaznak. Ilyen például az édesfűből (*Stevia rebaudiana*) előállított szteviozid, mely háromszázszor édesebb, mint a szacharóz, valamint a rebaudiozid, mely négyszázszor édesebb a szacharóznál [CRAMER & IKAN, 1986]. A továbbiakban a témám szempontjából fontos *o*-glikozidázokkal, ezen belül is csak a glükózpolimereket hidrolizáló α - és β -glükozidázzal foglalkozom.

2.2.1 A β -glükozidáz (EC 3.2.1.21)

A β -glükozidáz (szinonim nevei: cellobiáz, emulzin, genciobiáz, elatráz, arbutináz, amigdalínáz) a béta térállású glükozidos hidroxilt tartalmazó glükóz glükozidjait hidrolizálja. A cellobióz a legfontosabb β -glükozidos kötéssel rendelkező diszacharid (innen ered a cellobiáz név). Az enzimet mandulatej emulzióban fedezték fel, innen származik az emulzin név. Az emulzinnak szignifikáns D-galaktozidáz és D-mannozidáz aktivitása is van.

A β -glükozidáz szerkezetét 447 aminosav alakítja ki. Az enzimforrás egyéb tulajdonságok mellett az enzim molkulatömegét is meghatározza. Az enzim molekula két aktív alegységből áll. A β -glükozidáz háromdimenziós képét a **II. melléklet** tartalmazza. A mandula β -glükozidáz molekulája 117,000 és 66,500 kDa [HELPERICH & KLEINSCHMIDT, 1965]. *Flavobacterium johnsonae* esetében ez az érték 72 kDa [OKAMOTO et al., 2000], míg a *Debaryomyces hansenii* β -glükozidázai 122 és 95 kDa molkulatömegűek [RICCIO et al., 1999].

A β -glükozidáz a származási hely szerint a β -glükozidos kötés bontásának szempontjából némileg különbözhet. Ezeket a különbségeket az I. aktív centrum nagyság és alak szerinti eltérései

vagy a két aktív centrum (I. és II.) egymástól való távolságkülönbségei okozhatják. A β -glükózidáz enzimről összefoglaló munkát készített VEIBEL [1950], LARNER [1960], valamint NISIZAWA és HASHIMOTO [1970]. A kereskedelmi forgalomban kapható preparátumokat ma is mandulából állítják elő [GASZTONYI & LÁSZTITY, 1992].

Az enzim szubsztrát specifitása igen széles, a β -(1 \rightarrow 4) kötés felszakításán kívül egyéb glükóz diszacharidokat pl. β -(1 \rightarrow 6), β -(1 \rightarrow 2) kötetést tartalmazó szoforózt, β -(1 \rightarrow 3) kötetést tartalmazó laminarinózt is képes bontani, persze sokkal kisebb aktivitással. Az oligomerek bontásánál a nem redukáló molekulavégen kezdi meg a bontást.

Az enzim működéséhez a víz jelenléte elengedhetetlen az aktív konformáció megőrzése érdekében. A β -glükózidáz a β -térállású hidroxilkötetést tartalmazó molekulákat hidrolizálja. Első lépésként egyesül a szubsztrátummal bomlékony, komplex vegyület formájában. A nagy méretű enzim-molekula felületén lévő barázdákba a kis szubsztrát molekulák belesimulnak és a szubsztrátumban az elektron eloszlás úgy változik meg, hogy a reakcióhoz szükséges aktiválási energia lecsökken. Az enzim felületén megy végbe a reakció (amelyhez a víz OH^- és H^+ ionjai is szükségesek), ezután a komplex az enzimre, és a végtermékekre bomlik szét.

A β -glükózidáz enzim előfordul egyes baktériumokban, penész-, élesztőgomba és gomba törzsekben, malátában, szilvamagban, édes és keserű mandulában, egyéb növényekben (rizs, cseresznye, szója, stb.), emlős vesében, májban, az éti csiga emésztőnedveiben és a talajban is. De izolálták már keserű barackmagból, ahol a magban lévő mérgező ciánglükózidok lebontását segítheti elő [TUNÇEL et al., 1997].

Az emlősökben található β -glükózidáz enzim a Gaucher-kór nevű anyagcsere betegséggel kapcsolatban került az érdeklődés középpontjába. Ez egy örökletes anyagcsere betegség, amelyet a savas β -glükózidázt kódoló génben létrejött mutáció okoz [HOROWITZ & ZIMRAN, 1994]. LOSMAN azt találta, hogy a β -glükózidáz egy izoenzime hiányzik a homozigóta limfocitákban és a heterozigótákban pedig szignifikánsan alacsony a mennyisége [LOSMAN, 1974]. A lép és máj enzimek aktivitása a Gaucher-kóros betegekben jóval alacsonyabb volt szintetikus (4-metillumbiferal- β -D-glükózid) szubsztrátra. A Gaucher-kór legjellemzőbb tünete a vérzékenység [LÁSZLÓ, 1993]. PÓCSI és KISS a sertésveséből izolált β -glükózidáz orvosi vonatkozását vizsgálta [PÓCSI & KISS, 1988].

Az β -glükózidáz pH optimuma 3,0-7,0 között változik szubsztráttól, előfordulási helytől, termelő szervezettől függően. Hőmérséklet optimuma 20-85°C tartományban mozog, függően attól,

hogy az enzimet termelő törzs hőmérséklet optimuma milyen. Az enzim inhibitorai a C-vitamin, a formaldehid és a nátrium-hidrogénszulfít (NaHSO_3), a nehézfémek (pl. higanyklorid), glükóz, cellobióz (nagy koncentrációban), genciobióz, maltóz, melibióz, norjirimicin, cello-oligoszacharidok, p-kloromercuribenzoát, EDTA, Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , míg aktivátorai a szervetlen sók [LARNER, 1960].

A növényvilágban a glükóznak a nem cukor molekulákkal alkotott vegyületei általában β -glükozidok, így hidrolízisüket a β -glükozidáz katalizálja. Az egyes gyümölcsaromák kialakításában is részt vesz ez az enzim, mivel ezek az aromák (amigdalín, vicin, florizin, szalicin, stb.) glükozidos kötésekben találhatók természetes glükozidokban [GASZTONYI & LÁSZTITY, 1992].

2.2.1.1 A β -glükozidáz aktivitásmérése

A β -glükozidáz aktivitásának mérésére több módszer áll rendelkezésre, természetes vagy mesterséges β -*O*-glükozid hidrolízisével és a glükóz koncentráció nyomonkövetésével határozható meg. Az enzimreakció nyomonkövetése a szubsztráttól függ. Általánosan elterjedt a *parafenol* (p-nitro-, azaz 4-nitro-fenil- β -D-glükopiranozid, pNPG) szubsztrátot alkalmazó módszer, amelyben a koncentráció változás fotometriásan követhető. A *Calzyme Laboratories, Inc.* meghatározása szerint az a β -glükozidáz mennyiség, amely katalizálja 1 μmol 4-nitrofenol egy perc alatti képződését 37°C hőmérsékleten, az egy unit. E meghatározás alapját a 4-nitrofenol képződési reakciója, valamint mennyiségének spektrofotometriás (400 nm) meghatározása adja [STERNBERG et al., 1977].

Amennyiben nincs ilyen speciális, színes származékot képző aglikon, a glükóz koncentráció mérésével állapítható meg az aktivitás. E szerint a meghatározás szerint az az enzim mennyiség felel meg 1 unitnak, amely 1 μmol glükózt képes felszabadítani szalicinből percenként, pH=5,0 értéken és 37°C hőmérsékleten. A módszer hátránya, hogy csak indirekt módon lehet mérni. Számos indirekt módszer ismeretes a glükóz koncentráció megállapítására. Ha a β -D-glükóz keletkezését hexokináz/ glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz rendszerben mérik, akkor a NADPH koncentrációjának csökkenése 340 nm hullámhosszon fotometriásan követhető [BEUTLER et al., 1974]. Erre a módszerre analitikai kitéteket alkalmaznak. Ugyancsak enzimes analízis kitétben alkalmazzák a glükóz-oxidázt is. Egy másik fotometriás módszer, amely alkalmas lehet a közeg glükóz tartalmának meghatározására, például dinitroszalicil-savas módszer, amelyben a fotometrállható komponens a glükóz redukáló tulajdonsága következtében alakul ki. Ez a módszer azonban kevésbé pontos és az

egyed redukáló cukrok nem különböztethetők meg vele [HOSTETTELER et al., 1951]. Legegyszerűbb, bár igen ritkán alkalmazott módszer, ha nem szalicint, hanem cellobióz szubsztrátot használnak 25°C hőmérsékleten, pH=5,1 értéken [LARNER, 1960].

2.2.1.2 A β -glükózidáz izolálása és tisztítása

A β -glükózidáz enzimet csak többlépcsős tisztítási folyamat után lehet izolálni. Az enzim előfordul sejtplazmában, sejtfalban és plazmamembránban is, ezért elsődlegesen ezeket kell a többi sejtalkotótól különválasztani. Iparban alkalmazott termelő szervezetek: édes-mandula (*Amygdalus communis*), papaja (*Carica papaya*), kasszava (*Manihot esculenta*), *Hanseniaspora vineae*, *Myceliophthora thermophila*, *Streptomyces lividans*, *Cellulomonas thermocellum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Sclerotium rolfsii*, *Evernia prunastri*, *Aspergillus japonicus*, *Rhizobium trifolii*, *Mucor mihei*, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Candida wickerhamii*, *Penicillium funiculosum*, stb [FREER, 1993]. Az enzim izolálása és tisztítása különböző forrásokból különböző módon zajlik, néhány jellemző változat az alábbiakban kerül bemutatásra.

A *Sulfolobus solfataricus* esetében a sejteket lecentrifugálták, 50 mM nátrium-foszfát pufferben felszuszpendálták pH=7,3 értéken, amely 150 mM nátrium-kloridot és Triton X-100-at tartalmazott. A sejtek szétzúzása után szűrték a szuszpenziót. A frakciókat oszlopkromatográfiával tisztították és gélszűrővel koncentrálták [KENGEN & STAMS, 1994]. A *Fusarium oxysporum* gomba telepeket első lépésben lecentrifugálták, majd a szűrletet ultraszűrővel poliszulfon membránnal töményítették be [MAKROPOULOU et al., 1998].

WATANABE és KUWAHARA *Aspergillus niger*ből tisztították a β -glükózidázt affinitás kromatográfiai módszerrel, keresztkötéseket tartalmazó metakrilamid kopolimeren. Az enzimet az oszlopról 10 mM nátrium-klorid oldattal 20 mM töménységű acetát pufferbe oldották [WATANABE & KUWAHARA, 1993].

A szójabab (*Glycine soja*) csíraleveleiből készített szuszpenziót (200 mM foszfát pufferrel pH=6,0, amely 0,2-0,5 mM nátrium-kloridot tartalmazott) vákuumban leszűrték. A nedves csapadék centrifugálása után a preparátum jelentősen feldúsult β -glükózidázban [HSIEH & GRAHAM, 1997].

A mézelő méhből (házi méh = *Apis mellifera*) történő β -glükózidáz izoláláskor első lépésben a méheket -30°C hőmérsékletre lehűtötték és elporították. Az extrakciót 50 mM foszfát pufferrel (pH=7,5), üveggyöngyök jelenlétében végezték. Centrifugálás után a felülúszóban oldott enzim

tisztításához FPLC-rendszert használtak. Megállapították, hogy – összehasonlítva a mézzacskóval és potrohhal – a tornak van a legmagasabb a β -glükózidáz tartalma [PONTOH & LOW, 2001].

Sárgaréparépából (*Daucus carota*) izolált nyers β -glükózidázt CM-Sheparose CL-6B oszlopon lineáris nátrium-klorid gradienssel tisztították [KONNO et al., 1996]. A különböző, növényi eredetű élelmiszeripari nyersanyagok β -glükózidáz tartalmára és aktivitására vonatkozó eredményeimet a 4.3.3 fejezet tartalmazza.

2.2.2 Az α -glükózidáz (EC 3.2.1.20)

Az α -glükózidáz az α -térállású glikozidos hidroxilt tartalmazó glükóz glikozidjait hidrolizálja. A maltóz az egyik (legjellemzőbb) oligoszacharid, amelyben alfa-térállású glükóz van. Innen ered, hogy az α -glükózidáz másik neve a maltáz. Az enzim a szacharóz és a melicitóz diszacharidok hidrolízisét is katalizálja, mivel ezek is tartalmazznak α -glükózid kötést, sőt a szacharóz bontását még gyorsabban hajtja végre az enzim, mint a maltózét [HALVORSON, 1966].

Az α -glükózidáz élelmiszeripari jelentősége elenyésző. A bakteriális α -glükózidázt α -amiláz és pullulanáz enzimekkel együttesen egy lépéses keményítő hidrolízisre alkalmazzák [LEGIN et al., 1998]. A Tanszéken korábbi kutatások során reverz hidrolízissel felületaktív *o*-alkil-glükózidokat állítottak elő [KOSÁRY et al., 1998c].

Az enzimreakció során az α -glükózidáz sok élő szervezetben termelődik: csírázó magvakban, burgonyában, élesztőkben, baktériumokban, pl. *Bacillus thuringiensis*ben és más *Bacillus* fajokban [ZEMEK et al., 1981]. A gombák által termelt α -glükózidázok tulajdonságairól CHIBA készített részletes tanulmányt [CHIBA, 1988]. Az enzimet izolálták ezen kívül emlősök nyálából, véreből, a pankréászból stb. A különböző forrásból származó α -glükózidázok optimális pH-értéke 4,5-7,2 között változik. Az enzim molekula savérzékeny, ezért savas közegben gyorsan elbomlik. Hőfok optimuma 35°C körül van, katalitikus aktivitását 55°C hőmérsékletig őrzi meg. Inhibitorai végtermékként a glükóz és a fruktóz [HALVORSON, 1966].

Az α -glükózidáz és a szubsztrát molekulák között kovalens kötés jön létre. A katalitikus helyen a nukleofil csoport aszparagin [MCCARTER & WITHERS, 1996]. Az enzimnek két glükózkötő helye van [HOWARD & WITHERS, 1988]. Az *Sacharomyces cerevisiae* élesztőtörzsből izolált α -glükózidáz enzim aktív centrumának sematikus ábráját a **III. melléklet** tartalmazza.

2.2.2.1 Az α -glükozidáz aktivitásmérése

A glükóz mennyiségének változása alapján az α -glükozidáz aktivitása meghatározható [HESTRIN & LINDEGREN, 1952]. LARNER hexokináz és glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzimszisztémában végezte az aktivitásmérést [LARNER, 1960]. Az α -glükozidáz aktivitás meghatározásának másik módja a 4-nitrofenol- α -D-glükopiranozidból (pNPG) képzett 4-nitrofenol mennyiségének mérésén alapul [HALVORSON, 1966].

2.2.2.2 Az α -glükozidáz izolálása és tisztítása

TAKEWAKI és munkatársai mézélő méhből izoláltak α -glükozidáz enzimet, amelynek részleges jellemzését is elvégezték [TAKEWAKI et al., 1993]. KISHIMOTO és munkatársai *Acidobacterium capsulatum* által termelt α -glükozidázt tisztítottak CM-Sheparose, Sephacyl S-300 és Mono-S ioncserés kromatográfiával. Egy 65 kDa tömegű monomer fehérjét kaptak, amelynek molekulatömegét SDS-pageval állapították meg [KISHIMOTO et al., 1999]. Az *Aspergillus* törzsek által termelt α -glükozidáz izolálásával foglalkozott többek között ANINDYAWATI és munkatársai. *Aspergillus awamori* KT-11 típusú törzsből, ammóniumszulfátos telítést alkalmaztak, majd a precipitátumot Bio-Gel P6 típusú gélen futatták, 50 mM töménységű acetát pufferrel (pH=6,2) a felesleges ammónium-szulfát eltávolítsa céljából. A sómentesített oldatot DEAE Shepadex A-50 oszlopon 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH=7,2) tisztították [ANINDYAWATI et al., 1998].

2.3 A pektin-metil-észteráz

A pektin-metil-észteráz (PME) enzim a pektin hidrolízis egyik enzime. Szinoním nevei: pektin-pektinhidroláz, pektinészteráz, pektáz, pektinmetoxiláz, pektin-demetiláz és pektolipáz). Szubsztrátja a pektin. Különleges szerkezete részletesebb tárgyalásra szorul. (A pektin-metil-észteráz elnevezés helyett általában a PME elnevezés fog szerepelni a továbbiakban).

2.3.1 A pektin molekula szerkezete

A pektinek a növényvilágban igen elterjedt poliszacharidok, amelyek különböző arányokban háromféle komponensből állnak: galaktán, arabán és részlegesen észterezett galakturonán-metilészter. Mivel a pektinekre jellemző különleges tulajdonság, a növényi nedvek gélesedése elsősorban a legutóbbi komponensnek köszönhető [BRUCKNER, 1974], ezért általában csak ezt a

komponenest illetik “pektin” elnevezéssel. Ennek megfelelően a pektin (American Chemical Society elnevezése) olyan, a növényekben előforduló poligalakturonsav, amelyekben a karboxilcsoportok több-kevesebb része metanollal van észterezve. A pektinben a szabad karboxilcsoportok egy része pedig kalciumsó, illetve magnéziumsó formájában is előfordulhat. A pektin közvetlen hatással van a szövetek vízkötő és zselé képző tulajdonságaira, ezáltal nagyban meghatározza a szöveti állomány, elsősorban a gyümölcsök szöveti állományának minőségét.

A pektin általában pH=3-4 értékeken a legstabilabb [KERTÉSZ, 1955]. Enzimek, illetve sav vagy lúg hatására ezek az észterkötések felbomlanak, vízben oldhatatlan pektosav képződik, amely alapvetően poligalakturonsavnak tekinthető, tehát észtercsoportokat nem tartalmaz [BE MILLER, 1986]. Az irodalomban ismeretes a pektinsav elnevezés is, amely olyan oldható poligalakturonsavak jelent, amelyeknek egyes karboxilcsoportjai még észterezve vannak. A pektin a növényekben elsősorban intracellulárisan és sejthártyához kötve, oldhatatlan formában fordul elő [WHITAKER, 1984].

A zöldségek és gyümölcsök pektintartalma légyártásnál szűrési, stabilitási problémát okozhat, ezzel a következő fejezet részletesen foglalkozik. Egyes területeken vízkötő, zseléképző anyagként (pektinek, pektinsavak), adalék anyagként (diabetikus élelmiszerekben), emulgeáló szerként (védőkolloidok), valamint antioxidánsként (gyógyszeripar) alkalmazzák [CRUEGER & CRUEGER, 1987]. Ipari méretekben a citrusféléből, almából, ribizskéből és répaszeletekből állítják elő [KERTÉSZ, 1957; BE MILLER, 1986] Az **1. táblázat** néhány gyümölcs és zöldségféle pektintartalmát mutatja be.

1. táblázat. Néhány élelmiszeripari nyersanyag pektin tartalma [KASHYAP et al., 2001].

Forrás	Nedves tömeg (%)	Száraz tömeg (%)
Alma	1,5-2,5	15-18
Cirom püré	1,5-2,5	30-35
Narancs püré	3,5-5,5	30-40
Répa püré	1,0	25-30
Sárgarépa	0,62	7,1

2.3.2 A pektinek lebomlása

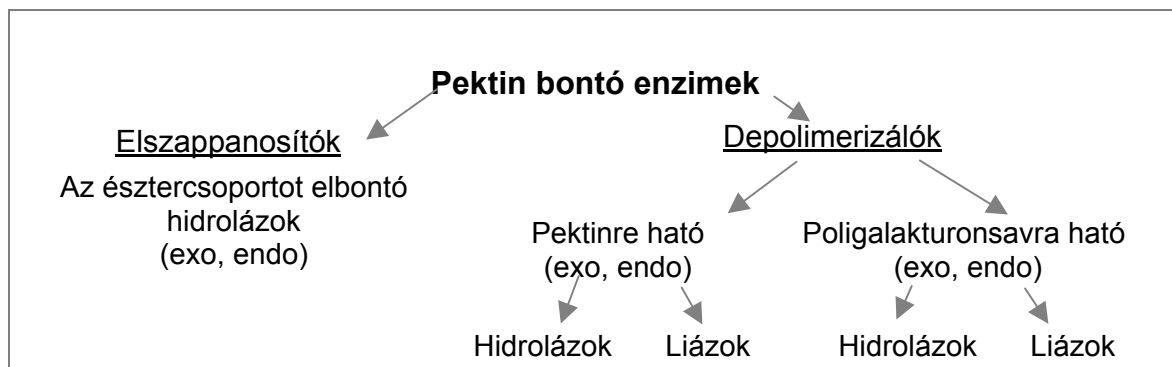
A zöldségek és gyümölcsök tárolás és raktározás alatt végbemenő romlási folyamatai nagy problémát jelentenek az élelmiszeripar számára. Ezek a nem kívánatos változások általában enzimekatalizált folyamatok. A gyümölcsök és zöldségek érésének jellemző folyamata a

konzisztencia változása. Ez a folyamat kapcsolatban van azokkal a változásokkal, amelyek a szilárdságot biztosító sejtfalban játszódnak le. A sejtfalban és a középső lamella rétegben található poliszacharidok (pektinek, cellulózok és hemicellulózok) és ezek lebomlásának, oldódásának, illetve mennyiségének változása nagymértékben meghatározza a friss, a tárolt, valamint a kezelt zöldségek és gyümölcsök textúráját, állagát. Éretlen gyümölcsökben a pektin vízben oldhatatlan protopektin formában van jelen, mely sav vagy enzimek (macerázok) hatására alakul át pektinné [GASZTONYI & LÁSZTITY, 1992]. A protopektinek olyan makromolekula-komplexek, amelyekben a pektin fehérjéhez kötött formában van jelen. A kereskedelmi forgalomban kapható pektin készítményeket almából vagy citrushéjból állítják elő [KRAVTCHENKO et al., 1992].

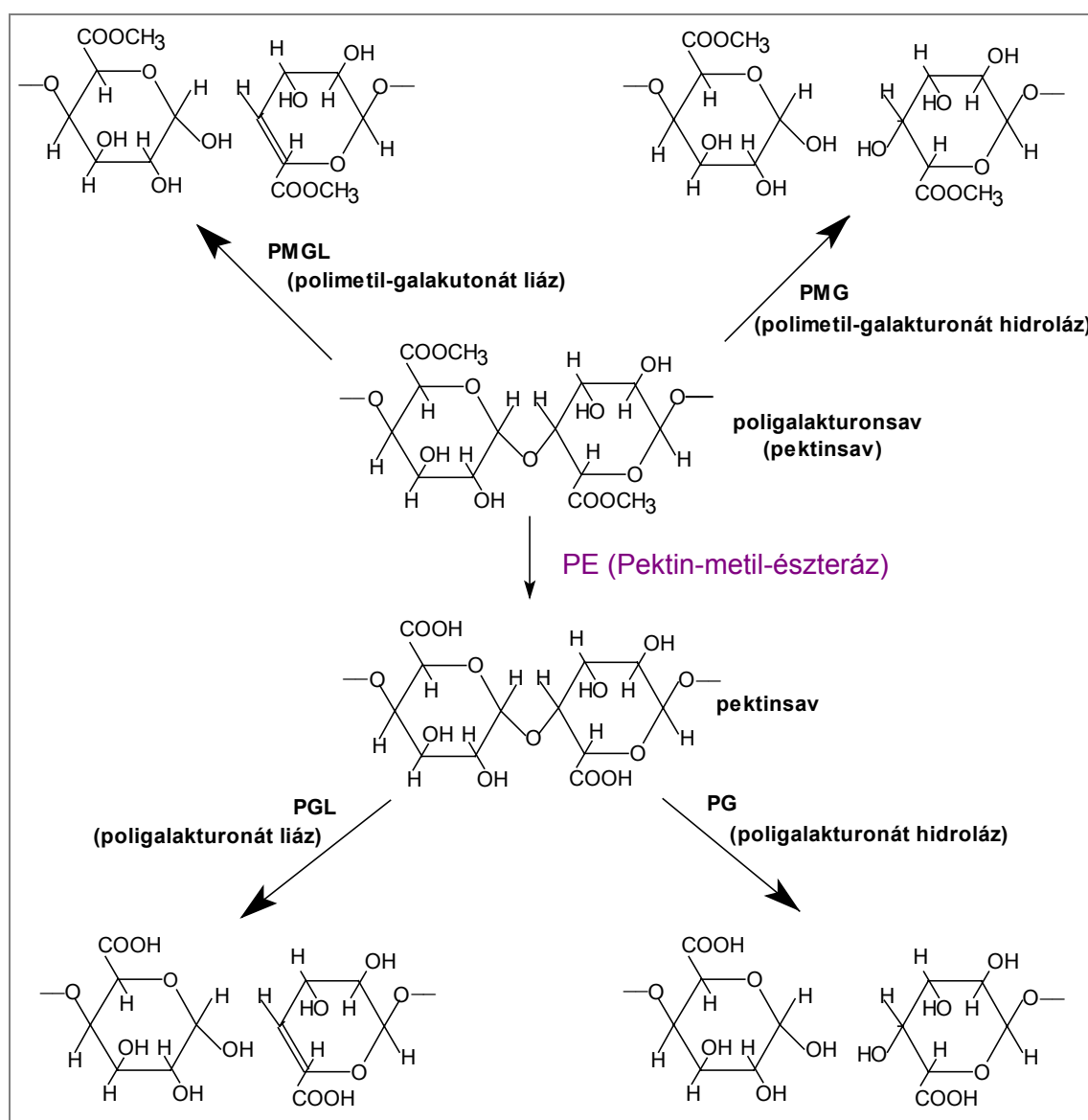
A pektin észterezettségi foka nemcsak a növényi sejt milyenségétől, hanem annak állapotától is (pl. gombafertőzés) függ. A sejtfal szilárdságát a pektin szerkezete, közelebbről nemcsak a szabad karboxilcsoportok száma befolyásolja, hanem azok elhelyezkedése a poligalakturonsavláncon is meghatározó [MICHELI, 2001]. A pektin fenti paraméterei természetesen PME által történő hidrolizálhatóságát is befolyásolja. A pektinázok működésének következtében különböző észterezettségű, a növények életfolyamataiban más és más szerepet betöltő, a sejtnék különböző szilárdságot (konzisztenciát) kölcsönző pektinek keletkeznek. A konzisztencia mind a zöldségek, a gyümölcsök, mind pedig a belőlük készített termékek fontos minőségi követelménye, ezért lényeges, hogy az említett lebontási folyamat a kívánt konzisztencia elérése után már ne folytatódjék [LÁSZTITY, 1981].

2.3.2.1 A pektinbontást katalizáló enzimek családja és hatásmechanizmusuk

A pektinbontó enzimeket három nagy csoportra oszthatjuk (**1. ábra**) aszerint, hogy pektint, pektosavat vagy oligo- α -1,4-D-galakturonsavat fogadnak-e el szubsztrátként. A pektinek szerkezetét és a legfontosabb pektinbontó enzimeket a **2. ábra** mutatja. A különféle pektinbontó enzimek más és más helyen támadhatják a pektint és hatásuk komplex módon érvényesül. A pektinbontó enzimek közül most csak az elszappanosító, azaz a metilészter csoportot hidrolizáló enzimet a pektin-metil-észterázzal foglalkozom.



1. ábra. A pektinbontást katalizáló enzimek felosztása [LÁSZTITY, 1981].



2. ábra. A pektinek szerkezete és a pektinbontó enzimek [BORDENAVE et al., 1996].

2.3.2.2 A pektin-metil-észteráz működése

Bár a különböző növényi forrásból származó pektin-metil-észterázok tulajdonságai között vannak egyéni eltérések, sőt az egyes növények különböző izoenzimeket is tartalmazhatnak, de az alapvető jellemzők gyakorlatilag azonosak. A PME tehát a pektinben lévő metilészter csoportok hasítását katalizálja [KASHYAP et al., 2001], az etilésztereket igen lassan képes bontani [WHITAKER, 1984]. A pektin-metil-észteráz sokféle friss gyümölcsben és zöldségben, valamint mikroorganizmusban fordul elő [TIJSKENS et al., 1997]. A PME a külső sejtfallal és a középlamellában is megtalálható, így szubsztrátot képez a pektinsavat, illetve pektosavat bontó, depolimerizáló poligalakturonáz enzimek számára, amelyek gyümölcsök puhulásában játszanak szerepet. A reakció során keletkező metanol, mint észterező szer a gyümölcsök aromájának kialakításában is szerepet játszhat [SZABOLCSI, 1991]. Az észtercsoport hidrolízise általában egy szabad karboxil csoporthoz legközelebbi szén atomon kezdődik [KASHYAP et al., 2001]. A támadás pontos helye szempontjából azonban a növényi és gomba eredetű PME izoenzimek között számottevő különbség lehet, ezt a különböző eredetű pektinek szerkezeti azonosítására alkalmazhatják [LIMBERG et al., 2000].

A sejtnövekedés alatt a PME aktivitást a sejtfallal hidrogénion koncentrációja szabályozza. Az enzim működése semleges körüli pH értéken optimális. A lokális pH csökkenés az enzim aktivitását csökkenti. Ekkor a pH csökkenésének következtében glükózidázok és glükózil transzferázok aktivizálódnak a sejtfallal növelésére és felépítésére. A lokális pH növekedése következtében a PME reaktiválódik, s ezzel újra beindul egy ciklus. A PME aktivitás szabályozását nemcsak a pH változásai, hanem a különböző izoenzimformák kialakulása is lehetővé teszi a különböző szövetekben [GIOVANE et al., 2003].

A növényi szövetben a PME növekvő aktivitása elősegíti a szövetek szilárdulását azáltal, hogy növeli a szabad karboxilcsoportok számát a pektin molekulán, amely így képessé válik arra, hogy keresztkötéseket alakítson ki a kalcium ionokkal. Ezen interakciók kialakulása kulcsszerepet játszik a sejtfallal szerkezet létrejöttében [SILHA et al., 1996]. A keresztkötések kialakulása miatt a PME aktivitás kis mértékben a viszkozitást is befolyásolja.

A PME nagyon specifikus észteráz, glicerol és glikol észtereket nem bont. Az észterbontás sebessége különböző, nem galakturonid észtereknél mintegy ezerszer lassabban megy végbe, mint a természetes pektineknél. A növényi eredetű PME a szintetikus metil-poligalakturonátot csak sokkal lassabban képes hidrolizálni, mint a természetes pektint [GIOVANE et al., 2003], a gomba eredetű PME viszont a teljesen metilezett észterezett szintetikus galakturonátot is elfogadja szubsztrátként [VAN ALEBEEK et al., 2002].

A PME szerkezetét 2002-ben JOHANSSON és munkatársai röntgensugárzásos módszer állapították meg. Az enzim két jobbmenetes β -hélixből áll [JOHANSSON et al., 2002]. Valószínű, hogy az aktív hely két aszparaginsav és egy arginin-származékból tevődik össze. Az aktív centrum a β -hélix felületén egy hasadékbán helyezkedik el, amelyet kiugró hurkok képeznek, ez a hasadék a pektin kötésére alkalmas hely. A bakteriális és növényi PME felépítése között a különbség az aktív helyet kialakító hasadék formájában van. A növényi PME esetében ez laposabb [JENKINS et al., 2001]. A sárgarépa PME és a *Erwinia chrysanthemi* PME háromdimenziós képét a **IV. melléklet** tartalmazza.

A szerkezeti vizsgálatok eredményei alapján már nagyrészt könnyen értelmezhetők azok a gyakorlati tapasztalatok, amelyeket a PME aktivitásának befolyásolásával kapcsolatban korábban leírtak, de magyarázni még nem tudtak. Az aszparaginsavnak és az argininnak az aktív hely működésében játszott kulcsszerepe indokolhatja a fémionok koncentrációjának alapvető befolyását az aktivitásmérés során. Korábban ugyanis úgy találták, hogy sómentes oldatokban a növényi eredetű PME szinte teljesen inaktív, de a közeg sótartalmának növelésével az aktivitás ugrásszerűen megnő, ugyanakkor a nagyon magas sókoncentráció inaktíválóan hathat [WARRILOW & JONES, 1995]. Szinte maximális enzimaktivitás érhető el pH=6,0 értéken, ha a közeg sókoncentrációja kétértékű kationokra nézve 0,03 M, illetve egyértékű kationokra nézve 0,01 M. Enzimkinetikai vizsgálatok alapján úgy találták, hogy a PME sókoncentrációra bekövetkező aktiválódása és gátlódása elsősorban az ionok és a szubsztrát közötti kölcsönhatásának és nem az ionok és az enzim kölcsönhatásának az eredménye [CHARNAY et al., 1992].

Az enzim pH optimuma eredettől függően 6,0 és 8,0 érték között van, a pH értékének csökkentésével az enzim fokozatosan inaktíválódik, pH=4,0 érték alatt pedig aktivitását teljesen elveszti. A sókoncentráció a pH optimumot befolyásolhatja [GIOVANE et al., 2003]. A növényi eredetű PME hőmérsékleti optimuma aránylag magas. Bár az enzim aktivitását általában 30°C hőmérsékleten mérik, nem ritka az ennél magasabb optimum, például 55°C [PILNIK & VORAGEN, 1970].

Megállapították, hogy az általános gyakorlatnak megfelelően a gombából izolált PME sokkal kevésbé érzékeny a külső körülményekre, mint a növényi eredetű PME. A gombából izolált PME, ugyanis már sómentes közegben is aktív, a pH optimuma 4,5-5,0 értékek között van. Ez az optimum a sókoncentráció növelésekor sem változik. Sokféle mikroorganizmus termel pektin-metilészterázt (pl. *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas* sp., *Xantomonas* sp.) [LIMBERG et al., 2000]. Megállapították, hogy a növényi PME, amelynek az izoelektromos pontja semleges

pH-érték körül van, a poligalakturonsav származékokat megtámadva szabad karboxilcsoportokat eredményez [ALONSO et al., 1997].

Az aktív hely szerkezete indokolhatja azt is, hogy a PME számos kémiai reagenssel, például az SH-reagensekkel szemben ellenálló, de szintetikus detergenssek már kis koncentrációban is inaktiválódást okoznak. A bakteriális eredetű PME jobban ellenáll a detergensseknek, mint a növényi eredetű. Az aszkorbinsav és a szulfitek jelenléte aktiválóan hat az enzimre, a polifenolok, ezüstionok, foszfátok és nukleotidok, viszont inaktiváló hatásúak [WHITAKER, 1984].

2.3.2.3 A pektin-metil-észteráz aktivitásmérése

A PME aktivitás meghatározása többféle módon történhet. Szubsztrátként gyakorlatilag minden esetben magas észterezettségi fokú (>70 %), általában alma vagy citrom pektint használnak, mivel a szintetikus metil-poligalakturonát sokkal lassabban hidrolizálódik [GIOVANE et al., 2003]. A PME aktivitás elvben mind a felszabaduló karboxil-csoportok, mind a lehasadó metanol koncentráció változásának mérése útján meghatározható. Ez utóbbira azonban az irodalomban igen kevés példa található. A metanol alkohol oxidázzal formaldehiddé oxidálható, amelyet 2,4-pentán-dionnal színes vegyületté alakítanak és a keletkező színes vegyületet 412 nm hullámhosszon fotometrálják [KLAVONS & BENETT, 1986].

Az esetek túlnyomó többségében a karboxilcsoportok számának növekedését titrimetriás úton határozzák meg, miközben a pH értéket állandó értéken tartják (pH=7,0) [KERTÉSZ, 1955; CRELIER et al., 2001]. Az PME aktivitás meghatározására önkényes unit egységet használnak annyiban, hogy a pH állandó értéken tartására egy perc alatt fogyasztott nátrium-hidroxid mennyiségét (μmol) 30 ml térfogatú és 30°C hőmérsékletű reakcióelegyre vonatkoztatják [REXANOVA-BENKOVA & MARKOVIC, 1976; SZABOLCSI, 1991]. Az aktivitás titrimetriás mérésére elterjedten használnak automata titráló berendezéseket (például Metrohm, Svájc).

A pektin-metil-észteráz aktivitásmérésre vonatkozó módosításaimat és eredményeimet a 4.1.3 fejezet tartalmazza.

2.3.2.4 A pektin-metil-észteráz izolálása és tisztítása

Majdnem minden gyümölcsből és zöldségből mutattak ki, illetve izoláltak pektin-metil-észterázt, mint az érési folyamatok egyik jellemző enzimét. A teljesség igénye nélkül, az elmúlt tíz évben néhány vizsgált növény (a leggyakrabban vizsgált almán, narancson és paradicsomon kívül): birs,

papaja, sárgabarack, kiwi, fagyöngy, eper, banán, bab, szilva, kókusz, málna, mangó, uborka, áfonya, zeller, cseresznye, grapefruit, citrom, stb.

Az enzim elsősorban sejtfalhoz kötött formában (csak kis mértékben oldott formában) van jelen a sejtekben és ez a kötődés részben ionos jellegű, ezért izolálása nem könnyű [GLOVER & BRANDY, 1994]. Különböző technikák ismertek az izolálással kapcsolatban. Az erős adszorpciós kölcsönhatások csökkentésére, illetve az ozmotikus viszonyok megváltoztatására különböző adalékanyagokat (nátrium-klorid, polietilén-glikolok, polivinil-pirrolidon, stb.) alkalmaznak. Az extrakciót általában 4°C hőmérsékleten végzik. Néhány jellemző izolálási módszer:

KÖRNER és munkatársai 1980-ban írták le narancsból – nem túl jó hozammal – a PME izolálását. A kivonást olyan 50 mM borát-acetát pufferrel pH=8,3 végezték, amely nátrium-kloridra nézve 0,6 M töménységű volt. Az elegyet két réteg gézen átpréselték, majd lecentrifugálták (10000 g), a centrifugálás után kapott felülúszót ammónium-acetáttal csapták ki. A csapadékot borát pufferben oldották fel az aktivitásméréshez [KÖRNER et al., 1980].

BARNAVON és munkatársai szőlőből izoláltak PME enzimet. Az extrakciót olyan 0,5 M töménységű TRISZ-HCl pufferrel pH=8,5 végezték, amely 1 g/100cm³ Triton X-100 fantázianévű helyettesített polietilén-glikol, 20v/v % glicerolt, 5 g/100cm³ polivinilpirrolidont, 2 M nátrium-kloridot és 20 mM β-merkaptotetanolt tartalmazott. Centrifugálás (17000 g) után az enzimet ammónium-szulfáttal csapták ki. A csapadékot 0,1 M nátrium-foszfát pufferben pH=7,5 oldották fel az aktivitásméréshez [BARNAVON et al., 2001]. Ez a módszer meglehetősen tiszta PME preparátumot szolgáltat, de az izolálás több napig húzódik el és a többszörös extrakció és kicsapás erősen csökkenti az enzim mennyiségét.

NGUYEN és munkatársai többféle növényből (pl. banán, sárgarépa), jól reprodukálhatóan izoláltak PME enzimet. Az extrakciót 1 M nátrium-kloridot tartalmazó 0,2 M TRISZ-HCl pufferrel pH=8,0 végezték, majd centrifugáltak (18000 g). A felülúszó ammónium-szulfátos telítése és a centrifugálás után nyert csapadékot affinitás kromatográfiával és gélelektroforézissel tisztították [NGUYEN et al., 2002a,b]. A szerzők sárgarépa PME oszlopkromatográfiája során néhány olyan PME frakciót különítettek el, amelyek nyomástűrő tulajdonságukban némileg eltértek a fő frakcióból nyert PME nyomástűrésétől [NGUYEN et al., 2002a].

ALONSO és munkatársai persimonnból (káki gyümölcsből) kromatográfiás technikákkal izoláltak két PME izoformát (PME I és PME II), amelyek számos tulajdonságukban különböztek egymástól: molekulatömegük 51 kDa (PME I) és 30 kDa (PME II), izoelektromos pontjuk pH=8,4 (PME I) és pH=6,9 (PME II). A szerzők a PME I izoformát sokkal hőstabilabbnak tartják, mint a

PME II izoformát. 80 mM kalcium-klorid és 500 mM nátrium-klorid koncentráció felett mindkét izoenzim működése leáll [ALONSO et al., 1997]. WARRILOW és JONES pedig a paradicsomból izolált különböző tulajdonságú PME izoenzimeket [WARRILOW & JONES, 1995].

2.4 Az enzimek rögzítése

Az élelmiszeripari alapanyagok technológiai folyamatai során gyakran olyan körülmények fordulhatnak elő, amelyek az alkalmazott enzimet részben vagy teljesen inaktíválhatják. Az enzimeknek valamilyen hordozóhoz történő rögzítése, azaz immobilizálása igen sok gyakorlati haszonnal járhat. A rögzítés következtében ugyan általában csökken az enzim aktivitása, de a művelet bizonyos mértékig rögzíti az aktív konformációt, ez az enzim stabilitását jelentősen megnövelheti. Rögzített enzimek általában könnyen eltarthatók, szállíthatók és újra felhasználhatók, valamint kevésbé támadhatók a különböző mikroorganizmusok számára [KLIBANOV, 1979]. Ez áll annak a háttérben, hogy élelmiszeripari-, illetve más ipari folyamatokban a rögzített enzimek használata széleskörűen elterjedt [HEICHAL-SEGAL et al., 1995].

Mivel előrelátható volt, hogy a kutatás során több esetben enzimrögzítésre lesz szükség, ezért az enzimek rögzítésének irodalmával külön fejezet foglalkozik. Az enzimrögzítés számos előnye lehetővé teszi a folyamatos rendszerek alkalmazását, a folyamat jobban kontrollálható és hozam tekintetében is jelentős javulás érhető el [GODFREY & REICHEL, 1983]. Az 1980-as évektől kezdődően az enzimek rögzítésével kapcsolatos közlemények száma nagyon megnőtt, még gyakorlati jelentőséggel nem rendelkező enzimeket is számos esetben rögzítettek [MONSAN & COMBES, 1988]. Itt nincs lehetőség valamennyi rögzítési mód és hordozó típus bemutatására, ezért az összefoglalás csak a dolgozat témájának szempontjából jelentőséggel bíró rögzítési területekkel foglalkozik.

Az enzimek rögzítésére igen sokféle technikát fejlesztettek ki [WOODWARD, 1985]. Vannak rendszerek, amelyekben az enzim oldott állapotban marad, csak ultraszűrő membrán rendszerben visszatartják. Elterjedtebbek azonban a valódi rögzítést alkalmazó megoldások, ezek között is megkülönböztetjük a kötést és a bezárást. Az enzim kötése történhet valamilyen bifunkciós vegyülethez (keresztkötés, glutáraldehides térhálósítás), illetve a hordozóhoz kémiai kötással (ionos-, fémes-, adszorpciós- vagy kovalens kötással). A legrégebbi rögzítési módszer az enzim és a hordozó közötti adszorpciós kötés. A legelterjedtebb módszer azonban a kovalens

rögzítés, amelyet számtalan enzim esetében használtak, először a β -laktamáz, invertáz, glükózizomeráz és ureáz enzimeket, valamint élesztősejteket immobilizálták [CHIBATA et al., 1986]. Az egyik leggyakrabban alkalmazott hordozó a poliakrilamid, és a legelterjedtebb kapcsoló szerek a karbodiimidek [MOSBACH & MOSBACH, 1966]. A különböző rögzítési technikák kombinálhatóak is, így lehetővé válik az egyes módszerek hátrányának kiküszöbölése.

A bezárás történhet gélbe vagy membránba. A legáltalánosabban használtak a természetes alapú gélek (agaróz, alginát, kitozán, karragén, stb.). Mivel a gél pórusai nagyok, így a kisebb méretű biokatalizátorokat nem tartja vissza, ezért ezt a technikát elsősorban sejtek rögzítésére használják. Ezért az enzimek gélbezárása általában csak kombinált rögzítés esetén vezethet a kívánt eredményhez [WOODWARD, 1985]. A biokatalizátorok rögzítése, az adszorpciós rögzítési technikát kivéve, általában az aktivitás csökkenéshez vezet. Az enzim és a hordozó közötti kovalens kötések igen különböző típusúak lehetnek. A rögzítést általában szubsztrát jelenlétében végzik és így elkerülhető a szubsztrátkötő hely, illetve az aktív hely konformáció változása, amely akár a biológiai aktivitás elvesztéséhez is vezethetne. Az esetek többségében egy enzim rögzítése során az enzim szerkezetének ismerete nagy segítséget nyújthat [FERSHT, 1984].

Az élelmiszeriparban számos technológiában alkalmaznak rögzített enzimeket, elsősorban hidrolázokat. Legalább negyvenféle enzimre kifejlesztették a rögzített enzimes elektródákon alapuló analitikai eljárásokat [BOWERS & CARR, 1980; SCHELLER et al., 1985]. A gyümölcslegyártásban és borászatban is előnyt jelenthet a rögzített enzimek alkalmazása, mert segítségükkel elkerülhető az idegen fehérjék bevitele [MARTINO et al., 1995]. Ugyancsak rögzített enzimeket alkalmaznak a fehérjéket és a szénhidrátokat feldolgozó élelmiszeripari folyamatokban [HARTMEIER, 1988].

2.4.1 A glükozidázok rögzítése

Már korábban is említésre került, hogy élelmiszeripari szempontból a β -glükozidáznak sokkal nagyobb a jelentősége, mint az α -glükozidáznak. Valószínűleg ez lehet az oka annak, hogy az α -glükozidáz rögzítésére csak néhány irodalmi utalás van, például egy termofil archeobacteria *Thermococcus* törzsből izolált extracelluláris α -glükozidázt porózus üveggyöngyre és epoxigyöngyre rögzítették, valamint enzim-szilikát gél is alakítottak ki belőle, igen mérsékelt sikerrel [PILLER et al., 1996]. SCHIRALDI és munkatársai maltodextrinből állítottak elő glükózt kalcium-alginát gélbe zárt, egy termofil *Sulfolobus solfataricus* törzsből származó α -glükozidáz segítségével [SCHIRALDI et al., 2004].

A β -glükózidáz esetében az irodalomban igen sok példát találhatunk mind adszorpciós (szilikáton, alumínium-oxidon, kitozánon, stb.), mind pedig a keresztkötéssel (glutáraldehid) kialakított rögzítési módszerre, illetve ezek kombinációjára [BROUN et al., 1973; RAVET et al., 1993]. Az adszorpciós módszernek egy fejlesztett változatában enzim-szilikát gél alakítanak ki. Szol-gél prekursoroként szolgálnak például a tetra- és trialkoxi alkil-szilánok. Az is sikeres rögzítési módszer lehet, ha az enzimoldatot ilyen részlegesen hidrolizált szol-gél prekursorokkal összekeverik. A gélesedés, érés és részletes szárítás következtében keletkezett, mechanikailag stabil, üvegszerű gél nagy enzimaktivitást képes magába zárni. A szerzők szerint ez a rögzítési technika biztosít néhány olyan előnyös tulajdonságot a rögzített enzimnek, amely hagyományos rögzítési technikákkal nem érhető el, valamint kiküszöbölhető a diffúzió és a szivárgás okozta enzimvesztés. A rögzített enzim hőinaktiválódási sebessége akár két nagyságrenddel is csökkenhet [HEICHAL-SEGAL et al., 1995].

A kalcium-alginát gélbe való bezárási technikát különböző forrásból (*Pseudomonas picketti*, *Aspergillus niger*) származó mikrobiális β -glükózidáz enzimen tesztelték sikerrel [BUSTO et al., 1994]. A cellobióz hidrolízise során kalcium-alginát gélgyöngyök alkalmazása megfelelőnek bizonyult [WOODWARD & CLARKE, 1991]. Ezt a rögzítési technikát továbbfejlesztve az enzimet először glutáraldehiddel kezelték, majd ezután zárták polipropilén glikol alginát/ csont zselatin gyöngyökbe, ilyen módon a katalitikus aktivitás megőrizhető és folyamatos cellulóz hidrolízis végezhető [WOODWARD & CAPPS, 1992]. O'NEIL és munkatársai a rögzített β -glükózidázt még glutáraldehiddel kezelték, s így a biokatalizátort a sol-gél mátrixban tartották a folyamatos reakció közben [O'NEIL et al., 2002].

Feltehetően azért, mert a fenti rögzítési eljárások igen sikeresek voltak, sokkal szegényesebb irodalom található a β -glükózidáz kovalens kötéssel történő rögzítésére. GUEGUEN és munkatársai borok aromaprofiljának javítására használták fel a Duolit A-568 gyantára rögzített β -glükózidázt [GUEGUEN et al., 1997]. A továbbiakban két, a disszertáció szempontjából igen fontos hordozó bemutatása következik.

2.4.1.1 Akrilex C-100 típusú rögzítőszers alkalmazása

Az 1990-es évek elejétől kezdve a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Kémia és Biokémia Tanszékén két, a bevezetőben említett OTKA kutatás keretén belül részletesen foglalkoztak az aminoaciláz enzim rögzítésével. E kutatás során alkalmazták az Akrilex C-100 hordozót. Az Akrilex

C-100 hordozót úgy állítják elő, hogy a poliakrilamidban savamid csoportok egy részét hidrolizálják. Ez a hordozó kiválóan alkalmas az enzimek kovalens rögzítésére, mert karboxilcsoportjai vízben oldható karbodiimiddel könnyen aktiválhatók [SZAJÁNI et al., 1980b]. Később a Tanszéken ezt a módszert az irodalomban elsőként alkalmazták mind az α -, mind a β -glükózidáz rögzítésére egy, a bevezetőben szintén említett OTKA kutatás keretei között. Ez volt az α -glükózidáz első irodalomban közölt rögzítése [KOSÁRY et al., 1998b,c].

Az α - és β -glükózidáz Akrilex C-100 típusú hordozóra történő rögzítésére, illetve rögzített enzim kinetikai paramétereire vonatkozó eredményeimet a 4.2.1 fejezet tartalmazza.

2.4.1.2 A felületi réteg típusú hordozó alkalmazása

A *felületi réteg* (Surface layer, S-layer, **V. melléklet**) kétdimenziós, kristályos vagy szemikristályos szerkezetű, fehérjék vagy glikoproteinek által felépített egyrétegű képződmény, amelyet egyes baktériumok a sejtfalhoz kötött formában hoznak létre [SLEYTR, 1986]. E felületi rétegben lévő aminosav oldalláncok szabad amino- és karboxilcsoportjai kellő aktiválás után, alkalmassá válnak arra, hogy más fehérjékkel, enzimekkel kötéseket alakítsanak ki. A bécsi Agráregyetem (Universität für Bodenkultur) Mikrobiológiai Tanszékének Finomszerkezetkutató Csoportja hozzávetőleg egy évtizede foglalkozik a felületi réteg előállításával, szerkezetének vizsgálatával és különböző célú felhasználásával [SLEYTR, 1986]. A felületi réteg előállítására alkalmas baktérium törzsek által termelt S-layer eltérő fehérjeösszetételű lehet. A *Bacillus stearothermophilus* PV 72 törzsből izolált felületi réteg kizárólag fehérjét tartalmaz, míg a *Clostridium thermosulfuricum* L111-69 törzsből izolált képződmény pedig glikoproteinekből épül fel.

Az izolált felületi réteget célszerű felhasználás előtt a lizinoldalláncok segítségével, glutáraldehiddel térhálósítani, mivel vizes szuszpenzióban a felületi réteg fehérje tartalmának egy részét könnyen elveszíti. A térhálósított felületi réteghez általában karbodiimides módszer segítségével rögzítettek fehérjéket [WEBER et al., 2001]. SCHUSTER és munkatársai úgy találták, hogy az izolált felületi réteg kiválóan alkalmas hordozó a stabilizáló funkciójú lipidmembránok számára [SCHUSTER et al., 2001].

A S-layernek enzimek rögzítésére történő felhasználásával kapcsolatban az irodalomban igen kevés adat található, általában lipidekben gazdag molekulákat kapcsolnak hozzá [WEYGAND et al., 2000], valamint a funkcionizált lipidmembránok stabilizációjához hordozónak használták. Pedig a felületi rétegnek hordozóként más anyagokkal szemben előnyös tulajdonsága, hogy nagy

felülete miatt intenzívebb lehet a rögzülés. A felületi réteg számos anyag által átjárható, ezért a szubsztrát nemcsak a külső felület felől, hanem a felületi rétegen keresztül is megközelítheti az enzim aktív helyét [SCHUSTER et al., 2003].

A β -glükózidáz és más enzimek felületi réteghez történő immobilizálására vonatkozó eredményeimet a 4.2.2 fejezet tartalmazza.

2.4.2 A pektin-metil-észteráz rögzítése

A pektin metil észteráz immobilizálásával csak az utóbbi években foglalkoztak. Az élelmiszeripari vonatkozásokat figyelembe véve ez érthetőnek látszik, mivel a PME jelenléte inkább káros, mint hasznos az élelmiszerfeldolgozás során. A PME rögzítésére a legelterjedtebb módszereket használták, a gélbe zárást [GHOSE & GANGOPADHYAY, 2002] és az adszorpciót (pl. üveg, Celite, agaróz, stb.), valamint kovalens (pl. poliakrilamid) rögzítést [DE ASSIS et al., 2003; 2004]. A kutatásom céljai szempontjából a PME rögzítésének nem volt jelentősége.

2.5 A hidrolázok élelmiszeripari vonatkozásai

Az iparban, főleg az élelmiszeriparban az alkalmazott enzimek jelentős részét a hidrolázok teszik ki. A legnagyobb mértékben a proteázokat alkalmazzák a detergens-, a mosószer-, illetve a tejiparban [AUNSTRUP, 1979]. A proteázok mellett az amilázok és az amiloglükózidázok segítségével történő keményítő-hidrolízis is igen jelentős ipari felhasználást jelent. A felhasználás mennyiségét tekintve a következő legjelentősebb enzim a mikrobiális rennin, amelyet a sajtgyártásban alkalmaznak 1965 óta [VISSER et al., 1976]. Az élelmiszeripar területén még lipázokat is felhasználnak a sajtgyártásban (többek között az illat és az íz gazdagítása céljából, valamint zsiradékok átészterezésére) [AUNSTRUP, 1979].

Enzimeket alkalmazhatnak a kész élelmiszerek, illetve alapanyagok minőségjavítására is, a borászatban például a β -glükózidáz használata igen előnyös az aromaprofil javítására szempontjából [GUEGUEN et al., 1997]. Az üdítőital-iparban különböző célokból többféle pektináz enzimekészítményt használnak. A pektináz készítmények legalább hat féle pektinázt tartalmaznak, amelyek a pektint a molekula különböző helyein képesek hasítani [ROMBOUTS & PLINIK, 1979]. A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagokban a pektin-metil-észteráz érésszabályozásra

alkalmazható. Enzimek segítségével befolyásolható a termények íz-, szín-, állomány-, illetve beltartalmi érték változása is [CRUEGER & CRUEGER, 1987].

A hidroláz enzimeket elterjedten alkalmazzák élelmiszeripari alap- és segédanyagok preparatív szintézisére hidrolízis, illetve kapcsolás (reverz hidrolízis) segítségével. Például hidrolitikus úton, amilázok segítségével gyártható az izocukor keményítőből. A bioüzemanyagok előállításánál a cellulóz cellulázzal végrehajtott hidrolízisével állítják elő a glükózt, amelyből fermentációval nyerik az alkoholt [CRUEGER & CRUEGER, 1987]. A peptidek enzimatisz hidrolízisével optikailag tiszta aminosavak állíthatók elő, ugyanakkor a peptidázok vagy az aminoaciláz segítségével az aminosavakból kapcsolási reakcióval élelmiszeripari szempontból fontos di- és oligopeptidek szintetizálhatók (pl. aszpartám, amely egy édesítőszer) [ADISSON et al., 1988].

2.5.1 A glükozidázok élelmiszeripari felhasználása

A glükozidázok közül kétségtelenül az amilázok és a glükóamilázok segítségével történő keményítő-hidrolízis, valamint a cellulózból cellulázzal végrehajtott glükóz-előállítás a legfontosabb, a dolgozat szempontjából azonban elsősorban a β -glükozidáznak és kevésbé az α -glükozidáznak volt jelentősége.

2.5.1.1 Az α - és β -glükozidáz hidrolitikus alkalmazása az élelmiszeriparban

Mivel a természetben kevés az olyan glükozid, amely kizárólag α -glükozidázzal hidrolizálható, ennek az enzimnek csekély a szerepe az élelmiszeriparban. A különböző eredetű β -glükozidázok hidrolitikus aktivitásának élelmiszeripari felhasználása – a borászati alkalmazáson kívül – elsősorban kiegészítő jellegű. Ugyanis azok a mikrobiális rendszerek, amelyeket a cellulóz hidrolízisére alkalmaznak általában magas endo- és exocelluláz aktivitással rendelkeznek, azonban β -glükozidáz aktivitásuk elhanyagolható. Így a cellobióz hidrolízisére, azaz a glükóz előállítására a β -glükozidázt (célszerűen rögzített állapotban) kívülről kell a rendszerbe juttatni [BUSTO et al., 1994]. Abban az esetben viszont, ha a cél az etanol (biofuel) előállítása, akkor a β -glükozidázt és a glükóz fermentációjára szolgáló élesztőt együtt rögzítve (koimmobilizálva) folyamatos rendszerben használják [LEE et al., 1983]. A glükozidázok hidrolitikus aktivitásának élelmiszeripari alkalmazásai közül kizárólag a borászati alkalmazással foglalkoztam.

2.5.1.2 Az α - és β -glükózidáz hidrolitikus alkalmazása borászatban

A borokban az aromaanyagok koncentrációjának növelésében, azaz aromaprofiljának javításában hagyományos kémiai kezelések mellett egyre nagyobb szerepet játszanak az enzimes hidrolitikus módszerek. Mivel a borokban az aromaanyagok túlnyomó többsége alkoholos hidroxilcsoportot tartalmaz, de nagyrészt nem illékony formában, hanem β -glükozidos (túlnyomó többségében β -glükozidos) kötésben, a β -glükózidáz hidrolitikus aktivitásának az aromaanyagok felszabadítása szempontjából döntő a jelentősége. Azonban a borok saját β -glükózidáz aktivitása elenyésző, ezért szükséges exogén β -glükózidáz alkalmazása. Korábban erre a célra savas hidrolízissel próbálkoztak, de ellentétben az enzimes módszerrel a savas hidrolízis jelentősen megváltoztatta a termék eredeti aromaanyag összetételét [GUEGUEN et al., 1997]. Az exogén módon alkalmazott β -glükózidáz előnye az is, hogy sokkal hatékonyabb, mert kizárólag az aromaprofil szempontjából fontos hidroxil vegyületeket szabadítja fel [GÜNATA et al., 1985].

A β -glükózidáz borászati alkalmazása szempontjából a terpénalkoholokban gazdag, muskotályos borok a legfontosabbak. A mustban a terpénalkoholok nagy része glükozidos kötésben van, tehát az aromakarakter szempontjából inaktív. A bor készítés során ezekből a glükozidokból lassú folyamatban szabadulnak fel a terpénalkoholok, pótolva az elsődlegesen szabadon lévő, de időközben átalakult terpénalkohol-koncentrációt [HERNÁNDEZ et al., 2002].

A bor minőségét erősen meghatározza a szőlő kémiai összetétele. A bor alap-érzékszervi jellemzőit (édesség, keserűség, savanyúság, csípősség, stb.) a dipeptidek, cukrok, savak, alkaloidok és fenolok koncentrációja határozza meg. Ezen kívül a borok speciális zamatát számtalan illékony összetevő, aromaanyag adja meg. Ezek egy része a szőlőből származik, mások a préselés és a fermentáció alatt képződnek. Az illatos komponenseket az orr és a száj egyaránt érzékeli, ezek az érzetek jelentősen befolyásolják a borról alkotott összképet [BRAVDO, 2001].

A szőlő zamat anyagainak összességét nevezzük aromapotenciálnak [WILLIAMS et al., 1982]. A szőlő aromapotenciálnak meghatározása, valamint a szőlőlé és a bor vizsgálata során megállapították [GÜNATA et al., 1985; VASSEROT et al., 1993], hogy eredetileg az aromavegyületek jelentős része a szőlőbogyó héjában, glikozid formájában van jelen. Hidrolízis és oxidáció során ezen anyagok egy része elbomlik, de a préselés, fermentáció és tárolás alatt a kötött aromaanyagok (prekursorok) egy része felszabadul és így aktív illatanyaggá (aglikon) alakul. A frissen kiperéselt must mindössze 1 % arányban tartalmaz szabad illatkomponenseket [CORDONNIER et al., 1986].

Kémiai szerkezetüket tekintve ezek az aromaanyagok főleg izoprénvázas alkoholok (elsősorban monoterpének és norizoprenoidok), aralkil (tehát benzolgyűrűt is tartalmazó) alkoholok (benzil alkohol, 2-fenil-etanol, stb.) és fenolok (vanillin), valamint alifás vegyületek [MARAIS, 1983]. Megállapították, hogy a muskotályos borokra jellemző virágos, gyümölcsös aroma kialakulásáért főleg az illékony terpénvázas alkoholok (citronellol, linalool, nerol, gerániol, stb.) felelősek. A szőlő, a must és a bor egyik legjellemzőbb aromaképző anyagai tehát a terpének [STRAUSS et al., 1986]. Természetesen más illatos növényi részekből, például a virágokból is izoláltak ilyen terpénvázas alkoholokat, illetve azok *o*- β -D-glükozidjait [FRANCIS & ALLCOCK, 1969].

Az aromaprofilit a szabad (illékony) és kötött (nem illékony) aromavegyületek kombinációja adja meg [WILLIAMS et al., 1983]. Az aromakomponensek koncentrációját a környezeti tényezők (éghajlat, talaj), a szőlő fajtája, a gyümölcs állapota (érettség, rothadás), valamint a fermentáció körülményei (pH, hőmérséklet, a gyümölcs tápanyagai és mikroflórája) és a fermentáció utáni kezelések milyensége erősen befolyásolja [DIMITRIADIS & WILLIAMS, 1984]. Az aromaanyagok a zöld szövetekben keletkeznek glikozidok formájában, innen a gyümölcsbe vagy a virágba transzportálódnak. Itt első lépésben az α -arabinofuranozidáz és α -ramnozidáz aktiválódik, amelynek következtében szabaddá válnak azok a glükozidok, amelyek a β -glükozidáz szubsztrátját képezik. Ekkor a β -glükozidáz enzim aktiválódik és hidrolizálja a cukor-aromavegyület közötti glikozidos kötéseket [WILLIAMS et al., 1983; SHOSEYOV et al., 1990] és felszabadítja az aglikont. Az α -arabinofuranozidáz és α -ramnozidáz közreműködésére azért van szükség, mert a glikozidok cukor része nemcsak β -D-glükóz lehet, hanem 6-*O*- α -L-ramnozil- β -D-glükpiranóz, 6-*O*- α -L-arabinofuranozil- β -D-glükpiranóz és 6-*O*- β -D-arabinofuranozil- β -D-glükpiranóz is [VOIRIN et al., 1990; GUEGUEN et al., 1996].

A glikozidos kötésben lévő monoterpének nemcsak a szőlőbogyó saját β -glükozidáz aktivitásának következtében szabadulhatnak fel [GÜNATA et al., 1988], hanem a bogyó felületén lévő penészgombákban természetesen jelenlévő enzimek (β -glükozidáz, β -arabinozidáz, β -ramnozidáz, stb.) hatására is [WILLIAMS et al., 1982]. Ezen enzimek pH optimuma 5,0 érték körül van, így aktivitásuk nagy részét az érés utolsó szakaszában elvesztik [GÜNATA et al.; 1988, BRAVDO, 2001]. Ennek következtében ezek sem a természetes körülmények között működő enzimek, sem a szeszes erjedés során jelenlévő borészlesztőben működő β -glükozidáz aktivitás nem elegendő minden terpén-glikozid hidrolizálására, így a borkészítés során nem szabadulhat fel a teljes aromapotenciál.

Az aromaanyagok felszabadulásának folyamata meggyorsítható, ha az erjesztést β -glükózidáz aktivitással is rendelkező fajtaélesztővel végzik, illetve ha a forrásban lévő vagy már kiforrott borhoz β -glükózidázt tartalmazó enzimekészítményt adagolnak. Ez az oka annak, hogy exogén β -glükózidázt kezdtek alkalmazni a muskotályos borok aromaprofiljának javítására [SHOSEYOV et al., 1990; VASSEROT et al.; 1993, CABAROGLU et al., 2003].

A kutatások kezdeti szakaszában olyan, a borászatban már alkalmazott enzimekészítmények aromakomponenseket felszabadító hatását vizsgálták, amelyek számottevő β -glükózidáz aktivitással is rendelkeztek. Számos élesztőtörzset tanulmányoztak: *Hansenula* [VASSEROT et al., 1989], *Debaryomyces* [ROSI et al., 1995] és *Candida* [GUEGUEN et al., 1996]. GARCIA és munkatársai egy, a szőlőbogyó héjáról izolált, nagy β -glükózidáz aktivitással rendelkező élesztőtörzset (*Debaryomyces vanriji*) keverték össze a *Saccharomyces cerevisiae* törzsszel és ezt a keveréket oltóként alkalmazva vizsgálták azt, hogyan változik a borban az aromaanyag összetétel. Vizsgálataikhoz a bevált gyakorlatnak megfelelően GC-MS készüléket használtak [GARCIA et al., 2002]. A borászatban alkalmazott élesztők közül MIKLÓSY és PÖLÖS négy élesztőtörzs β -glükózidáz aktivitásának hatását vizsgálta tramini borokban [MIKLÓSY & PÖLÖS, 1995]. Kereskedelmi forgalomban is kapható liofilizált por formájában néhány hasonló enzimekészítmény a Fluka, Sigma, illetve Novo Nordisk forgalmazásában.

A borok aromaprofiljának utólagos módosításához β -glükózidáz közvetlen bevitele szükséges. A natív enzim alkalmazása azonban nem kívánatosan megnövelte a kezelt bor fehérje tartalmát [GALLIFUOCO et al., 1998], ezért az enzimet majdnem kizárólag rögzített formában alkalmazták. Ugyanezen szerzők ipari eljárást is kidolgoztak. Ennek során megállapították, hogy a rögzített enzimek használata gazdaságosabb, mivel könnyebb eltávolítani a borból és újrafelhasználást tesz lehetővé, tehát ipari méretekben költségcsökkentő [GALLIFUOCO et al., 1999]. Az immobilizált β -glükózidáz egyéb előnye volt, hogy az enzim produktivitása nőtt és az enzimátikus folyamatokat is könnyebb volt kézbe tartani [GUEGUEN et al., 1997].

GALLIFUOCO és munkatársai kitozánon rögzítettek β -glükózidázt glutáraldehydes térhálósítás segítségével. Optimális működési feltételeket biztosítva vizsgálták a rögzítés hatásfokát, a stabilitást, aktivitást és a glükóz, valamint az alkoholgátló hatását. A szerzők sikerrel alkalmazták a rögzített enzimet a borkészítés során a bor aroma értékének javítására [GALLIFUOCO et al., 1998]. GUEGUEN és munkatársai a muskotályos bor aromaminőségének javítására a *Candida molischima* 35M5N élesztőből származó β -glükózidáz enzimet Duolit A-568 anyagon rögzítettek. Kétféle

reaktor típussal (töltött ágyas és fluidágyas) igazolták, hogy a borászatban a rögzített enzim alkalmazása mind a költségek csökkentése, mind a bor minőségének javítása szempontjából kedvező lehet [GUEGUEN et al., 1996]. A szerzők azt is megállapították, hogy az inkubációs idő nagyon fontos paraméter az enzimes kezeléseknél. 1-9 óra között vizsgálták a β -glükózidáz kezeléssel elért hatást. A leghosszabb kezelés hozta a legjobb eredményt. Az enzim gomba eredetének tulajdonították a savas pH optimumot (kb. 3,5), és azt, hogy az enzim aktivitása alkohol jelenlétében fokozódik [GUEGUEN et al., 1997]. CALDINI és munkatársai *Aspergillus niger*-ből származó β -glükózidáz enzimet rögzítették szilárd, aktivált hordozóra szilanizált bentonitra, hogy így folyamatos borkezelési technológiát tegyenek lehetővé. A kezelés 48 órán át, 30°C, pH=4 értéken folyt [CALDINI ET AL., 2002].

Mivel a glükóz, mint termék jelenléte erősen gátolja (katabolit represszió) a β -glükózidáz működését, ezért a bor enzimes aromajavító kezelését csak a fermentáció utolsó szakaszában vagy utána érdemes elvégezni, mert ekkor a glükózkoncentráció már kicsi. Az etanol szintén gyakorolhat aktivitás csökkentő hatást az enzimre [GALLIFUOCO et al., 1998]. A nagyobb etanol tartalom kétféle úton csökkentheti a β -glükózidáz aromaprofil módosító tulajdonságát. Egyrészt közvetlenül inaktívalhatja az enzimet, másrészt indirekt módon károsíthatja a rögzített biokatalizátort úgy, hogy a szilárd hordozó szerkezetét módosítja [PEMBERTON et al., 1980]. A szerzők viszont úgy találták, hogy a *Trichoderma reesei*-ből származó β -glükózidáz aktivitását 8 g/100cm³ alkoholtartalom kis mértékben még növelte is [PEMBERTON et al., 1980]. A bor kezelésére alkalmazott, kitozánon rögzített mikrobiális eredetű β -glükózidáz enzim esetében is megvizsgálták az etanol hatását 3-12 v/v % alkoholtartalom mellett, 25°C hőmérsékleten. Ilyen paraméterek mellett nem tapasztalták a rögzített β -glükózidáz dezaktiválódását [GALLIFUOCO et al., 1999].

JENADET és munkatársai a vörösborokban vizsgálták az α - és β -glükózidázos kezelés hatását a rezveretrol koncentráció változására. A rezveretrol a koronária betegségek megelőzésében fejt ki kedvező hatást. Megállapították, hogy az α -glükózidáz nem volt hatással a rezveretrol koncentrációjának változására, azonban a β -glükózidáz hozzáadása következtében a rezveretrol koncentráció a kezelés első 24 órájában jelentősen megemelkedett [JENADET et al., 1994]. Megállapították, hogy vörösbor esetében a β -glükózidáz nagy koncentrációban való alkalmazása károsíthatja az antocianin színanyagokat [BLOM, 1983]. A szerző adós maradt a magyarázattal, de feltételezhető, hogy az enzim a polifenolos színanyagok glükozidjait is részben hidrolizálta.

A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagokban az endogén α - és a β -glükózidáz aktivitása általában olyan kicsi, hogy gyakorlatilag nem játszik szerepet a postharvest (szüretelés utáni) folyamatokban.

A borok aromaprofil módosításával kapcsolatos kísérleteimet a 4.3.1 fejezet tartalmazza.

2.5.2 A pektin-metil-észteráz élelmiszeripari jelentősége

A pektin-metil-észteráz igen eltérő szempontból játszhat szerepet az élelmiszeripari folyamatokban. Egyrészt glükózidázokhoz hasonlóan előfordulhat enzimek készítményekben, ugyanakkor egyes esetekben a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok jelentős saját PME aktivitásával is számolni kell.

A spontán fermentációknál izolálható élesztők – *Saccharomyces* [LIM et al., 1984], *Rhodotorula* [VAUGHN et al., 1969], *Cryptococcus* [FEDERICI, 1985], *Candida* [CALL et al., 1985] és *Kluyveromyces* [BARNBY et al., 1990] – mindegyike rendelkezik pektinbontó enzimekkel, valamint mindegyikről elmondható, hogy különböző gyümölcsök, így a szőlőbogyó felületén is telepeket képeznek. Azonban a borkészítés során a mustban maradó pektinek kolloidképző tulajdonságai nehézséget okoznak a bortisztítási folyamatokban. Ezt a problémát a gomba pektinbontó enzimjeinek musthoz való adagolásával szokták kiküszöbölni. Sajnos a gomba eredetű poliszacharázok nagymértékben szennyezettek olyan enzimekkel (például az arabinofuranozidáz), amelyek a borkészítés során nem kívánatosak [BLANCO et al., 1997], ezért ilyen esetekben enzimek készítmények adagolása előnyösebb lehet. Az ilyen enzimek készítmények természetesen pektin-metil-észterázt is tartalmaznak.

Gyakran alkalmaznak mikrobiális cellulázokat, hemicellulázokat és különböző pektinbontó enzimeket tartalmazó enzimkeverékeket az ipari biotechnológiai folyamatokban, az élelmiszeripar egyes területein (pl. légyártás, söripar, borászat, stb.), a textiliparban, a papíriparban, a mezőgazdaságban, stb. – természetesen az igényeknek megfelelően különböző összetételben. Például az alkalmazások egy részében, kevés metilészter tartalmú, előnyösen kocsonyásító pektin előállítására nagy PME tartalmú enzimek készítményeket használnak, mert hatásukra a pektin polimerizációs foka nem csökken, viszont hidrofilitása növekszik [BHAT, 2000]. Ilyen készítményeket citrusgyümölcsökből (pl. narancshéj) vagy paradicsomból előállíthatnak [GASZTONYI & LÁSZTITY, 1992]. A gyümölcslevek, sőt az oliva olaj eredményesebb kinyeréséhez, a viszkozitás csökkentése céljából alkalmazott enzimek készítményekben a pektinbontó enzimeken kívül

cellulázok és hemicellulázok is vannak [UHLING, 1998]. A gyümölcslevek tisztításánál a pektin és más poliszacharidok teljes lebontására alkalmazott preparátumokban igen nagy a poligalakturonázok aránya [BHAT, 2000].

A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagokban az endogén pektin-metil-észteráz aktivitása általában számottevő, nagysága a növényi fejlődés különböző fázisaiban változó, az érés során csökkenő tendenciát mutat [POZSÁR-HAJNAL & POLACSEK-RÁCZ, 1975]. A pektin-metil-észteráznak jelentős szerepe van az állomány kialakításában, másrészt nem kívánatos minőség romlást, túlértést és elfolyósodást is okoz. A pektin-metil-észteráz enzim a növényekben a lágyrothadás kezdetén igen aktív [VORA et al., 1999].

Bár ideális körülmények között a préseléskor a sejfalhoz kötött PME nem kerül át a gyümölcslebe, az ipari gyümölcsle gyártó berendezésekben azonban elkerülhetetlen, hogy a PME a lébe kerüljön az átjutó szennyező szilárd részecskékkel. Mivel a PME működése következtében a léből kicsapódó pektinsavak rontják a levek minőségét, a PME aktivitás szabályozása (csökkentése) fontos szerepet játszik a gyümölcs- és zöldséglé gyártásban [NAIDU & PANDA, 1999; DE ASSIS et al., 2001]. A magas turbiditású (pl. narancs, citrus, répa) levekben viszont azért nem kívánatos a pektin-metil-észteráz jelenléte, mert működése a felhős jelleg elvesztését és a koncentrátum gélesedését okozza. Ugyanis a PME szolgáltatja pektinsavat a szennyezésként jelen lévő poligalakturonázok lebontják [BASAK & RAMASWAMY, 1996]. A pektin hidrolizációja tiszta sérumból álló levet és kis metilészter tartalmú pektin Ca^{2+} ionnal képzett komplexéből álló flokkuláló réteget eredményez, amely nem felel meg a minőségi követelményeknek [SIMS et al., 1993].

Az energiaszegény élelmiszerek feljlesztése fontos szerepet játszik a táplálkozási szokások megváltoztatásában és az egészségkárosító hatások csökkentésében. Ez az egyik oka annak, hogy a zöldségitalok ásványianyag és vitamin tartalma, valamint rosttartalma nagy, ezért fogyasztásuk egyre inkább elterjedőben van. Dietetetikai szempontból a zöldséglevek összetétele még gyümölcslevekénél is előnyösebb, mivel a hasznos komponensek (vitaminok és ásványi anyagok) alacsony cukor és magas rosttartalom mellett vannak jelen [SALGÓ & LÁSZTITY, 1988].

A rostösszetevő oldhatatlan poliszacharidok (cellulóz, hemicellulóz és pektin) részben közvetlen hatást fejtenek ki (bélperisztaltika befolyásolása), részben a nagy észterezettségű pektinfrakció révén a koleszterin megkötésével a vér koleszterinszintjét csökkentik [JENKINS, 1980]. A könnyen emészthető diszacharidok aránya a zöldségekben igen alacsony, ezért energiatartalmuk kicsi. A zöldségek fehérje tartalma is elhanyagolható (a nitrogen mennyisége kb. 1%), biogén amin

tartalmuk viszont figyelemreméltó. Alacsony purin tartalmuk miatt köszvényesek is fogyaszthatják. A zöldségek antioxidáns anyagokat is tartalmaznak, ezért a rákos megbetegedések megelőzésében is szerepük lehet [NEWMAN et al., 1996].

A zöldségek közül kiemelkedő fontosságú és a dolgozat tárgyát részben képező sárgarépa (*Daucus carota*) a gyökérezőldségekhez tartozik. Összetevőit a **2. táblázat** tartalmazza. A sárgarépa β -karotin tartalma igen magas, ezért a sárgarépalé nagy potenciálú természetes β -karotin forrás lehet [SENTI & RIZEK, 1975]. Mivel sárgarépalé kémhatása közel semleges (pH=6,0), a romlási folyamatok beindulásának megelőzése érdekében valamilyen tartósító eljárást igényel. Ezek egyike a hőkezelés (115-121°C) [DESROSIER, 1976; KIM & GERBER, 1988]. Ilyen magas hőmérséklet hatására a táplálkozás szempontjából értékes anyagok (karotin, vitaminok) lebomlanak [KHAN et al., 1975; KIM & GERBER, 1988], valamint az élelmiszer eredeti íze is módosul.

2. táblázat. A sárgarépa (*Daucus carota*) összetevői [SALGÓ & LÁSZTITY, 1988].

Összetevő	Mennyiség, %	Összetevő	Mennyiség, mg/100g	Összetevő	Mennyiség, mg/100g
Száraz anyag	8,10-16,90	Kálium	190-355	C-vitamin	5,00-30,00
Fehérje	0,70-1,20	Nátrium	10-90	β -karotin	2,00-20,00
Zsír	0,20-0,30	Kalcium	25-10	Tiamin, B1	0,05-0,08
Összes cukor	2,10-7,30	Magnézium	15-25	Riboflavin, B2	0,03-0,08
Pektin	0,40-1,00	Foszfor	20-38	Niacin	0,40-1,50
Cellulóz	0,60-1,30	Vas	0,5-1,2	Pantoténsav	0,25-0,30
Összes sav	0,12-0,60	Nitrát	3,5-60	B6 vitamin	0,07-0,20

2.5.3 Élelmiszertartósítási eljárások

A sárgarépa és más zöldségek, valamint gyümölcsök, mint növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok és a belőlük készült termékek tárolása során az endogén pektin-metil-észteráz aktivitása hátrányt jelenthet. Bár az élelmiszertartósítási eljárások (pl. fagyasztás, szárítás, pasztörözés, sterilizálás, stb.) elsősorban a nem kívánatos mikrobák elpusztítására szolgálnak, alkalmazásuk során több minőségrontó hatású endogén enzim, így a pektin-metil-észteráz aktivitása is csökkenthető. Az élelmiszertartósítási eljárások közül csak azok irodalmát foglalom össze, amelyek ebből a szempontból jelentőséggel bírnak.

2.5.3.1 Hőkezeléses élelmiszer tartósítás

A hőkezelés a tradicionális élelmiszertartósítási eljárások egyike. A hagyományos pasztörözési és hősterilizációs eljárás lehetővé teszi a biztonságos élelmiszer előállítását. Hátránya a lassú felfűtési, valamint visszahűlési idő, amely – különösen nagy volumenben alkalmazva – az élelmiszer minőségét károsan befolyásolhatja. A konzervdobozban vagy üvegben hőkezelt zöldségek állománya nem kívánatos mértékben puhulhat. A fogyasztói igények az elmúlt néhány évben megváltoztak, egyre nagyobb hangsúly kerül arra, hogy az élelmiszer minél kevesebb feldolgozási lépésen essen át, mégis egészséges és biztonságos legyen. Különösen megnőtt a kereslet a friss jellegű, szilárd textúrájú és biztonságos zöldségek és gyümölcsök iránt [BIRÓ, 2001]. E probléma megoldásában segítséget nyújthatnak az alternatív tartósítási eljárások, mert alkalmazásukkal az élelmiszerek eredeti állapota csak kis mértékben változik [LADO & YOUSEF, 2002].

A natív sárgarépa PME hőinaktiválására vonatkozó eredményeimet a 4.1.3.3, míg a sárgarépakészítmények PME tartalmának hőinaktiválására vonatkozó eredményeimet a 4.3.2.1 és 4.3.2.2 fejezet tartalmazza. A brokkolira és a karfiolra vonatkozó előfőzési kísérleteimmel a 4.3.3.3 és 4.3.3.4 fejezet foglalkozik.

2.5.3.2 Alternatív élelmiszerkezelési eljárások

A tartósítási eljárások között olyan módszerekre volt szükség, amelyek a nem kívánatos mikroorganizmusokat és enzimeket úgy inaktiválják, hogy az élelmiszerek minőségét nem rontják. Ezek az úgynevezett alternatív élelmiszertartósítási eljárások, például a nagy nyomású módszer, a pulzáló elektromos mező, az ionizáló sugárzás és az ultraibolya ($0,5-20 \text{ J m}^{-2}$) sugárzás az elmúlt harminc évben indultak fejlődésnek. Az ilyen technikákat idegen kifejezéssel “non-thermal” módszereknek is nevezik [LADO & YOUSEF, 2002].

A nagy nyomású technika alkalmazása során, a tartósítandó élelmiszeripari terméket néhány percig nagy (100-1000 MPa) nyomásnak teszik ki [HENDRICKX et al., 1998]. A pulzáló elektromos mezejű technika (közismert rövidítéssel PEF) nagy intenzitású elektromos impulzusok néhány ezredmásodpercig történő közvetítésén alapszik [MINGYU et al., 1999]. A gamma- és az elektronsugárzás (ionizáló sugárzások) [FARKAS, 1998], valamint a nem ionizáló, germicid tulajdonságú ultraibolya sugárzás (200-280 nm) használata is elterjedt [BINTSIS et al., 2000]. Az alternatív élelmiszerkezelések során tehát nem alkalmaznak az élelmiszer minőségét károsító nagy hőmérsékletet, a módszerek során felszabaduló hő sem jelentős. Ezen technikák közül a szilárd

élelmiszerek kezelésére belga kutatók a nagynyomású technika és a gamma-sugárzás alkalmazását találták a legalkalmasabbnak [HENDRICKX et al., 1998]. Az alternatív élelmiszertartósítási eljárások közül a dolgozat csak a nagynyomású technikával foglalkozik.

2.5.3.3 A nagynyomású (HP) technika

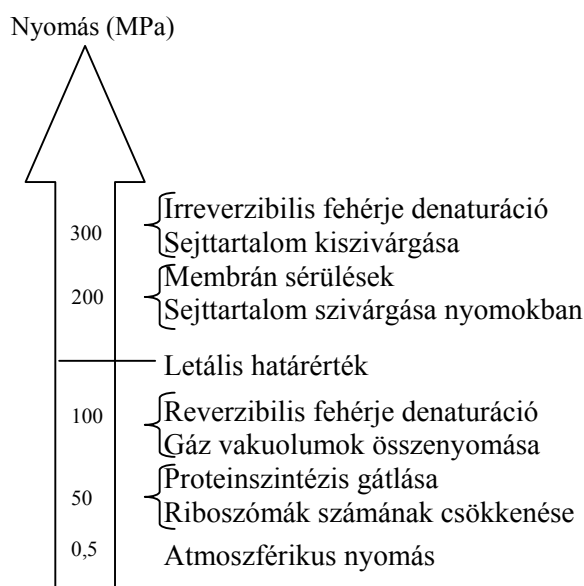
A nagynyomású technika kielégíti a növekvő fogyasztói igényt a kiváló minőségű termékek iránt, mivel megnövelt élettartamot biztosít az élelmiszereknek úgy, hogy közben a beltartalmi értékek (vitaminok, tápanyagok), valamint íz és illat nem vagy csak kis mértékben módosulnak, szemben a drasztikus hőkezelés okozta minőségromlással [KIMURA et al., 1994]. A HP technikát eleinte a csomagolt élelmiszerek kezelésére fejlesztették ki, azonban napjainkban a fejlesztéseknek köszönhetően folyamatos technológiákban is alkalmazható. Az első termék, amely a piacon megjelent egy Japánban elkészített dzsem volt 1992-ben. A HP technikát azóta sikerrel alkalmazzák mind folyékony, mind szilárd halmazállapotú élelmiszerek esetében világszerte, elsősorban Japánban, Észak Amerikában és Európában például gyümölcslevek, osztriga és egyéb tengeri élelmiszerek, lekvár, avokadópüré, salátaöntetek, tej, tojás, sonka, stb. kezelésére ipari méretekben is [LADO & YOUSEF, 2002; MATSER et al., 2003].

A HP technika nemcsak az élelmiszeriparban, hanem a gyógyszeriparban és minden olyan területen elterjedt, amely a biotechnológiához, illetve a biológiai tudományokhoz kapcsolódik. A nagynyomású módszer egyik legnagyobb előnye, hogy a mikroorganizmusok ellen már szobahőmérsékleten vagy akár még alacsonyabb hőmérsékleten is hatásos. Ezt ROYER fedezte fel 1895-ben, majd 1914-ben BRIDGMAN megállapította, hogy nagy nyomású kezelésnek alávetve a tojásfehérjét, az koagulál. [HAYASHI, 2002]. Kezdetben a módszer alkalmazhatóságának korlátot szabott a készülék felépítése (mérete), valamint az adiabatikus felmelegedés veszélye [LADO & YOUSEF, 2002]. Ezekkel a nehézségekkel ma is számolni kell, bár elkerülésükre léteznek technikai megoldások. A nagynyomású kezelés legfontosabb paraméterei a hőmérséklet, a nyomás és a kezelési idő. Az optimális paraméterek beállításánál figyelembe kell venni a termék, az edény és az olaj hőmérsékletét, az adiabatikus felmelegedést, a nyomást, a kezelési időt és az alkalmazott kezelések számát. Az adiabatikus felmelegedés egyenlettel leírható, azonban a legtöbb anyag jellemzői nem ismertek, főleg mivel ezeket a tulajdonságokat a nyomás és a hőmérséklet határozza meg. A hagyományos hőkezelésekkel szemben mindenképpen előnyt jelent, hogy az adiabatikus

felmelegedés a nyomásnövekedés során egyenletesen oszlik el a kezelt anyagban [MATSER et al., 2003].

Ha mikrobiális, növényi vagy állati sejteket tartalmazó élelmiszeripari alapanyagokat 100-400 MPa nagynyomású kezelésnek vetik alá, akkor az extracelluláris anyagok beáramlanak a sejtekbe és szövetekbe. Elektronmikroszkópos felvételek igazolják, hogy a nagynyomású kezelés hatására a sejtmembránokban és lizoszómákban, valamint egyéb sejtalkotókban szignifikáns töredezés és károsodás megy végbe. Vizes közegben 200 MPa nyomás alatt a fehérjék disszociálódnak, ez a hatásmechanizmus még nem teljesen tisztázott [HAYASHI, 2002]. A vegetatív mikroorganizmusok inaktiválódnak 400-600 MPa hatására a membrán sérülése és fehérjedenaturáció következtében. A beáramlás miatt az intracelluláris pH lecsökken, így a membránhoz kötött enzimek aktivitása csökken, azonban a színért és az illatért felelős kisebb molekulák és a vitaminok sértetlenek maradnak. A nagy nyomás színre gyakorolt hatása erősen terményfüggő, de a zöld színű (klorofill tartalmú) zöldségek kivételével, amelyek kismértékű színkárosodást szenvednek, nem történik színromlás. A sárgarépa esetében kiemelkedően szép színű maradt a termék a nagynyomású sterilizálás után is. Végeredményként tehát friss, de pasztőrözött anyagot eredményez a kezelés, amely 4-6°C hőmérsékleten hosszú ideig eltartható [MATSER et al., 2003].

Az enzimek aktív helyének szerkezetében bekövetkező kis módosulások is a biológiai aktivitás elvesztéséhez vagy a szubsztrát-specifitás megváltozásához vezethetnek. A nagy nyomás enzimekre gyakorolt hatását a nyomás értékétől függően legalább három csoportba sorolhatjuk (**3. ábra**). A monomer enzimek esetében az aktivitás növekedését figyelték meg 0,1-100 MPa alatt. Más enzimeknél csökkent a lipidrteg oldhatósága és a fehérje szerkezet reverzibilis változásokat szenvedett. A kettős lipidrteg reverzibilis fázis átalakuláson megy keresztül, a fehérje egységek pedig disszociálnak 100-220 MPa nyomás hatására. Ezek az átalakulások a lipidrteg és a fehérje szeparációját okozzák, így a membránban lyukak keletkeznek. A fehérje háromdimenziós szerkezete irreverzibilisen sérül (megszűnik), valamint a kettős lipidrteg feldarabolódik, s így a teljes membránszerkezet sérül 220 MPa és ennél nagyobb nyomásérték következtében [HENDRICKX et al., 1998; HAYASHI, 2002]. Valószínűleg ezek a változások fokozzák a nagy nyomásnak kitett élelmiszerekben a lipidperoxidációra való érzékenységet [TUBOLY et al., 2003].



3. ábra. A nagy nyomás hatására bekövetkező szerkezeti és funkcionális változások mikroorganizmusok esetében [LADO & JOUSEF, 2002].

A HP technikák alkalmazásakor elsősorban a nyomás nagysága, a közeg kémhatása, összetétele, valamint az alkalmazott hőmérséklet szabja meg a minőséget meghatározó enzimek inaktiválását, de a folyamat eredményességét befolyásolják az egyes enzimek egyéni sajátosságai is [HENDRICKX et al., 1998]. Ezért kulcsfontosságú ezen enzimek inaktiválódási paramétereinek pontos ismerete az élelmiszerek minőségének megőrzése céljából végzett nagynyomású kezelésnél. Ezek a tapasztalati adatok ugyanis a kezelés megtervezéséhez és optimalásához nyújtanak segítséget.

Az élelmiszerek minőségét meghatározó enzimek közül egyik a PME. Az élelmiszerek PME tartalmának nagynyomású inaktiválása számos előnnyel bír a hagyományos hőkezelési technológiákhoz képest [HENDRICKX et al., 1998]. OGAWA és munkatársai megállapították, hogy a narancs PME 600 MPa nyomás hatására szinte teljesen és irreverzibilisen inaktiválódik [OGAWA et al., 1990]. A paradicsomban pektin-metil-észteráz a narancs PME enzimnél nyomástűrőbb és elsőrendű inaktiválódási kinetikát követ [SEYDERHELM et al., 1996]. Ezen kívül még számos gyümölcsben és zöldségben vizsgálták a PME inaktiválódását a HP technika alkalmazása során (pl. alma, barack, paradicsom, eper, banán, sárgarépa, stb.) [NGUYEN et al., 2000.; BUTZ et al., 2001].

A natív sárgarépa PME nagynyomású inaktiválására vonatkozó eredményeimet a 4.1.3.4, valamint a sárgarépa készítmények PME tartalmának nagynyomású inaktiválására vonatkozó eredményeimet a 4.3.2.3 és a 4.3.2.4 fejezetek tartalmazzák.

2.6 A hidroláz enzimek preparatív célú alkalmazása

Az élő szervezetekben lejátszódó szerves kémiai folyamatokat katalizáló enzimeket évtizedek óta használják szerves preparatív célokra. E felhasználásnak több alapvető típusa van. Az enzimkatalizálta szerves szintézisek egy része az enzimek erős régió- és sztereospecifitásán alapul és anyagkeverékek szétválasztásával kapcsolatos (pl. a D és L aminosavak ipari méretű elválasztása) [SZAJÁNI, 1980]. Az enzimes reakciók alkalmazásának egy másik része sok szempontból modellezi a természetes körülményeket. Az élő szervezetben uralkodó körülmények között a természetes szubsztráthoz igen hasonló szerkezetű vegyületek a megfelelő enzimek hatására könnyen átalakíthatók. Vannak olyan reakciótípusok, amelyek során az enzimet a természetestől merőben eltérő körülmények között használják.

Ennek megfelelően a harmadik enzimosztályba tartozó hidrolázok is igen sokféle vegyület szintézisére alkalmasak. Hidrolázok segítségével az észterek karbonsavakká és alkoholokká, a savamidok karbonsavakká és aminokká, míg a glükozidok cukrokká és hidroxil vegyületekké hidrolizálhatók [BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999]. A proteázok segítségével tehát aminosavakat [CHAIKEN et al., 1992], a lipázok, mint észterázok segítségével zsírsavakat [CHEN & SIH, 1989] és a glikozidázok [CROUT et al., 1992] segítségével pedig cukrokat állítanak elő. A β -galaktozidázt például ipari méretekben alkalmazzák a laktóz hidrolízisére [VAN RANTWIJK, 1999]. A hidrolázokat gyakran alkalmazzák aktivált szubsztrátot igényelő biotranszformációs reakciókban, elsősorban transzpeptidációs, transzészterifikációs és transzglykozilációs folyamatokban is biológiailag aktív peptidek, észterek és glikozidok előállítására, [VAN RANTWIJK, 1999].

A hidrolázok által katalizált hidrolitikus folyamatok, olyan egyensúlyi reakciók, amelyek iránya vizes oldatban gyakorlatilag teljesen a hasítás felé tolódott el. Szerves oldószerek jelenlétében a víztartalom értelemszerűen csökken, így lehetőség nyílik arra, hogy az enzim a folyamatot a szintézis irányába katalizálja. Ezeket a reakciókat JAKUBKE *reverz hidrolitikus folyamatoknak* nevezte el [JAKUBKE, 1991]. A reverz hidrolízis során a reakcióelegynek annyi vizet feltétlenül kell tartalmazni, amely az enzim aktív konformációját még biztosítani képes [ADLERCREUTZ, 1993].

E szerves kémiai reakciók tanulmányozásának nemcsak elméleti jelentősége van. Az acil-aminosavak, valamint di- és oligopeptidek igen fontos közti- és végtermékek elsősorban a gyógyszeripar és az élelmiszeripar szempontjából. Előállításukra számos szintetikus módszer ismeretes. A kémiai szintéziseknél a racemizáció, valamint a biológiai aktivitás elvesztése, illetve a termékek megváltozása állandó problémát jelent. Nem zárható ki teljes mértékben a melléktermékek keletkezése sem. Ezek a nehézségek a regio- és sztereospecifikus enzimek alkalmazásával kiküszöbölhetőek.

A reverz hidrolitikus peptid szintézissel elsőként 1991-ben JAKUBKE foglalkozott [JAKUBKE, 1991]. A transzpeptidációs folyamatok legismertebb ipari alkalmazása az aszpartám gyártás [ADISSON et al., 1988]. Az észterázok esetében elsősorban a lipáz kerül előtérbe, amelyet elterjedten alkalmaznak például az alkil-butirátok szintézisére reverz hidrolitikus folyamatban [MONOT et al., 1991]. A folyamatnak rengeteg előnye van, de hátrányokkal is rendelkezik. Néhány szubsztrát nem oldódik szerves közegben és egyes oldószerek környezeti kockázata is jelentős. A továbbiakban a glükózidázok preparatív alkalmazásával külön fejezet foglalkozik.

2.6.1 A glükózidázok preparatív alkalmazása, *O*-glükózidok szintézise

A glikozidázokat, illetve a dolgozat szempontjából kiemelkedő fontosságú glükózidázokat preparatív céllal végrehajtott hidrolitikus reakcióban csak ritkán, különleges aglikonok felszabadítására alkalmazzák. A transzglikozilezési és a reverz hidrolitikus szintézis reakciókat azonban kiterjedten használják *O*-glükózidok előállítására.

Az egyszerű cukroknak (elsősorban glükóznak) alifás alkoholokkal képzett *O*-glükózidjai a nem ionos, felületaktív anyagok egyik nagyon fontos csoportját képezik, antimikróbás tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint biológiailag lebonthatók [PAINTRARUX et al., 1995]. Közülük néhányat, elsősorban az *O*-oktil- β -D-glükózt nemcsak az élelmiszer-, valamint a gyógyszeriparban alkalmazzák sikeresen [HUGHES & LEW, 1970], hanem az állati szövetek membránjai számára is alkalmas detergensnek bizonyult [LIN et al., 1979]. Az *O*-alkil-glükózidok előnyös tulajdonságai közé tartozik még, hogy az acil-glikozidok szintézisében szubsztrátként funkcionálnak [ADELHORST et al., 1990]. Az acil-glikozidok szintén felületaktív anyagok. Az enzimes úton előállított *O*-allil-, valamint az *O*-benzil- β -D-glükóz, az *O*-allil- β -D-galaktóz nagyon fontos intermedier a szénhidrát kémiában. Sőt általában az *O*-allil-glikozidok fontos monomerek a glikopolimerek szintézisében [ADELHORST et al., 1990]. A biológiailag fontos, felületaktív

tulajdonságú *O*-glikozidok szintézisére alkalmas módszerek kifejlesztésével szinte már az 1900-as évek elejétől kezdve foglalkoznak [BOCHOKOV & ZAIKOV, 1979].

Az *O*-glikozidok szerves szintetikus előállítása többnyire bonyolult, több lépésből álló folyamat, amely védőcsoportok alkalmazását, valamint a regio-, és sztereoizomerek szétválasztását is magába foglalhatja [FLOWERS, 1987]. A *O*-glikozidok enzimes előállításának irodalma azért terjedelmes, mert közéjük tartoznak az oligoszacharidok is. Erre a feladatra két enzimosztály enzimei is alkalmasak, a glikoziltranszferázok, amelyek csak transzglikozilezési reakcióban és a gliko-hidrolázok (azaz a glikozidázok), amelyek reverz hidrolízissel is képesek az *O*-glikozidok szintézisére. A glikozidázok tehát annyiban alkalmasabbak, az *O*-glikozidok szintézisére, hogy mind transzglikozilezési mind reverz hidrolitikus reakciókban eredményesek [VAN RANTWIJK et al., 1999]. A reverz hidrolízis annyival is megfelelőbb módszernek látszik az *O*-glikozidok szintézisére, hogy segítségével kiküszöbölhetőek a transzglikozilezés és a szerves módszerek hátrányai. Az utóbb említett két folyamat ugyanis aktivált cukor-származékot igényel, amelynek következtében ezek a módszerek nehézkesek és drágák.

2.6.1.1 A *O*-glikozidok előállítása transzglikozilezéssel

Ebben a folyamatban a kötést kialakító glikozil transzferáz enzim és egy aktivált glikozil donor, mint például a kereskedelmi forgalomban kapható *O*-fenil- vagy *O*-4-nitro-fenil-glikozid alkalmazása szükséges [MITSUO et al., 1984]. Az aktivált donor előállítása gyakran nehézkes, kémiai szintézist, vagy egy korábbi enzimes reakciót igényel, ezért alkalmazása bonyolíthatja a szintézist és növeli a költségeket. Az *O*-fenil-glikozidokat például általában enantiomer keveréket eredményező és rezolválást igénylő kémiai szintézissel állítják elő. Léteznek olyan helyettesített *O*-fenol-glikozidok, amelyeket növényekből izolálnak [BURGER et al., 1987]. A transzglikozilezés során ráadásul a glikozil donorok összekapcsolódása révén nehezen eltávolítható melléktermék is keletkezhet a reakcióelegyben [DE BRUYNE et al., 1979].

A transzglikolízis reakcióban a *O*-glikozidok akkumulálódása a felbomlás és a képződés között kialakult gyenge egyensúlytól függ [RAVET et al., 1993]. A transzglikozilezési reakciókban többféle glikozidázt alkalmaztak, az irodalomban az igen elterjedten használt β -glükózidázon és β -galaktozidázon kívül a legkülönbözőbb glikozidázok is előfordultak, gyakran rögzítve. Reakcióelegyként nemcsak vizes közeget alkalmaztak, hanem kis víztartalmú szerves oldószert, de szerves közeg majdnem mindig a glikozilező (primer vagy szekunder) alkohol volt. Sokáig az volt a

feltételezés, hogy tercier alkoholokból nem lehet transzglykozilezéssel *O*-alkil-glükozidokat előállítani. Az utóbbi években azonban igen jó hozamú reakciókat írtak le növényi (kasszavából izolált) β -glükozidázzal C_4 - C_6 tercier alkoholokkal abban az esetben, ha a glükóz donor a *O*-4-nitro-fenil- β -D-glükóz volt [SVASTI et al., 2003]. KANNAN és munkatársai ugyanezzel a glükóz transzferrel végeztek transzglykozilezési reakciót szerves oldószeres közegben. A stabilitási vizsgálataik során megállapították, hogy 30 % szerves oldószerben (dioxán, dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid, aceton és acetonitril) a natív mandula β -glükozidáz egy óra inkubáció után eredeti aktivitásának 56-95 százalékát megőrzi, azonban magasabb, a reverz hidrolízisre is alkalmas szerves oldószer koncentrációkban a stabilitást nem vizsgálták [KANNAN et al., 2004].

ANDERSSON és ADLRCREUTZ kis víztartalmú hexanosos reakcióelegyben *O*-4-nitro-fenil- β -D-glükózból állítottak elő *O*-hexil- β -D-glükózt Celitre rögzített β -glükozidáz segítségével [ANDERSSON & ADLRCREUTZ, 2001]. ASANO és munkatársai glükóz donorként maltózt használtak [ASANO et al., 1991]. Különböző forrásból származó β -galaktozidáz enzimeket is sikerrel alkalmaztak transzglykozilezési reakciókban, például segítségével laktózból galakto-oligoszacharidokat állítottak elő [DEL-VAL & OTERO, 2003]. Az *Aspergillus niger*ből izolált β -xilozidáz enzim β -1,4-D-xilobiózból maltóz jelenlétében transzglykozilezési reakcióban hetero-oligoszacharidokat szintetizált [KIZAWA et al., 1991]. A cellobióz első *in vitro*, transzglykozilezési reakcióval történő szintézisét celluláz enzimmal β -D-cellobiozil-fluorid monomer segítségével hajtották végre [KOBAYASHI et al., 1991]. A keserű flavon glikozidok, mint például a naringin és neoheszperidin előállíthatók UDP-ramnóz, mint donor és ramnozil-transzferáz segítségével [BAR-PELED et al., 1991], a szacharóz előállítására pedig fruktozil-transzferázt alkalmaztak [JONES et al., 1992]. MAKROPOULOU *Fusarium oxysporum* mikrobából izolált β -glükozidáz enzimet alkalmazott alkil- β -D-glükozidok előállítására különböző diszacharidokból, transzglykozilezési reakcióban [MAKROPOULOU et al., 1998]. Az enzimes *O*-glikopeptid szintéziseket is általában transzglykozilezési reakcióval végezték [SCHULZ & KUNZ, 1992].

2.6.1.2 A *O*-glükozidok előállítása reverz hidrolízissel

A hidrolázok által katalizált és korábban már említett reverz hidrolízishez tehát az szükséges, hogy az enzim katalizálta reakció egyensúlyának iránya az alacsony víztartalom közvetkeztében a hidrolízis helyett a kapcsolás, azaz a szintézis felé tolódjék el. Az egyensúly eltolására több megközelítés is létezik. Az egyik szerint a reakcióelegyhez vízzel elegendő oldószert adagolnak,

amely lecsökkenti a termodinamikus vízaktivitást, így segíti elő a kapcsolási reakciót. Ebben az esetben a reakcióelegy egyfázisúnak tekinthető. A mandulából izolált β -glükózidáz a propanol, mint reakcióközeg esetén minimum 0,4-0,5 vízaktivitást [VIC & CROUT, 1995], míg acetonitril [VIC et al., 1995], 1-oktanol [LJUNGER et al., 1994] és tercier-butil alkohol esetén, pedig 0,8 vízaktivitást igényel [VIC & CROUT, 1994]. A vízaktivitást az oldat felett kialakuló egyensúlyi parciális nyomásnak és a tiszta komponens (víz) gőznyomásának hányadosa adja meg.

VIC és munkatársai a glükózt helyettesített 2-hidroxi-benzil alkohollal (szalicil) reagáltatták 10 % vizet tartalmazó *t*-butanolban, acetonban, illetve acetonitrilben, és úgy találták, hogy egy napos reakció után a mandula β -glükózidáz eredeti aktivitásának jelentős részét még megőrizte. A reverz hidrolitikus reakciót 6 napig 45°C hőmérsékleten végezték. A tercier butanol kivéve (18 %) 10 % alatti hozamokat tapasztaltak, sőt ha a hidroxil vegyületet oktanolra cserélték 10 % vizet tartalmazó tercier butanol reakcióelegy sem volt ilyen sikeres (8% hozam). Gyakorlatilag ez volt egyetlen olyan próbálkozás a szerves oldószerek, mint hígítók bevezetésére, amely némi sikerrel járt. A mandula β -glükózidáz teljes inaktiválódását tapasztalták 10 % vizet tartalmazó egyéb vízzel elegyedő szerves oldószerekben (dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid, dioxán, tetra-hidro-furán) [VIC et al., 1995].

A kétfázisú reakcióelegy esetében az egyensúly eltolására az elegyhez vízzel nem elegyedő oldószert adagolnak. Ebben az esetben a hidrofób termék a szerves fázisban fog felhalmozódni, így a koncentrációja a vizes közegben alacsony lesz, vagyis újabb és újabb termék fog szintetizálódni [LJUNGER et al., 1994]. A kétfázisú rendszereket sikerrel alkalmazták alkil-glükózidok előállítására hidrofób alkoholokat alkalmazva egyszerre szubsztrátként és oldószerként [VULFSON et al., 1990; PAINTRAROUX et al., 1995; KOBAYASHI et al., 2000]. A glükózidáz enzimek (elsősorban az α - és β -glükózidáz, valamint glükóamiláz) által katalizált *o*-glükózid szintéziseket LAROUTE és WILLEMOT tanulmányozta abból a szempontból, hogy a víztartalom, a vízaktivitás és a szerves közeg tulajdonságai milyen hatással vannak a kapcsolási reakció hozamára [LAROUTE & WILLEMOT, 1992]. Úgy találták, hogy a reverz hidrolitikus reakciókban a β -glükózidáz sokkal hatékonyabb, mint a glükóamiláz. Más szerzők szerint különböző alkoholok, primer- és szekunder alkoholok, valamint diolok (1,2-propándiol, 1,2-butándiol) és poliolok (D-xylitol, D-galaktitol) is alkalmazhatóak kétfázisú reakciókban [SHINOYAMA & YASUI, 1988].

A reverz hidrolízis folyamatok vizes közegben való végrehajtására is található példa az irodalomban. Magas cukorkoncentrációt és viszonylag nagy, 55°C hőmérsékletet alkalmaztak

trehalóz és szacharóz származékok glikozidázok katalizálta szintéziséhez [SMITH et al., 1997]. A glikozidázok által katalizált kapcsolási reakciókkal 1912-ben foglalkoztak először [BOURQUELOT & BRIDEL, 1912].

A reverz hidrolitikus reakciók általában több napig tartanak, ezért a szerves közeg enzimek oldhatóságára, stabilitására és aktivitására gyakorolt hatását általában a reakció közben is vizsgálták mind az egyfázisú, mind a kétfázisú reakcióelegyekben. A β -glükózidázra és más hidrolázokra általában csökkent oldhatóságot, stabilitást és aktivitást tapasztaltak [CANTARELLA et al., 1991; GUPTA, 1992]. Mások megállapították, hogy a szubsztrát jelenléte, így az enzim-szubsztrát komplex kialakulása stabilizálóan hat a β -glükózidázra a szerves oldószeres közegben [PAINTRARUX et al., 1996].

Más szerzők ugyanakkor azt tapasztalták, hogy a mandula β -glükózidáz 10 % vizet tartalmazó acetonitriles közegben napokig megőrzi aktivitását 40°C hőmérsékleten [VIC et al., 1995], illetve tercier-butil alkoholban, 50°C hőmérsékleten [VIC & CROUT, 1994]. SIMON és munkatársai úgy vélték, hogy a hidrolitikus enzimek konformációs stabilitása alapvetően az oldószer és a fehérje közötti kölcsönhatásoktól és az enzimszerkezetétől függ. Mind a nagyon alacsony, mind a nagyon magas szerves oldószer tartalom a víz és a fehérje közötti kölcsönhatásoknak kedvez, különösen a vízzel nem elegyedő szerves oldószerek esetében [SIMON et al., 1998].

Közismert, hogy a glikozidázok erősebben képesek kötődni a hidrofób és a kevésbé hidrofil szubsztrátokhoz, mint az erősen hidrofilekhez [MITSUO et al., 1984]. Ennek ellenére gyakorlatilag sikertelennek bizonyult az a törekvés, hogy a kapcsolási reakciókban az alkoholokat, mint hígító közeget részben más, akár hidrofób szerves oldószerrel helyettesítsék. Ugyanis a szerves oldószerek különböző képpen befolyásolhatják az enzimek tulajdonságait. Reakcióba léphetnek az aktív centrum körül lévő és a működéshez elengedhetetlenül szükséges hidrátburokkal vagy a fehérje szerkezetet módosíthatják, miközben reakcióba lépnek az enzim oldalláncaival [CARREA et al., 1995]. A hígítószerek bevezetésének kudarca több szerző szerint azzal magyarázható, hogy a szerves oldószerek lecsökkentik a szubsztrát és az enzim kötőhelyén lévő aminosav oldalláncok közötti hidrofób kölcsönhatás erősségét [NILSSON, 1986].

A reverz hidrolitikus reakciók hozama általában elég alacsony. Ennek több oka is lehet. Egyrészt az enzim inaktiválódhat a szerves közegben a reakció során. Másrészt az aktívan maradt enzim a feldolgozás során alkalmazott vizes közegben a termék részleges hidrolízisét idézheti elő.

Ennek kiküszöbölésére ma már mutáns glikozil hidrolázokat alkalmaznak [MACKENZIE et al., 1998], az úgynevezett glükoszintázokat, amely enzimek nagyon hatásosan szintetizálnak glükozidokat, de nem hidrolizálják őket [MORACCI et al., 2001]. Mivel az enzimek immobilizálása általában stabilizálóan hat [KLIBANOV, 1983], ezért a reverz hidrolitikus reakciókban egyre elterjedtebben alkalmaznak rögzített enzimeket.

A β -glükozidáz enzim által katalizált reverz hidrolitikus reakciókra vonatkozó eredményeimet a 4.4 fejezet tartalmazza.

2.6.2 A pektin-metil-észteráz reverz hidrolitikus felhasználása

Irodalomban a pektin-metil-észteráz enzim reverz hidrolitikus felhasználására nem található példa. Feltehető, hogy részben a szubsztrát bonyolult, összetett szerkezete miatt, részben a termék könnyű elérhetősége miatt nem foglalkoztak ezzel a témával.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A kísérletek helye és azok műszerezettsége

3.1.1 A kísérletek helye

A dolgozat kísérleti munkája a Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszékén történt. A sárgarépa pektin-metil-észterázt ösztöndíjas évem alatt (2002) a Leuveni Katolikus Egyetem, Élelmiszermikrobiológia és Élelmiszertechnológia Tanszékén (Catholic University of Leuven, Laboratory of Food Technology, Belgium) vizsgáltam. Egyes kísérletek elvégzésére más helyeken került sor:

- Richter Gedeon Rt. (a rögzített glükozidázok liofilezése),
- Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia Tanszék (az oszlopkromatográfiás és szerkezetazonosítással kapcsolatos vizsgálatok),
- Promotor Borászati Tangazdaság (a zöldveltelini, szürkebarát és olaszrizling típusú szőlőt tartalmazó bor készítése).

3.1.2 A kísérletek helyének műszerezettsége

3.1.2.1 Belgiumi berendezések

- Centrifuga (J2-Hs Centrifuge, Beckmans, USA),
- Äkta Prime (Amersham Biosciences, Svédország, **VI. melléklet**),
- SDS-page (Amersham PhastSystem, Amersham Biosciences, Svédország),
- Eppendorf centrifuga (5417R Hamburg, Németország),
- Vízfürdő (Haake B3 fisons, Brüsszel, Belgium),
- Nagynyomású készülék (Resato, Roden, Hollandia, **VI. melléklet**),
- Vákuumkamrás csomagolóberendezés (Multivac KM 100-3M, Németország).

3.1.2.2 Magyarországi berendezések

- Liofilező berendezés, Edwards Freeze Dryer Super Modulo (BOC Edwards, Sussex, EK).
- Centrifuga, Mikro 22-R, 1015 rotor (Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen, Németország).
- HPTLC, Chrompress (LABOR-MIM, Magyarország)

- Denzitométer Ultrascan XL LKB,
- Varian EM-390 90 MHz spektroszkóp (Magyarország),
- Spektrofotométer, Spektromom 195 D (Magyarország),
- Gázkromatográf, MEGA 5300 (Carlo Elba, Milano, Olaszország),
 - Gázkromatográfiás oszlopok, J&W DB-1 (30 m x 0,35 mm belső átmérő, filmvastagság: 0,25 μ m) és DB-WAX (30 m x 0,32 mm belső átmérő, filmvastagság: 0,25 μ m),
 - Gázkromatográfiás lángionizációs FID detektor,
 - EMMI 2000 elektromos értékelő rendszer.

3.2 A natív α - és β -glükozidáz

3.2.1 A glükozidázok vizsgálatához alkalmazott vegyszerek

A glükozidázok vizsgálata során szubsztrátként a D-glükózt, a D-cellobiózt és szacharózt (Fluka) használtam. Szerves oldószerként *n*-butanolt, *n*-pentanolt, *n*-hexanolt, dimetil-formamidot (Sigma-Aldrich); ciklohexanolt, 2-fenoxi-etanolt, 2-metoxi-etanolt (Reanal, Budapest); 2-butoxi-etanolt, és 1,2-diacetoxi-etánt (etilén-glikol-diacetát, DAE), valamint triacetint (glicerol-triacetát, TRA) (Fluka) alkalmaztam. Az oldószerek tulajdonságait a **VII. mellékletben** tüntettem fel. A pufferek készítéséhez a szokásos vegyszereket (Reanal) alkalmaztam (pl. nátrium-acetát, trietanol-amin, nátrium-hidroxid, stb.). Az enzimek rögzítéséhez használt vegyszerek (glutáraldehid, 1-ciklohexil-3-(morfolinoetil)-karbodiimid meto-*p*-toluol szulfonátot, azaz CMC, stb.) Reanal termékek voltak.

Az enzimek rögzítéséhez használt Akrilex C-100 hordozó (Reanal) részecske mérete 120-300 μ m, kötő kapacitása $6,2 \pm 0,3$ mekv xerogél¹ volt. A csak fehérjét tartalmazó felületi réteget *Bacillus stearothermophilus* PV72 törzsből állították elő az Ultraszerkezetkutató Központban és a Ludwig Boltzmann Ultraszerkezetkutató Intézetben (Universität für Bodenkultur, Bécs, Ausztria) [SLEYTR et al., 1986]. A bor aromaprofil módosításának vizsgálatánál az extraháláshoz HPLC tisztaságú dietil-étert és pentánt (Scharlau, Madrid, Spanyolország) használtam.

A laboratóriumi műveletek során mindig ionmentes vizet használtam és a keverést mindig mágneses keverővel végeztem. Valamennyi bemutatott eredményem három párhuzamos kísérlet átlagából származik.

3.2.2 A glükóz tartalom meghatározása

Mivel gyakorlatilag valamennyi, a glükozidázokkal kapcsolatos mérés a reakcióelegyek glükóztartalmának meghatározásán alapult, a glükóztartalom meghatározására több fotometriás módszert kipróbáltam. Közülük az olcsó és a redukáló cukor tartalmat meghatározó dinitroszalicilsavas (DINISA) módszer [HOSTETTELER et al., 1951] és a hexokinázt és glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt alkalmazó enzimes analízis [BEUTLER et al., 1974] általam módosított előíratait ismertetem.

3.2.2.1 A glükóz koncentráció meghatározása DINISA módszerrel

0,5 M DINISA oldat

11,4 g 3,5-dinitro-szalicilsavat annyi 0,25 M nátrium-hidroxid oldatban (10 mg ml^{-1}) oldottam, hogy az elegy térfogata 1 l legyen.

Reakcióelegyek glükóz tartalmának meghatározása

A mérési elegy 100 μl mérendő mintát (glükóz koncentráció 0,15 – 1 mM) 900 μl vizet és 1000 μl DINISA oldatot tartalmazott. A kémcsövek felkevert tartalmát pontosan 5 percig 100°C hőmérsékleten tartottam, majd 5 percig hideg vízben állítva lehűtöttem, végül 540 nm hullámhosszon fotometráltam.

3.2.2.2 A glükóztartalom meghatározása módosított enzimes módszerrel

Glükóz analizáló oldat

100 mg NADP^+ , 232 mg ATP és 24 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 ml 1M trietanol-amin puffer ($\text{pH}=7,6$) segítségével készített oldata.

Glükóz analizáló enzimkeverék

320 U ($\mu\text{mol min}^{-1}$) hexokináz + 160 ($\mu\text{mol min}^{-1}$) glükóz-6-foszfát dehidrogenáz 1,40 ml 3,2 M ammónium-szulfáttal készített szuszpenziója, amelynek kémhatását 0,1 M kálium-hidroxid oldattal $\text{pH}=6,0$ értékre állítottam.

Reakcióelegyek glükóz tartalmának meghatározása

A mérési elegy 30 μl mérendő mintát (glükóz koncentráció 0,03 – 0,15 mM), 820 μl vizet és 250 μl glükóz analizáló oldatot tartalmazott. A fotométert 340 nm hullámhosszon a mérési elegyre nulláztam, majd a rendszerhez 5 μl glükóz analizáló enzimkeveréket adtam és az abszorbanciát

végállapotig mértem. Ha a mérendő minta glükóz koncentrációja töményebb volt, mint a fent említett koncentráció határok, bevitt mennyiségét értelemszerűen csökkenteni kellett.

Az enzimés glükózkoncentráció meghatározás módosításával kapcsolatos elképzeléseim a 4.1.1 fejezetben találhatók.

3.2.3 Az *o*-alkil-glükozidok koncentrációjának közvetlen meghatározása HPTLC módszerrel

Az *o*-alkil-glükozidok koncentrációjának közvetlen meghatározását kémiai módon módosított szilikagél rétegen, acetonitril-víz (7:3) eluálószerrel, nagynyomású vékonyrétegekromatográfiás (HPTLC) módszerrel végeztem az irodalom szerint [KLAUS et al, 1989].

3.2.4 A natív α - és β -glükozidáz vizsgálata

A mandulából izolált β -glükozidáz (EC 3.2.1.21) Sigma termék, amelynek aktivitása a katalógus szerint szalicin szubsztrátra 37 °C hőmérsékleten pH=5,0 értéken 4,5 $\mu\text{mol min}^{-1}$ fehérje mg^{-1} volt. Az általam alkalmazott vizsgálati körülmények között [KOSÁRY et al., 1998a] 0,1 M nátrium-acetát pufferben pH=5,1 cellobióz szubsztrátra (0,25 M), 25°C hőmérsékleten pedig 3,30 $\mu\text{mol min}^{-1}$ fehérje mg^{-1} volt.

Élesztőből származó α -glükozidáz (EC 3.2.1.20) Sigma termék, amelynek aktivitása a katalógus szerint 4-nitro-fenil- α -D-glükozid szubsztrátra, pH=6,8 értéken 37°C hőmérsékleten 4,5 $\mu\text{mol min}^{-1}$ fehérje mg^{-1} volt. Az általam vizsgált körülmények között [KOSÁRY et al., 1998a] 0,1 M nátrium-acetát (pH 5,1) pufferben szacharóz szubsztrátra (0,1 M), szobahőmérsékleten pedig 0,45 $\mu\text{mol min}^{-1}$ fehérje mg^{-1} volt.

3.2.4.1 A natív glükozidázok aktivitásmérése

A natív β -glükozidáz aktivitását 0,1 M nátrium-acetát pufferben oldott pH=5,1 cellobióz szubsztráttal mértem az irodalom szerint LARNER módszere alapján [LARNER, 1960], azzal a különbséggel, hogy az irodalom szerint az alkalmazott szubsztrát koncentráció (0,25 M) helyett hígabbat használtam (0,143 M) a diszacharid képződés veszélye miatt. A reakcióelegy a β -glükozidázra nézve 1 mg ml^{-1} töménységű volt.

A natív α -glükozidáz aktivitásának meghatározását 0,1 M nátrium-acetát pufferben (pH=5,1), szacharóz szubsztráttal (0,1 M) végeztem az irodalom szerint [LARNER, 1960]; a reakcióelegy a α -glükozidázra nézve 1 mg ml^{-1} töménységű volt.

3.2.4.2 A natív α - és β -glükózidáz stabilitásának vizsgálata a reverz hidrolitikus folyamatok során

A natív α - és β -glükózidáz (1 mg) stabilitását különböző szerves oldószerekben (0,5 ml), 5, 10, illetve 15 % víztartalom mellett, 10 mM glükóz szubsztrát, mint stabilizáló jelenlétében, hat napig, szobahőmérsékleten vizsgáltam. Az aktivitásméréshez a reakcióelegy térfogatát 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH=5,1) háromszorosára hígítottam. Az oldószer elegyedőképességétől függően egy- vagy kétfázisú elegyek α - vagy β -glükózidáz aktivitását keverés közben, a fentiek szerint mértem meg.

A natív glükózidázok azonnali inaktíválódására vonatkozó eredményeimet a 4.1.2.1 fejezet tartalmazza, inkubálási inaktíválódásukkal és szerepükkel a reverz hidrolitikus folyamatokban a 4.4 fejezet foglalkozik.

3.2.4.3 Növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok α - és β -glükózidáz aktivitásának vizsgálata

Az alábbi, a kereskedelmi forgalomban beszerezhető növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok α - és β -glükózidáz aktivitását vizsgáltam: sárgarépa (*Daucus carota*), brokkoli (*Brassica oleracea*), szőlő (*Vitis vinifera*), karfiol (*Brassica cretica*) és mandula (*Prunus amygdalus*). A β -glükózidáz enzim izolálásához 100 mg ml⁻¹ töménységű oldatot készítettem olyan 50 mM TRISZ-acetát pufferrel (pH 8,2), amelynek töménysége szacharózra nézve 0,38 M, kalcium-kloridra nézve pedig 0,02 M volt.

Növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok α - és β -glükózidáz aktivitásának vizsgálatával kapcsolatos eredményeimet a 4.3.3 fejezet tartalmazza.

3.3 A natív pektin-metil-észteráz

3.3.1 A pektin-metil-észteráz vizsgálatához alkalmazott vegyszerek

A PME vizsgálata során szubsztrátként almapektint (észterezettségi fok legalább 70 %) (Fluka) használtam. Az izoláláshoz és a pufferek készítéséhez leggyakrabban használt vegyszereket Magyarországon a Reanal, Belgiumban a Sigma és Fluka cégektől szereztem be, például TRISZ, azaz trisz-(hidroximetil)-amino-metán, nátrium-hidroxid, nátrium-klorid, ammónium-szulfát, merkapto-etanol, polivinil-pirrolidon K25, stb. A ritkábban használt vegyszereket esetenként tüntettem fel. Valamennyi bemutatott eredményem három párhuzamos kísérlet átlagából származik.

3.3.2 Különböző növényi kivonatok készítése pektin-metil-észteráz aktivitás vizsgálatok céljából

3.3.2.1 Sárgarépából készített kivonat a natív sárgarépa PME kinetikai vizsgálatához

A natív pektin-metil-észteráz a sárgarépából (*Daucus carota*) nyertem izolálás és tisztítás után.

A) A sárgarépa pektin-metil-észteráz izolálása

A natív sárgarépa PME kinetikai vizsgálatához szükséges izolálási módszer valamennyi lépését NGUYEN és munkatársai leírásának megfelelően végeztem 4°C hőmérsékleten [NGUYEN et al., 2002b]. Az izolálás lépései nagy vonalakban az alábbiakból álltak:

- A natív, aprított sárgarépa homogenizálása több ízben vízzel, majd a csapadékos elegy megszűrése;
- A csapadékból a PME és más fehérjék extrakciója olyan 0,2 M TRISZ-klorid pufferrel (pH=8,5), amely nátrium-kloridra néve 1 M töménységű, majd a csapadékos elegy megszűrése;
- A szűrletből a szennyező fehérjék kicsapása ammónium-szulfáttal (az elegy töménysége ammónium-szulfátra nézve 30 %);
- A centrifugálás során nyert felülúszóból a PME kicsapása ammónium-szulfáttal (az elegy töménysége ammónium-szulfátra nézve 80 %);
- A centrifugálás során nyert csapadék (tisztítatlan PME) oldása 20 mM TRISZ-klorid (pH=7,5) pufferben (5 ml/100 g sárgarépa) affinitás kromatográfiás tisztításhoz.

B) A sárgarépa pektin-metil-észteráz tisztítása affinitás kromatográfiával

A sárgarépa PME tisztítását DENÈS és munkatársai módszerének megfelelően [DENÈS et al., 2000], a kiwi gyümölcsből NGUYEN által izolált PMEI-inhibitor [NGUYEN, 2002a,b] alkalmazásával végeztem. Az tisztítás lépései a következők voltak:

- A tisztítatlan PME enzim PMEI-CNBr-Sheparose 4B gyantához [NGUYEN, 2002a,b] kötése és kromatografáló oszlopra vitele;
- A szennyező fehérjék lemosása az oszlopról;
- A PME lemosása az oszlopról 50 mM nátrium-karbonát pufferrel (pH=9,85), amely nátrium-kloridra nézve 1 M töménységű volt;
- A tiszta sárgarépa PME enzimet tartalmazó frakciók sómentesítése Centricon Plus-20 (PL-10 Millipore, USA) centrifugacső segítségével;

- Az eluátum oldása az irodalomtól eltérően [NGUYEN et al., 2002b] nem 20 mM TRISZ-klorid pufferben (pH=7,0), hanem különböző kémhatású (pH=4,5; 5,5 és 6,0) 0,1 M citrát pufferekben történt;
- Az enzim tisztaságának ellenőrzése SDS-pagevel történt az irodalom szerint [HEUKESHOVEN & DERNICK, 1985] Sigma vegyszerek alkalmazásával;
- A tiszta sárgarépa PME oldat azonnali lefagyasztása és tárolása -80°C hőmérsékleten.

3.3.2.2 A hőkezelt, szeletelt sárgarépából készült kivonatok pektin-metil-észteráz aktivitás méréshez

A szeletelt sárgarépát a későbbiek során (3.5.2.1 fejezet) ismétlésre kerülő módon hőkezelésnek vettem alá, majd a kivonatot a 3.3.2.1 A) fejezetben leírtak szerint készítettem. A sárgarépale vizsgálatakor nem kellett külön kivonatot készítenem, de az ipari körülmények modellezésére a sárgarépalevet a 3.3.2.1 A)+B) fejezetekben leírtak szerint elkészített natív sárgarépa PME oldattal hígítottam 2:1 arányban (4.3.2 fejezet).

3.3.2.3 Pektin-metil-észteráz izolálása a nagynyomással kezelt szeletelt sárgarépából

A nagynyomással kezelt (3.5.2.2 fejezet) szeletelt sárgarépa mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottam, nátrium-kloridra nézve 1M töménységű 0,2 M TRISZ (pH=8,0) extraháló pufferrel (3 ml) dörzsmozsárban homogenizáltam, majd az elegyet 2 óra hosszat, 4°C hőmérsékleten rázattam. A csapadékos elegyek PME aktivitását közvetlenül mértem (3.3.3.1 fejezet).

3.3.2.4 Néhány növényi eredetű élelmiszeripari alapanyag pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálata

Az alábbi, a kereskedelmi forgalomban beszerezhető növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok PME aktivitását vizsgáltam: brokkoli (*Brassica oleracea*), szőlő (*Vitis vinifera*), must, bor, karfiol (*Brassica cretica*) és mandula (*Prunus amygdalus*). A kivonatok (1 g ml^{-1}) BARNAVON módszerének [BARNAVON et al., 2001] jelentős módosításával készültek. A kivonószer Triton-X-100 (1 g), glicerol (20 ml), polivinil-pirrolidon (5 g) és ditiotreitól (0,31 g) összetevőket tartalmazott olyan 100 ml térfogatú 0,5 M TRISZ-hidroklorid pufferben (pH=8,5), amelynek töménysége nátrium-kloridra nézve 2 M volt. A kivonást 4°C hőmérsékleten végeztem. Az aprított növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagot kvarchomokkal 5 percig dörzsöltem, majd a csapadékos elegyet 24 óra

hosszat rázattam (100 perc^{-1}), majd 10 percig centrifugáltam (6000 g). A felülúszó PME aktivitását a 3.3.3.1 fejezetben írtak szerint mértem meg.

A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok PME aktivitásának vizsgálatával a 4.3.3 fejezet foglalkozik.

3.3.3 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz inaktiválódásának vizsgálata

3.3.3.1 A pektin-metil-észteráz aktivitásmérése

A PME aktivitását az irodalom szerint, titrimetriás módszerrel határoztam meg [CRELIER et al., 2001]. A pektin oldatból a PME által felszabadított szabad karboxilcsoportok száma alapján következtettem az aktivitásra. A titráláshoz Metrohm (Svájc) típusú automata titrátort és 0,01 M NaOH oldatot használtam, az aktivitásmérés hőmérséklete 30°C volt. A reakcióelegy (30 ml) a 3,5 % töménységű almapektin szubsztrát oldat ($\text{pH}=7,0$) nátrium-kloridra nézve 0,1 M volt. Az enzimreakciót megfelelő mennyiségű PME oldat hozzáadásával indítottam. Ez a mennyiség a natív sárgarépa PME esetében a 3.3.2.1 A)+B) fejezetekben leírtak szerint elkészített oldat megfelelő kémhatású citrát pufferrel történő három és félszeres hígításával készült (250 μl). A hőkezelt (3.3.2.2 fejezet), illetve nyomáskezelt szeletelt sárgarépából (3.3.2.3 fejezet) készült kivonatokat nem kellett utólag hígítani (250 μl). A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagokból készült kivonatok (3.3.2.4 fejezet) esetében kétszeres mennyiséget (500 μl) kellett alkalmaznom.

A PME aktivitás egységének, önkényesen azt az enzim mennyiséget tekintik, amely 1 μmol karboxil csoportot szabadít fel (azaz 1 μmol nátrium-hidroxidot fogyaszt) 1 perc alatt a fent említett reakciókörülmények között 30 ml reakcióelegyben [SZABOLCSI, 1991]. A továbbiakban tehát a PME aktivitásának jellemzésére ezt, a 30 ml reakcióelegyre és 1 g élelmiszeripari alapanyagra vonatkoztatva $\mu\text{mol min}^{-1}$ egységeket ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) alkalmaztam. Ettől csak a natív sárgarépa PME oldat esetében tértem el, mert ebben az esetben NGUYEN és munkatársai gyakorlatának megfelelően az aktivitást ml (0,01 M nátrium-hidroxid) min^{-1} adtam meg [NGUYEN et al., 2002a].

A natív sárgarépa PME enzimkinetikai állandóinak meghatározására (4.1.3.1 fejezet), a szeletelt sárgarépa hőkezelésére (4.3.2.2 fejezet), illetve nagynyomású kezelésére (4.3.2.4 fejezet) és a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok PME aktivitására (4.3.3 fejezet) vonatkozó eredményeimet a feltüntetett fejezetekben mutatom be.

3.3.3.2 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz hőinaktiválása

A hőinaktiválási kísérletekhez Blaubrand (Németország) kapillárisokat használtam, amelyekbe egyenként 250 μ l különböző kémhatású (pH=4,5; 5,5 és 6,0), a 3.3.2.1 A)+B) fejezetekben leírt módon készített enzimoldatot helyeztem. Ezekkel a kapillárisokkal 50-60°C hőmérsékleti tartományban különböző inkubációs idejű kezeléseket végeztem hőmérsékletszabályozóval ellátott vízfürdőkben. A kezelt mintákat jég-vízfürdőben helyeztem el az aktivitásmérésig (a tárolási idő maximum 50 perc lehetett).

A natív sárgarépa PME hőinaktiválására vonatkozó eredményeimet a 4.1.3.3 fejezet tartalmazza.

3.3.3.3 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz inaktiválása nagynyomással

A nyomáskezelési kísérletekhez flexibilis mikrotubusokat (Biozyme, EK) használtam, amelyekbe egyenként 250 μ l különböző kémhatású (pH=4,5; 5,5 és 6,0), a 3.3.2.1 A)+B) fejezetekben leírt módon készített enzimoldatot helyeztem. A mikrotubusokat hőmérsékleti szabályozóval (-20 °C-tól 100 °C hőfokig) ellátott, nagynyomású (1000 MPa nyomásértékig) kezelésre alkalmas, többedényes készülékbe helyeztem. Különböző inkubációs idejű kezeléseket végeztem a közeg kémhatásától függően 650 MPa és 800 MPa közötti nyomásérték tartományban, 10 és 25°C hőmérsékleten. A nyomásközvetítő anyag glikol-olaj keverék volt. A külső hűtés ellenére fellépő adiabatikus melegedés elkerülése érdekében a nyomást csak 100 MPa min^{-1} sebességgel növeltem [NGUYEN et al., 2002a]. A kívánt nyomásérték beállítása után két perc kiegyenlítőidőt hagytam, hogy a hőmérséklet is megfelelő értéken legyen. A két perces kiegyenlítőidő után mért enzimaktivitást vettem 100 százaléknak csak az ezután eltelt időt tekintettem inkubációs időnek. A kezelés után a kezelt mintákkal a 3.3.3.1 fejezet szerint jártam el.

A natív sárgarépa PME nagynyomású inaktiválására vonatkozó eredményeimet a 4.1.3.4 fejezet tartalmazza.

3.4 Az α - és β -glükózidáz rögzítése

3.4.1 A glükózidázok rögzítése Akrilex C-100 típusú hordozóra

Az α - és β -glükózidáz Akrilexre rögzítését a korábban leírtak szerint végeztem [KOSÁRY et al., 1998b]. Az alábbi, az irodalmi leíráshoz képest optimált előirat szerint: 1 g Akrilex C-100 hordozó és 50 ml 0,1 M nátrium-acetát puffer (pH=5,1) elegyét 0-5°C belső hőmérsékleten (jég-víz fürdő alkalmazásával) 10 percig kevertetem, majd 10 perc alatt 20 ml 1-ciklohexil-3-(2-morfolino-etil)-karbodiimid (100 mg ml⁻¹) előre hűtött (0-5°C) oldatát csepegtetem hozzá. Az elegyet további 10 percig kevertetem, végül 17 ml előre hűtött (0-5°C) α - vagy β -glükózidáz oldatot (10 mg ml⁻¹) csepegtetem hozzá 10 perc alatt. A reakcióelegyet további 48 órát kevertetem 0-5 °C hőmérsékleten, végül lecentrifugáltam (8000g, 5 perc, 0°C) a fenti hőmérsékleten. A nem kovalensen kötött enzimek eltávolítására csapadékot két ízben olyan 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (15 ml) mostam, amelyeknek töménysége nátrium-kloridra nézve 1 M volt. A zsugorított üvegszűrőre helyezett rögzített glükózidázokat sómentesítés céljából több ízben vízzel (10 ml) mostam, a sómentességet a vezetőképesség mérésével ellenőriztem. A nedves, sómentes rögzített enzimeket a Richter Gedeon Rt. laboratóriumában liofilezték.

A glükózidázok Akrilex C-100 hordozóval végzett rögzítésére vonatkozó eredményeimet a 4.2.1 fejezet tartalmazza.

3.4.2 A β -glükózidáz rögzítése felületi rétegre glutáraldehides keresztkötések kialakításával

A felületi réteget (Surface layer) (0,50 g) 50 ml 0,1 M foszfátpufferben pH=7,0 szobahőmérsékleten felfuszpendáltam. Az elegyhez keverés (mágneses keverő) közben előbb kis részletekben 100 mg natív β -glükózidázt adagoltam, majd 2 ml glutáraldehid vizes oldatát (25 %) csepegtetem hozzá. A reakció elegyet 1 órán át szobahőmérsékleten, majd 24 órát kevertem 0-5°C hőmérsékleten. A glutáraldehid felesleget 30 mg szilárd TRISZ hozzáadásával kötöttem meg (10 perc keverés), majd a csapadékos elegyet centrifugáltam (6000g, 30 perc, 4°C), 10 ml előre hűtött (0-5°C) vízben felfuszpendáltam, majd a szuszpenziót ismét centrifugáltam. Ez a csapadék a kalcium-alginát gyöngybe zárásra további kezelés nélkül is alkalmas volt.

A β -glükózidáz felületi rétegre történő rögzítésével kapcsolatos eredményeimet a 4.2.2 fejezet tartalmazza.

3.4.3 A felületi rétegre rögzített β -glükózidáz kalcium-alginát gyöngyökre zárása

A 3.4.2 fejezetben leírtak szerint kapott csapadék 1 ml vízzel készült szuszpenzióját 50 ml nátrium-alginát oldathoz (3 %) csepegtettem keverés közben szobahőmérsékleten (előzőleg a nátrium-alginát oldódását 0,5 ml etanol nedvesítőszer hozzáadásával és melegítéssel tettem teljessé). A szuszpenziót 1 % vizes kalcium-klorid oldatba (250 ml) csepegtettem keverés közben, majd az elegyet további 30 percig kevertettem. A gyöngyökről az oldatot dekantáltam, majd a gyöngyöket kétszer 250 ml vízzel sómentesre mostam.

A felületi réteghez kötött β -glükózidáz gélbezárásával kapcsolatos eredményeimet a 4.2.3 fejezet tartalmazza.

3.4.4 Az Akrilex C-100 típusú hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz aktivitásának meghatározása, illetve azonnali és inkubálási inaktiválódásának vizsgálata a reverz hidrolízis körülményei között

A 3 mg liofilizált rögzített glükózidáz enzimet megduzzasztottam. Egyszerű aktivitásmérések esetén a fenti enzimmennyiséget olyan 500 μ l 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH=5,1) kevertem fel, amely 10 mM glükóz szubsztrát stabilizálószerrel tartalmazott. Az inkubálási inaktiválódási méréseknél a puffert olyan, megfelelő vízmennyiséget (5, 10, illetve 15 %) tartalmazó és megfelelő összetételű szerves oldószer helyettesítette, amely 10 mM glükózt tartalmazott és szükség esetén inkubációt (1-6 nap) is alkalmaztam. A feldolgozás során a reakcióelegy térfogatát 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH=5,1) háromszorosára hígítottam. A duzzasztott, rögzített enzimet zsugorított üvegszűrőn két ízben vízzel mostam és a mosott, rögzített enzim aktivitását határoztam meg úgy, hogy 1000 μ l 0,1 M nátrium-acetát pufferben (pH=5,1) felszuszpendáltam, majd 400 μ l 0,5 M cellobióz szubsztráttal a 3.2.4.1. fejezetben részletezett módon megmértem.

A rögzített α - és β -glükózidáz azonnali inaktiválódására vonatkozó eredményeimet a 4.2.4 fejezet, inkubálási inaktiválódására vonatkozó eredményeimet pedig a 4.4.1 fejezet tartalmazza, a reverz hidrolitikus folyamatok vizsgálatával a 4.4.3 és 4.4.4 fejezet foglalkozik.

3.5 Az α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazásának modellezési kísérletei

3.5.1 A rögzített β -glükózidáz készítmények tesztelése a borok aromaprofiljának módosítására

3.5.1.1 A borok kezelése rögzített β -glükózidáz készítményekkel

A vizsgált borok:

- Zöld veltelíni, szürkebarát és olaszrizling típusú szőlőből, a budafoki Promotor Borászati Szakközépiskola Tangazdaságában készült, 11,5 % alkoholtartalmú bor (rövidítés: ZSO bor).
- 1999 évjáratú Balaton Boglári Muskotály Cuvée, 15 % alkoholtartalmú fehér édes minőségi bor, amely Irsai Olivér, Csabagyöngye, Ottonel Muskotály és Sárga Muskotály szőlők felhasználásával készült (rövidítés: BB bor).

A bort literenként $200 \mu\text{mol min}^{-1}$ aktivitással rendelkező rögzített β -glükózidáz készítményekkel rázattam (100 min^{-1}) 16 órán át, szobahőmérsékleten ($22\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$). A két vizsgált készítmény, az Akrilex C-100 típusú hordozóra rögzített (3.4.1 fejezet), illetve a felületi réteghez kötött, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidáz (3.4.3 fejezet) volt. A bort a megfelelő rögzített β -glükózidáz készítményről dekantáltam. Az Akrilex C-100 hordozó esetében a felkavarodás miatt ez a művelet némi anyagvesztéssel járt.

3.5.1.2 Az aromaanyagok extrakciója a rögzített β -glükózidáz készítményekkel kezelt borokból

A dekantált, kezelt bormintákat (400 ml) dietil-éter (300 ml) és pentán (150 ml) elegyével 8 óra hosszat folyamatosan extraháltam üvegből készült, könnyű-fázisú, folyadék-folyadék extraktorral. A szerves oldószeres fázist elkülönítettem, vízmentes nátrium-szulfáton szárítottam és vákuumban bepároltam. A lepárolt maradékot közvetlenül a gázkromatográfiás analízis előtt dietil-éter és pentán 2:1 arányú elegyében oldottam (20 ml) és 10 percig ultrahanggal kezeltem. Kontrollként azonos mennyiségű és azonos módon extrahált, de β -glükózidáz készítményekkel nem kezelt bort alkalmaztam.

3.5.1.3 Gázkromatográfiás bor aroma komponens analízis

A gázkromatográfiás mérésekhez nitrogént volt a vivőgázként (lineáris sebességgel cm sec^{-1}). Programozott fűtést alkalmaztam az oszlopokban 4°C min^{-1} sebességgel 40°C kiindulási

hőmérsékletéről 220°C vég hőmérséklet eléréséig. Lángionizációs FID detektort használtam. A kromatogramok feldolgozása EMMI 2000 elektromos értékelő rendszerrel történt. A beinjektált minta mennyisége 1 μ l volt, splitless technikával dolgoztam. Az injektor hőmérséklete 200°C; 60 sec szelep késéssel.

A különböző borok aromaanyag tartalmának gázkromatográfias meghatározására vonatkozó eredményeimet a 4.3.1 fejezet tartalmazza.

3.5.2 Pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazásának modellezése

3.5.2.1 A szeletelt sárgarépa PME tartalmának hőinaktiválása

A szeletelt sárgarépát (20 g/ minta) kis LPDE műanyag tasakokba (Ziplock bags, Németország) csomagoltam vákuumkamrás csomagolóberendezés segítségével, majd egy második zacskóba tettem és ismét lezártam. A mintákkal 66-74°C hőmérsékleti tartományban különböző inkubációs idejű kezeléseket végeztem hőmérsékletszabályozóval ellátott vízfürdőkben. Ezután a mintákat jég-vízfürdőben tároltam az extrahálásig, amelyet a 3.3.2.1 A) fejezetben leírtak szerint végeztem.

A szeletelt sárgarépa PME tartalmának hőkezelésére vonatkozó eredményeimet a 4.3.2.2 fejezet tartalmazza.

3.5.2.2 A szeletelt sárgarépában lévő PME inaktiválása nagynyomással

A szeletelt sárgarépát (3,6 g/ minta) flexibilis mikrotubusokba (Biozyme, EK) zártam. A mikrotubusokat a hőmérsékleti szabályozóval (-20°C-tól 100°C hőfokig) ellátott, nagynyomású (1000 Mpa nyomásértékig) kezelésre alkalmas, többedényes készülékbe helyeztem. Különböző inkubációs idejű kezeléseket végeztem 700 MPa és 800 MPa közötti nyomásérték tartományban 40°C hőmérsékleten. A külső hűtés ellenére fellépő adiabatikus melegedés elkerülése érdekében nyomást csak 100 MPa min^{-1} sebességgel növeltem [NGUYEN et al., 2002a]. A kívánt nyomásérték beállítása után két perc kiegyenlítődési időt hagytam, hogy a hőmérséklet is megfelelő értéken legyen. A két perces kiegyenlítődési idő után mért enzimaktivitást tekintettem 100 százaléknak, csak az ezután eltelt időt számítottam kezelési időnek. Ezután a kezelt mintákat jég-vízfürdőben tároltam az extrahálásig. A minták PME aktivitásának mérését a 3.3.2.3 fejezetben leírtak szerint végeztem.

A szeletelt sárgarépa PME nagynyomású inaktiválására vonatkozó eredményeimet a 4.3.2.4 fejezet tartalmazza.

3.5.3 Hőkezelési kísérletek egyes növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagokban

Az hőkezelési kísérleteket darabolt és folpack fóliába csomagolt sárgarépával, illetve brokkolival és karfiollal végeztem meghatározott hőfokokon (a sárgarépa esetében 68-76°C, illetve a brokkoli és a karfiol esetében 92-98°C), meghatározott ideig. A mintákat hideg vízzel lehűtöttem, majd 30 percig szobahőmérsékleten tartottam. A sárgarépa esetében az enzimaktivitási vizsgálatokat azonnal végeztem, a brokkolit és a karfiolt az előfőzés gyakorlatának megfelelően, gyorsfagyasztott tárolás (-22°C) után hetente vizsgáltam.

Az egyes növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok hőkezelési kísérletei a 4.3.3 fejezetben találhatók.

3.6 A felületaktív *o*-glükozidok szintézise α - és β -glükozidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal

3.6.1 Közös reakcióelegy a natív, illetve az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - vagy β -glükozidáz inkubálási inaktiválódásának és az *o*-glükozidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének vizsgálatára

3.6.1.1 Közös reakcióelegy a natív α - vagy β -glükozidáz inkubálási inaktiválódásának és az *o*-glükozidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének vizsgálatára

A reakcióelegy (0,5 ml) megfelelő vízmennyiséget (5, 10, illetve 15 %) tartalmazó és megfelelő összetételű szerves oldószer volt, amely 10 mM glükózt és 1 mg natív α -, vagy β -glükozidázt tartalmazott. A reakcióelegyet 0-6 napig, szobahőmérsékleten rázattam (200 min⁻¹). Minden összetétel esetében annyi reakcióelegyet tettem fel, hogy lehetőségem legyen az igény szerint naponta-kétnaponta kellő számú reakcióelegy feldolgozására. A feldolgozáshoz a reakcióelegy térfogatát 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH=5,1) háromszorosára hígítottam. Az oldószer elegyedőképességétől függően egy- vagy kétfázisú elegyeknek, mind az α - vagy β -glükozidáz aktivitását (3.2.4.1 fejezet), mind glükóztartalmát (3.2.2.2 fejezet) megmértem.

A natív α - vagy β -glükozidáz inkubálási inaktiválódásának és az *o*-glükozidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének vizsgálatának eredményeivel a 4.4 fejezet foglalkozik.

3.6.1.2 Közös reakcióelegy az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - vagy β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának és az *o*-glükózidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének vizsgálatára

A reakcióelegy (0,5 ml) megfelelő vízmennyiséget (5, 10, illetve 15 %) tartalmazó és megfelelő összetételű szerves oldószer volt, amely 10 mM glükózt és 3 mg Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - vagy β -glükózidázt tartalmazott. A reakcót 0-6 napig, szobahőmérsékleten rázattam (200 min^{-1}). Minden összetétel esetében annyi párhuzamos reakcióelegyet tettem fel, hogy lehetőségem legyen az igény szerint naponta-kétnaponta kellő számú reakcióelegy feldolgozására. A feldolgozáshoz a reakcióelegy térfogatát 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH=5,1) háromszorosára hígítottam. Ezután a rögzített enzimet zsugorított üvegszűrőn két ízben vízzel mostam, és a mosott, rögzített enzim aktivitását határoztam meg úgy, hogy 1000 μl 0,1 M nátrium-acetát pufferben (pH=5,1) felszuszpendáltam, majd 400 μl 0,5 M cellobióz szubsztráttal a 3.2.4.1. fejezetben leírt módon megmértem. Az oldószer elegyedőképességétől függően egy- vagy kétfázisú elegyeknek, mind az α - vagy β -glükózidáz aktivitását (3.2.4.1 fejezet), mind glükóztartalmát (3.2.2.2 fejezet) megmértem.

Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - vagy β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának és az *o*-glükózidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének eredményeivel a 4.4 fejezet foglalkozik.

3.6.1.3 Az *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok preparatív léptékű szintézise reverz hidrolízissel

A) Bepárlásos-vastagkromatográfiás módszer

A reakcióelegyeket (5 ml), amelyek Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidázt (30 mg), glükózt (0,18 g, 1 mmol) és hidroxil-vegyületet (20 mmol) tartalmaztak 10 % víztartalmú DAE hígítószeres oldatban, hat napig szobahőmérsékleten rázattam. A rögzített enzimet zsugorított üvegszűrőn kiszűrtem, majd három ízben vízzel mostam. Az egyesített szűrletet vákuumban bepároltam, majd a lepárolt maradékból a tiszta *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidokat vastagrétegkromatográfiával (Kieselgel PF₂₅₄), különböző arányokban összekevert kloroform – etil-acetát – metanol eluáló elegyekkel nyertem ki. A kiszűrt enzim aktivitását az inkubálási inaktiválódás kiszámításának igénye miatt mértem.

B) Extrakciós-vastagkromatográfiás módszer

A reakcióelegyet, amelyek Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidázt (30 mg), glükózt (0,36 g, 2 mmol) és hidroxil-vegyületet (5 mmol) tartalmaztak 10 % víztartalmú DAE vagy TRA hígítószeres oldatban (45 mmol), hat napig szobahőmérsékleten rázattam. A rögzített enzimet zsugorított üvegszűrőn kiszűrtem, majd három ízben vízzel mostam. A hígítószer eltávolítására az egyesített szűrletet három lépésben kloroformmal extraháltam. A vizes fázist vákuumban lepároltam, majd a lepárolt maradékból a tiszta *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidot vastagrétegekromatográfiával (Kieselgel PF₂₅₄), különböző arányokban összekevert kloroform – etilacetát – metanol eluáló elegyekkel nyertem ki. A kiszűrt enzim aktivitását az inkubálási inaktiválódás kiszámításának igénye miatt mértem.

3.6.1.4 A preparatív léptékű reverz hidrolízissel előállított o-glükózidok szerkezetazonosítása

A preparatív léptékű reverz hidrolízissel előállított *o*-glükózidok szerkezetazonosítása és optikai tisztaságának ellenőrzése az irodalomnak megfelelően a DMSO-d₆ oldatban készített ¹H-NMR spektrum (belső standard TMS) alapján állapítottam meg [DE BELDER et al., 1966].

A preparatív léptékű reverz hidrolízissel előállított *o*-glükózidokkal kapcsolatos eredményeimet a 4.4.4. fejezet tartalmazza.

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

4.1 A natív α - és β -glükozidáz, valamint a pektin-metil-észteráz vizsgálata

A disszertáció komplex célkitűzései következtében a kiválasztott hidrolázokat többféle szempontból vizsgáltam. A *natív*, azaz a kereskedelmi forgalomban kapható, liofilezett por formájú α - és β -glükozidáz stabilitását az *o*-glükozidok szintézise szempontjából vizsgáltam. A sárgarépa élelmiszeripari alapanyag vizsgálata során a *natív*, azaz a sárgarépából izolált és tisztított pektin-metil-észteráz stabilitási vizsgálatai elengedhetetlenek voltak a kitűzött feladatok elvégzésének sikeressége szempontjából. Ugyanakkor a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok tárolási vizsgálatai során a növényi kivonatok α - és β -glükozidáz, valamint pektin-metil-észteráz aktivitását is tanulmányoztam.

4.1.1 A reakcióelegyek glükózkoncentrációjának, illetve *o*-glükozid tartalmának meghatározása

Nem volt lehetőségem arra, hogy a fotometriás szempontból előnyös pNPG (4-nitro-fenil- α -, illetve β -D-glükopiranozid) szubsztrátot alkalmazzak a glükozidázok aktivitásának mérésére. Nemcsak a reakcióelegyek analíziséhez volt szükségem glükóz koncentrációmérésre, hanem az enzimaktivitás meghatározásához is. Ez igen nagyszámú mérést igényelt, tehát nemcsak gyors és pontos, hanem gazdaságos glükóztartalom meghatározására is szükségem volt. Ebből a szempontból két lehetséges módszer állt rendelkezésemre, a redukáló cukor tartalmat meghatározó dinitro-szalicilsavas (DINISA) módszer [HOSTETTELER et al., 1951] és a célzottan glükóz koncentrációt mérő, hexokinázt és glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt alkalmazó enzimes analízis [BEUTLER et al., 1974].

Kezdeti, a reakcióelegyek glükóztartalmára vonatkozó vizsgálataimat DINISA módszerrel végeztem. Ennek érdekében az irodalmihoz képest egyszerűsítettem az eljárást, több, az eredeti receptben [HOSTETTELER et al., 1951] szereplő adalékanyagot (pl. fenol) az analizáló képesség csökkenése nélkül elhagyhatónak találtam. Azonban hamarosan bebizonyosodott, hogy a DINISA módszer az igényeimnek nem felel meg, mert nem elég érzékeny és gyors. Ezen kívül a β -glükozidáz esetében a módszer teljesen használhatatlannak bizonyult, mivel ebben a rendszerben a szubsztrát cellobióz moláris abszorpciós koefficiense pontosan kétszerese volt a termék glükózénak.

A hexokinázt és glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt alkalmazó enzimes analízis mind érzékenység, mind gyorsaság szempontjából megfelelőnek bizonyult, de a szükséges mennyiségű analízis elvégzéséhez a kereskedelemben (Boehringer, Sigma, stb.) beszerezhető kettek megfizethetetlenül drágának bizonyultak. Az irodalmi adatok alapján [BEUTLER et al., 1974], de saját változtatásokkal egyéni analízáló oldatot fejlesztettem ki, amelyben a reakcióközeg kémhatásának (pH=7,6) állandóságát szokatlanul tömény (1 M) trietanol-amin pufferrel értem el. Az analízáló enzimkeverék költségét úgy csökkentettem, hogy egy kevésbé drága, a Sigma által forgalmazott, hexokinázt és glükóz-6-foszfát dehidrogenázt tartalmazó enzimkeveréket használtam, amelyet az igénynek megfelelően hexokinázzal egészítettem ki. Az oldatok tartósítószer alkalmazása nélkül is hónapokig eltarthatók voltak. Ezekkel a módosításokkal a glükózanalízis költségét mintegy negyedére csökkentettem.

A vizsgált reakcióelegyek *o*-glükozid tartalmára két úton következtethettem. Az indirekt módszer szerint elegendő volt az elegyek glükóztartalmát megmérni. Ugyanis a reakcióelegyek glükóztartalmának csökkenéséből aránylag pontosan lehetett következtetni az *o*-glükozidok képződésére. A reakcióelegyek *o*-glükozid koncentrációjának direkt meghatározását a vékonyrétegekromatográfia fejlesztett változatával a nagynyomású vékonyrétegekromatográfia (HPTLC) segítségével végeztem az irodalom szerint [KLAUS et al., 1989]. A vékonyréteg kémiaailag módosított, aminocsoportokat tartalmazó szilikagél (Merck), az eluálószer acetónitril és víz 7:3 arányú elegye volt. A vékonyrétegeken jól megkülönböztethető helyen jelentkezett a glükóz ($R_f=0,05$) és a megfelelő *o*-glükozid ($R_f=0,40$). Mennyiségükre denzitométer segítségével következtettem. A későbbi, nagyobb pontosságot igénylő vizsgálatoknál az enzimes analitikai és HPTLC módszereket párhuzamosan alkalmaztam. Csak azokat az eredményeket tartottam elfogadhatónak, amelyek három párhuzamos kísérletben a kísérleti hibán belül ($\pm 5\%$ relatív eltérés) megegyeztek.

4.1.2 A natív α - és β -glükozidáz vizsgálata

Az *o*-glükozidok szintézise szempontjából tehát elsősorban a kereskedelemben kapható natív α - és β -glükozidázt, a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok vizsgálata szempontjából pedig a növényi kivonatok glükozidáz aktivitását tanulmányoztam.

A kereskedelemben kapható, élesztőből izolált α - és mandulából izolált β -glükozidázt preparatív célra alkalmaztam. Minden esetben közvetlenül a liofilizált natív enzimet jutattam a

reakcióelegybe. De ezen kívül számos növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagban vizsgáltam az endogén α -, illetve β -glükózidáz aktivitást egy a Tanszéken folyó kutatáshoz kapcsolódva (*Növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok tárolásának vizsgálata biokémiai módszerekkel*, témavezető Dr. Kosáry Judit). Ezekben az esetekben azonban nem végeztem izolálást, hanem csak növényi kivonatokkal dolgoztam. A vizsgálatokhoz 100 mg ml⁻¹ töménységű kivonatokot készítettem, a citoplazma glükózidázainak kinyeréséhez a kvarchomokkal történő eldörzsölés elegendő volt.

A glükózidázok aktivitásának meghatározásához az vízzel készített oldat is megfelelő lett volna, de a tárolt növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok biokémiai vizsgálatához egységes izoláló szert kívántunk alkalmazni. Mivel a lipoxigenáz izoenzimek aktivitásmérésére az irodalom szerint [SONG et al., 1990] az olyan 50 mM TRISZ-acetát puffer (pH=8,2) a legalkalmasabb, amely szacharózra nézve 0,38 M és kalcium-kloridra nézve 0,02 M töménységű, minden enzim így a β -glükózidáz vizsgálatához is az ezzel a kivonószerrel készült kivonatokot használtuk.

Növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok tárolásának biokémiai vizsgálatával kapcsolatos eredményeimet 4.3.3 fejezet tartalmazza.

4.1.2.1 A natív glükózidázok stabilitásának vizsgálata

Az irodalomban ismert, hogy az α -glükózidáz, különösen a β -glükózidáz megfelelően tömény vizes oldatban napokig megőrzi aktivitását [LARNER, 1960]. Mivel a glükózidázokat reverz hidrolitikus folyamatokban kívántam felhasználni, a natív α - és β -glükózidáz stabilitását különböző szerves oldószerekben, 5, 10, illetve 15 % víztartalom mellett, 10 mM glükóz szubsztrát, mint stabilizáló jelenlétében, hat napig, szobahőmérsékleten vizsgáltam.

A glükózidázok, így a natív glükózidázok stabilitási vizsgálatait során tulajdonképpen az enzimek inaktiválódását mértem. A szerves oldószerek jelenlétében az inaktiválódásnak két különböző megjelenési formája van. Az egyik típust a szerves oldószer jelenléte okozza, ez azt jelenti, hogy az enzim a szerves oldószer hatására azonnal részben inaktiválódhat. Ebben az esetben a mért enzimaktivitást (maradékaktivitás, %) a vizes közegben mért aktivitásra, mint száz százalékra kell vonatkoztatni. Ezt az inaktiválódást a továbbiakban *azonnali inaktiválódásnak* nevezem. A második inaktiválódási típus a szerves oldószert tartalmazó reakcióelegyben történő inkubálás következménye. Ebben az esetben a mért enzimaktivitást (maradékaktivitás, %) a szerves oldószert tartalmazó reakcióelegyben azonnal mért aktivitásra, mint száz százalékra kell vonatkoztatni. Ezt az inaktviálódást a továbbiakban *inkubálási inaktiválódásnak* nevezem.

A hígítószerként tesztelni kívánt szerves oldószereket a reverz hidrolízis szempontjait és az irodalmi előzményeket figyelembe véve választottam ki. Az α - és β -glükózidáz azonnali inaktiválódását különböző, 5-15 % víztartalmú, vízzel elegyedő és nem elegyedő aprótikus szerves oldószerben vizsgáltam – a reverz hidrolízis körülményeit modellezendően – 10 % hexanol, mint glükóz akceptor jelenlétében. Azt találtam, hogy az α -glükózidáz az általam alkalmazott vizsgálati körülmények között mindegyik vizsgált szerves oldószerben azonnal elvesztette az aktivitását.

Ugyanílyen körülmények között viszont nemcsak a dimetil-formamid, a dioxán, a hexán és az etil-acetát esetében tapasztaltam a β -glükózidáz azonnali és teljes inaktiválódását, hanem azokban az oldószerekben (aceton és acetonitril) is jelentős volt az azonnali aktivitásvesztés, amelyek esetében VIC és munkatársai [VIC et al, 1997] csak kis mértékű dezaktiválódást észleltek. Ennek okát abban látom, hogy az idézett szerzők lényegesen magasabb (kb 30 %) alkohol jelenlétében dolgoztak, illetve az sem kizárható, hogy némileg eltérő, bár a közleményben nem jelzett reakciókörülményeket használtak.

Lényegesen kedvezőbb azonnali inaktiválódási értékeket tapasztaltam azonban két, olyan észter esetében, amelyeket nemcsak a reverz hidrolitikus reakciókban nem használtak eddig, hanem a preparatív szerves kémiában sem alkalmazták őket oldószerként. Ezt a két észtert, az 1,2-diacetoxi etánt (etilén-glikol-diacetát, DAE) és a triacetint (glicerol-triacetát, TRA) többek között elterjedten alkalmazzák az állattenyésztésben, a takarmányozásnál, mint nem toxikus, antifungális anyagot [MERCK INDEX, 1989]. Kettőjük közül először a DAE oldószerrel foglalkoztam – eredetileg egy irodalomban eddig még nem ismert alkoxi-etanol preparatív szintézisének kiindulási anyagául szántam. A szerves oldószerek tesztelése során ez az oldószer is vizsgálatra került, így derültek ki előnyös tulajdonságai.

A hasonló tulajdonságokkal rendelkező triacetint azonban már elvi megfontolások alapján vizsgáltam. Ugyanis minden észter alkalmazásakor felmerülhet a hidrolízis veszélye és a DAE hidrolízisekor a rendkívül mérgező (sejtméreg) etán-1,2-diol ismertebb nevén az etilén-glikol keletkezhet, amely fagyállóként közismert, valamint sajnálatos módon elterjedten használják borhamisításra is. A TRA hidrolízise során azonban a glicerol keletkezik, amely nem mérgező. Itt kell megjegyeznem, hogy mind a két oldószer igen olcsó Fluka vegyszer.

Részletesen vizsgáltam a DAE és a TRA oldószerek hatását a β -glükózidáz azonnali inaktiválódására. Ezeket az értékeket a leggyakrabban tesztelt alkoholokra a hígítószerként

alkalmazott DAE és TRA oldószerek jelenlétében a **3.-6. táblázatban** foglaltam össze. A tömörség kedvéért a reakcióelegyek víztartalmára (5, 10 és 15 %) vonatkozó konkrét értékeket átlagoltam.

3. táblázat. A natív β -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző DAE tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	35±4	24±3	20±4
<i>n</i> -pentanol	30±4	20±3	18±3
<i>n</i> -hexanol	42±3	28±3	24±3
ciklohexanol	40±5	27±3	22±4
2-butoxi-etanol	27±3	28±3	27±3
2-metoxi-etanol	30±3	28±3	24±3
2-fenoxi-etanol	20±3	20±3	17±3

4. táblázat. A natív β -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző TRA tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	35±4	24±4	22±4
<i>n</i> -pentanol	30±4	21±4	20±4
<i>n</i> -hexanol	42±3	30±5	27±5
ciklohexanol	40±5	30±5	26±5
2-butoxi-etanol	22±4	26±5	23±5

5. táblázat. A natív α -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző DAE tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	28±4	12±3	10±4
<i>n</i> -pentanol	24±4	10±3	8±3
<i>n</i> -hexanol	33±3	14±3	10±3
ciklohexanol	32±5	13±3	10±4
2-butoxi-etanol	22±3	15±3	13±3
2-metoxi-etanol	24±3	12±3	11±3
2-fenoxi-etanol	16±3	11±3	10±3

6. táblázat. A natív α -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző TRA tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	28±4	14±3	12±4
<i>n</i> -pentanol	24±4	11±3	10±3
<i>n</i> -hexanol	33±3	14±3	12±3
ciklohexanol	32±5	14±3	13±4
2-butoxi-etanol	22±3	16±3	13±3

Már az azonnali inaktiválódási értékek alapján feltételezhető volt, hogy a natív α -glükózidáz esetében nem érdemes hígítószer alkalmazni az alkoholok részbeni kiváltására. Mivel kutatásom ezen részének célja elsősorban éppen a hígítószer bevezetése volt a reverz hidrolitikus reakciókkal kapcsolatban, ezért a natív α -glükózidáz inaktiválódási folyamataival a továbbiakban nem foglalkoztam.

A rögzített glükózidázokkal kapcsolatos inkubációs inaktiválódási vizsgálatokkal, valamint a végzett reverz hidrolitikus reakciókkal (benne a két hígítószer a DAE és a TRA alkalmazásával) kapcsolatos eredményekkel a 4.2.4, illetve a 4.4 fejezet foglalkozik.

4.1.3 A natív pektin-metil-észteráz vizsgálata

Mivel a sárgarépa PME vizsgálatával belgiumi ösztöndíjas kutatásom során kezdtem foglalkozni, ezért értelemszerűen azokat a módszereket vettem át, illetve módosítottam, amelyeket a Leuveni Katolikus Egyetem, Élelmiszermikrobiológia és Élelmiszertechnológia Tanszékén alkalmaztak [NGUYEN et al., 2002b]. Amikor azonban az Alkalmazott Kémia Tanszéken bekapcsolódtam a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok (zöldségek és gyümölcsök) biokémiai vizsgálatába és növényi kivonatokban vizsgáltam a PME aktivitásváltozását egy, speciálisan a gyümölcsökre (szőlő) kidolgozott kivonatkészítési eljárást [BARNAVON et al., 2001] adaptáltam, amelyet később az igényeimnek megfelelően jelentősen módosítottam, elsősorban rövidítettem (3.3.2.4 fejezet).

4.1.3.1 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz enzimkinetikai állandói

A különböző növényekből a PME izolálása során (3.3.2.1 és 3.3.2.4 fejezetek) azért kell minden esetben aránylag nagy ionerősségű kivonószer alkalmazni, mert a PME ionosan is erősen kötődik a sejtfalhoz. Ezért kivonószer céljára önmagukban még a különböző polietilén-glikol származékok (PEG, Triton X-100, stb.) sem voltak elegendőek, a kivonó elegyeknek nátrium-kloridra nézve

legalább 1M töménységűnek kellett lenniük. A sárgarépa PME izolálásának és tisztításának lépései egyébként az általános enzimizolálási gyakorlatot követték.

A natív (gélelektroforézissel igazolt tisztaságú) sárgarépa PME enzimkinetikai állandóit a Lineweaver-Burk összefüggés alapján határoztam meg, NGUYEN és munkatársai gyakorlatának megfelelően [NGUYEN et al., 2002a] a pektin szubsztrátra (mg) és az enzim oldatra (ml) vonatkoztatva. Saját méréseim szerint a natív sárgarépa PME K_M értéke $0,04 \text{ mg ml}^{-1}$ [BALOGH et al., 2004b], az irodalmi adatok szerinti K_M érték $0,197 \text{ mg ml}^{-1}$ [NGUYEN et al., 2002a], az irodalmi és a saját V_{max} érték $0,15 \text{ ml min}^{-1}$ [NGUYEN et al., 2002a] és $0,077 \text{ ml min}^{-1}$ [BALOGH et al., 2004b] volt. Véleményem szerint a különbséget nem feltétlenül a különböző sárgarépa-fajtákból történő izolálás okozhatta.

4.1.3.2 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz enzimkinetikai adatainak elemzési módszere

A leuveni kutatócsoportban a natív sárgarépa PME oldatának (3.3.2.1 B fejezet) enzimkinetikai viselkedését széleskörűen vizsgálták. Az elsődleges kísérletek azonban csak az enyhén savasnál (pH=6,5) bázikusabb közegekre vonatkoztak [NGUYEN et al., 2002b]. Feladatom annak tanulmányozása volt, hogyan viselkedik a natív sárgarépa PME oldat savasabb közegben. Ezért a natív sárgarépa PME enzimet a tisztítási eljárás után (3.3.2.1 B fejezet) különböző kémhatású (pH=4,5; 5,5 és 6,0) 0,1 M citrát pufferekben oldottam és ezeket az oldatokat tettem ki hő-, illetve nyomáskezelésnek. A vizsgálataim és értékelésük során elsősorban a sárgarépából készült élelmiszeripari készítmények szempontjait vettem figyelembe.

A natív sárgarépa PME oldat hőinaktiválódási és a nagynyomás hatására bekövetkező aktivitásváltozási kinetikáját matematikai modellel kívántam jellemezni. Mivel a merkaptoetanolos kezelés nélküli SDS-page egyetlen fehérjemolekulára utalt, feltételeztem, hogy mindkét esetben az inaktiválódási kinetika elsőrendű lesz. A kinetika elsőrendűségére utalhat Guggenheim ábrázolás [KELETI, 1985], amely az A/A_0 hányados (az adott időpontban és a kiinduláskor mért aktivitás hányadosa) logaritmusának az idő függvényében történő ábrázolása (1a, illetve 1b egyenlet). Ez az összefüggés csak az elsőrendű kinetikájú reakciók esetében lineáris. Ezt az összefüggést alkalmaztam az α - és β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának kinetikai elemzésére is (4.4.2 fejezet).

A leuveni munkacsoport gyakorlata az volt, hogy az elsőrendű kinetikát követő reakciókat az enzimkinetikában elterjedten alkalmazott k sebességi állandó [KELETI, 1985] helyett az

élelmiszer-technológiai szokásoknak megfelelően EAGERMAN & ROUSE módszerét használják és a kinetikát D - (tizedelődési idő) és z -értékekkel (tizedelődési idő logaritmusának hőmérséklet vagy nyomás egységre eső változása) jellemzzék [EAGERMAN & ROUSE, 1976]. A D -értékeket a maradékaktivitási értékek és a kezelési idő féllogaritmikus összefüggésének lejtéséből számítottam ki az (1b) egyenlet alapján, ahol A_0 a kezdeti enzim aktivitás (100 %), míg A a maradékaktivitás (%) t időben és a 0,4343 szorzó a természetes alapú és tizesalapú logaritmus közötti átszámolásból származik. A tizedelődési idő (a percekben mért idő, amely alatt az eredetileg mért enzimaktivitás a tizedrésze csökken) tehát a sebességi konstans reciprokéval hozható kapcsolatba. Ez az összefüggés izoterm és izoterm-izobár körülmények között érvényes:

$$\ln(A/A_0) = -t/D \quad (1a)$$

$$\log(A/A_0) = -0,4343 t/D \quad (1b)$$

A z_T értékek a $\log D$ – idő összefüggés negatív meredekségéből számíthatók ki:

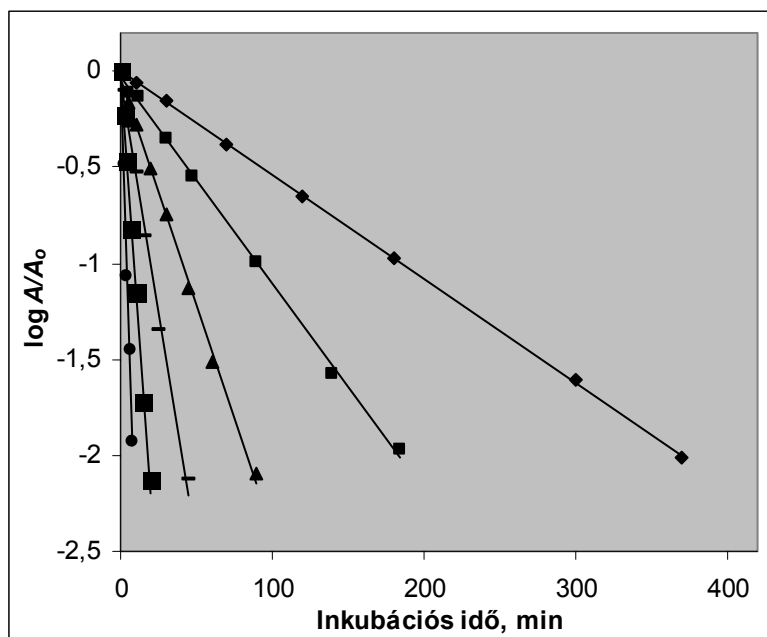
$$z_T = (T_2 - T_1) / (\log D_1 - \log D_2) \quad (2)$$

A z_P értékek a $\log D$ – nyomás összefüggés negatív reciprokéval kaphatók meg:

$$z_P = (P_2 - P_1) / (\log D_1 - \log D_2) \quad (3)$$

4.1.3.3 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz hőinaktiválódása

A natív sárgarépa PME hőinaktiválódási kísérleteit atmoszférikus nyomáson végeztem. A NGUYEN és munkatársai által izolált natív sárgarépa PME enyhén savasnál bázikusabb (pH=6,5-8,5) oldatban a 40-60°C hőmérsékleti tartományban mért inaktiválódása nem követett elsőrendű kinetikát [NGUYEN et al., 2002a]. Az általam izolált natív sárgarépa PME savasabb körülmények között (pH=4,5-6,0) az 50-60°C hőmérsékleti tartományban mért inaktiválódása azonban elsőrendű kinetikát mutatott, mivel az $\ln A/A_0$ értékek változása a kezelési idő függvényében minden esetben lineáris volt. Ennek illusztrálására a pH 5,5 kémhatásra vonatkozó féllogaritmikus inaktiválódási kinetikákat mutatom be (**4. ábra**).



4. ábra. A natív sárgarépa PME hőinaktiválása pH=5,5 értéken (◆) 50°C, (■) 52°C, (▲) 54°C, (⊖) 56°C, (■) 58°C és (●) 60°C hőmérsékleteken.

Az általam izolált natív sárgarépa PME pH=4,5-6,0 értékeken, az 50-60°C hőmérsékleti tartományban mért inaktiválódási kinetikáinak alapján számított tizedelődési idők (D -értékek) (7. táblázat) az általános gyakorlatnak megfelelően azt mutatták, hogy a magasabb hőmérsékleteken az inaktiválódás gyorsabban végbement. A D -értékekre nemcsak az alkalmazott hőmérsékletek, hanem az enzimidatok kémhatásának is jelentős volt a befolyása.

Az alacsonyabb hőmérsékleteken (50-54°C) a tizedelődési idők, tehát a natív sárgarépa PME stabilitása jelentősen különbözött az alkalmazott pH értékeknél, a pH=4,5 értéknél mért tizedelődési idő a pH 6,0 értéken mértnek mintegy tizede volt csak. A magasabb hőmérsékleti tartományban (56-60°C) mért D -értékek a pH=5,5 és pH=6,0 értékek esetében a hibahatáron belül (5 %) azonosak voltak. A vizsgált legsavasabb közegben (pH=4,5) a PME a vizsgált magasabb hőmérsékleti értékeknél (58-60°C) az enzim gyakorlatilag azonnal inaktiválódott. A natív sárgarépa PME különböző paraméterek között vizsgált hőinaktiválódási kinetikáiból számolt z -értékek közel azonosak voltak.

A natív sárgarépa PME hőinaktiválódási kinetikája alapján feltételezhető, hogy csak olyan savas kémhatásnál (pH=4,5) következik be gyors inaktiválódás aránylag alacsony hőmérsékleten

(50°C), amely az iparilag előállított sárgarépalére vonatkoztatva már a megszokottól eltérő ízt eredményezhet. Hasonló következtetésre lehetett jutni a tizedelődési idő változásai alapján. Míg 50°C hőmérsékleten a pH=6,0 és 4,5 kémhatások D -értéke között egy nagyságrend a különbség, a pH=5,5 kémhatásnál mért D -érték a pH=6,0 kémhatásnál mért értéknek 65 százaléka.

7. táblázat. A natív sárgarépa PME hőinaktiválásának kinetikai paraméterei atmoszférikus nyomáson (a standard hiba feltüntetésével).

Hőmérséklet, °C	D , min		
	pH=4,5	pH=5,5	pH=6,0
50	30,44 ± 1,6	185,29 ± 0,89	284,49 ± 8,19
52	16,41 ± 1,57	92,86 ± 1,42	122,65 ± 5,07
54	9,51 ± 0,43	40,79 ± 0,83	47,66 ± 2,56
56	3,49 ± 0,20	23,22 ± 1,51	24,09 ± 0,22
58	-	9,22 ± 0,25	10,08 ± 0,14
60	-	4,03 ± 0,22	3,59 ± 0,22
z_T , °C	6,54 ± 0,66	6,05 ± 0,18	5,37 ± 0,15

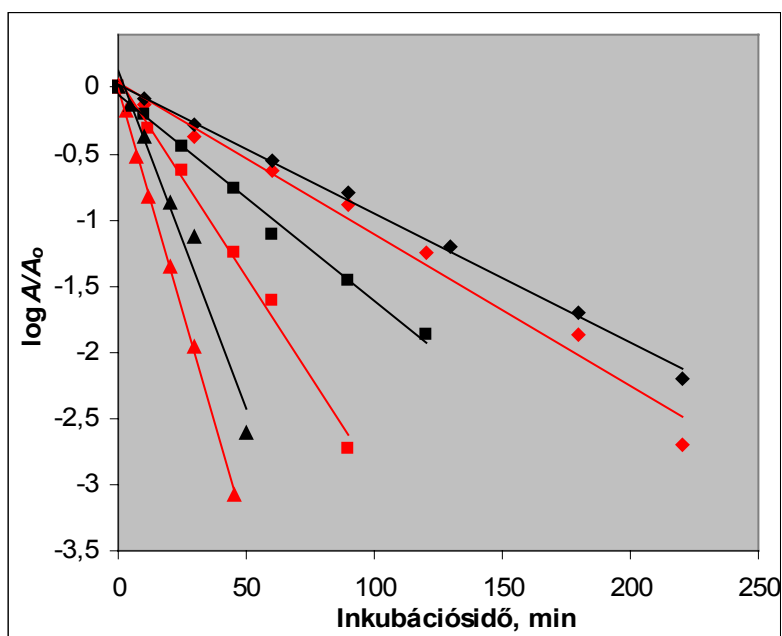
4.1.3.4 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz nagynyomás hatására bekövetkező inaktiválódásának kinetikája

A nyomásközlés alatt az adiabatikus felmelegedés az enzim szerkezetét tönkretetheti. Ezt elkerülendő NGUYEN és munkatársai a bázikusabb közegű sárgarépa PME oldatok nagynyomású kezelését 10°C belső hőmérsékleten végezték el [NGUYEN et al., 2002a]. Ezért az előzetes kísérletek során saját, savasabb kémhatású sárgarépa PME oldataim kezelését ezen a belső hőmérsékleten végeztem. Eredményeimet nehezen tudtam összehasonlítani NGUYEN és munkatársai eredményével, mert ők alacsonyabb nyomáson és hosszabb kezelési idővel dolgoztak és a kinetika rendűségére vonatkozólag nem végeztek számításokat [NGUYEN et al., 2002a]. Bár a tizedelődési értékek a közeg kémhatásától meglehetősen függtek (ebben az esetben is a legsavasabb kémhatású pH=4,5 oldat inaktiválódott a leggyorsabban) (8. táblázat), az enzim inaktiválódása még sem volt olyan mértékű, hogy meg ne kíséreljem a vizsgálatokat 25°C hőfokon is. Erre a hőmérsékletre irodalmi adatot nem találtam.

8. táblázat. A natív sárgarépa PME nagynyomású inaktiválásának kinetikai paraméterei 10 és 25°C hőmérsékleten (a standard hiba feltüntetésével).

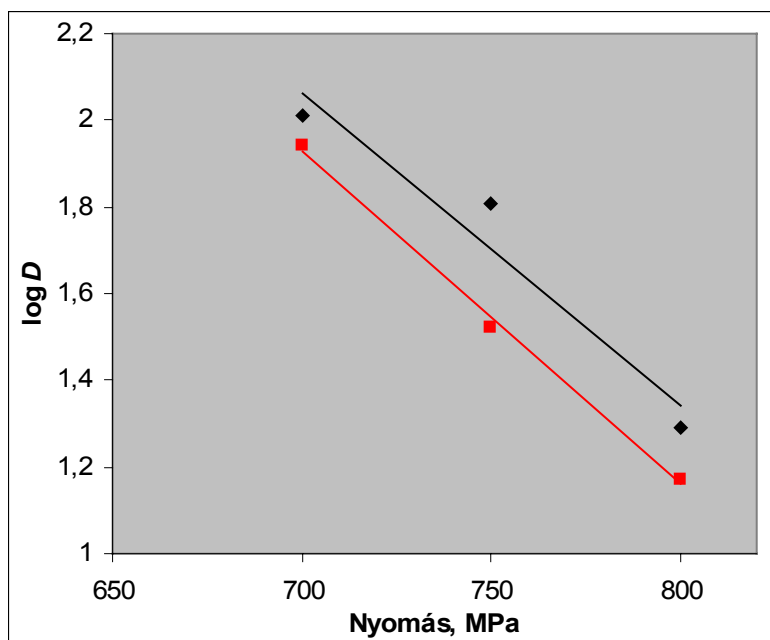
Hőmérséklet, °C	Nyomás, MPa	D, min		
		pH=4,5	pH=5,5	pH=6,0
10	650	130,23 ± 4,01	-	-
	700	59,98 ± 3,65	102,18 ± 2,17	187,97 ± 9,55
	750	17,25 ± 2,52	64,24 ± 2,50	55,65 ± 1,96
	800	-	19,46 ± 1,66	30,72 ± 0,51
	z_D , MPa	113,91 ± 15,32	138,85 ± 35,30	127,11 ± 25,24
25	650	72,65 ± 1,37	-	-
	700	39,49 ± 1,96	87,13 ± 4,61	161,37 ± 4,90
	750	11,51 ± 0,39	33,49 ± 1,36	64,78 ± 3,40
	800	-	14,81 ± 0,22	24,19 ± 1,60
	z_D , MPa	124,97 ± 24,40	129,94 ± 5,94	121,33 ± 2,67

Az előzetes kísérletek során az általam izolált natív sárgarépa PME különböző kémhatású (pH=4,5-6,0) oldatait 650-800 MPa nyomástartományban a szobahőmérsékletnek megfelelő belső hőmérsékleten (25°C) hőmérsékleti tartományban mért inaktiválódása (8. táblázat) is elsőrendű kinetikát mutatott. Ennek illusztrálására is az pH=5,5 kémhatásra vonatkozó féllogaritmikus inaktiválódási kinetikákat mutatom be (5. ábra).



5. ábra. A natív sárgarépa PME (pH=5,5) nagynyomású inaktiválása 10°C hőmérsékleten, (◆) 700 MPa, (■) 750 MPa, (▲) 800 MPa, 25°C hőmérsékleten, (◆) 700 MPa, (■) 750 MPa és (▲) 800 MPa nyomás értéken.

A tizedelődési idő logaritmusának nyomásfüggése 10°C hőmérsékleten lineáris volt, 25°C hőmérsékleten a linearitás elvetéséhez vagy igazolásához további vizsgálatok szükségesek. Ennek illusztrálására is a pH=5,5 kémhatásra vonatkozó ábrát mutatom be (6. ábra). A natív sárgarépa PME oldatának nagynyomású kezelése során az aránylag alacsony nyomástartományban (650-700 MPa) csak olyan savas kémhatásnál (pH=4,5) következett be gyors inaktiválódás, amely az iparilag előállított sárgarépalére vonatkoztatva már a megszokottól eltérő ízt eredményezhet. A magasabb nyomástartományban megállapítható volt, hogy a natív sárgarépa PME oldatának inaktiválódása inkább az alkalmazott nyomás nagyságától, mint a közeg kémhatásától függ.



6. ábra. A natív sárgarépa PME (pH=5,5) nagynyomású inaktiválása D -értékeinek nyomásfüggése (◆) 10°C és (■) 25°C hőmérsékleteken.

A natív sárgarépa PME hőinaktiválódására és nagynyomás hatására bekövetkező aktivitáscsökkenésére vonatkozó eredményeimet közleményben foglaltam össze [BALOGH et al, 2004b].

4.2 Az α - és β -glükózidáz rögzítése

Az α - és β -glükózidázokat olyan hordozókhoz rögzítettem, amelyeket a célkitűzések szempontjából előnyösnek találtam.

4.2.1 Az α - és β -glükózidáz rögzítése Akrilex C-100 hordozóra

Kiindulási pontom a Tanszéken szerzett korábbi tapasztalatok alapján a könnyen beszerezhető Akrilex C-100 (Reanal) kémiaiilag módosított, azaz részlegesen hidrolizált – szabad karboxilcsoportokat is tartalmazó – poliakrilamid hordozó volt, amelyet az irodalomban elsőként alkalmaztak mind az α -, mind a β -glükózidáz rögzítésére és ez egyben az α -glükózidáz első irodalomban leírt rögzítése is volt [KOSÁRY et al., 1998b,c]. Mind az α -, mind a β -glükózidáz Akrilex C-100 hordozóra történő rögzítését optimáltam és megvizsgáltam, hogy a rögzített enzimek megfelelnek-e céljaimnak. Az alkalmazott puffer mennyiségét csökkentettem, a kevertetést 8 órával hosszabb ideig végeztem és a karbodiimid – enzim arányt a karbodiimid javára lecsökkentettem. Az optimálás során sikerült a rögzített β -glükózidáz aktivitását az irodalomban leírt [KOSÁRY et al., 1998b,c] $73 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ xerogél értékről mintegy kétszeresére, $153 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ xerogél értékre növelnem, a hozamot pedig 13 százalékról 27 százalékra javítanom.

Az optimálás során a rögzített α -glükózidáz aktivitását és hozamát is sikerült javítanom: az aktivitást az irodalom [KOSÁRY et al., 1998b,c] szerinti $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ xerogél értékről $3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ xerogél értékre, a hozamot pedig 3 százalékról 4 százalékra növeltem. Az α -glükózidáz Akrilex C-100 hordozóra történő rögzítése azonban erőfeszítéseim ellenére sem vált olyan jelentőssé, hogy arra preparatív szintetikus módszert alapozni lehessen.

4.2.2 A β -glükózidáz rögzítése felületi rétegre

Az osztrák magyar tudományos együttműködés keretében tíz év óta van kooperáció a Tanszék (Dr. Kosáry Judit) és a bécsi Agráregyetem (Universität für Bodenkultur) Ultraszerkezetkutató Központja között. A korábbi együttműködés során több, a szénhidrát anyagcserében szerepet játszó enzim rögzítését megkísérelték mind csak fehérjét tartalmazó, a *Bacillus stearothermophilus* PV 72 törzsből izolált, mind a glikoproteinekből felépülő *Clostridium thermosulfuricum* L 111-69 törzsből izolált felületi rétegekhez. Ezeket a kísérleteket a felületi réteg glutáraldehides térhálósítása után kovalens rögzítéssel (karbodiimides módszer) hajtották végre. Megállapították, hogy a glikoproteint

tartalmazó felületi réteg jelenlétében az enzimek nagy része kötődés nélkül is jelentősen veszít aktivitásából. A csak fehérjéből felépülő felületi rétegre a következő enzimeket rögzítették: hexokináz (élesztőből), aldoláz (nyúl vázizomból) és ATP függő foszfofruktokináz (nyúl vázizomból), de a rögzítés hozama mindegyik esetben 1 % alatt maradt. Sajnos ezeket az eredményeket nem közölték.

Mivel az enzimek felületi rétegre történő rögzítésére eddig még adatot nem találtam, ugyanakkor a felületi reteget, mint hordozót az irodalmi áttekintésben ismertetett előnyök (2.4.1.2 fejezet) miatt már elvi okokból is érdekesnek találtam, rögzítési kísérleteket terveztem – a korábbi tapasztalatokra való tekintettel a *Bacillus stearothermophilus* PV72 törzsből izolált, csak fehérjéből felépülő felületi rétegre. A karbodiimides rögzítési módszer kudarca miatt egy új, szokatlanul egyszerűnek tűnő enzim rögzítési eljárást dolgoztam ki a felületi rétegre.

A felületi réteg nem megfelelően szilárd szerkezeti tulajdonságai miatt már eddig is általános gyakorlat volt az alkalmazás előtti glutáraldehides térhálósítás. Ezt a térhálósítást koimmobilizálással kötöttem össze: a felületi réteg és a rögzíteni kívánt enzim keverékét kombinált keresztkötésekkel kapcsoltam össze glutáraldehid segítségével. Az új módszert először a korábban karbodiimides módszerrel sikertelenül rögzíteni próbált enzimeken teszteltem. Próbálkozásaim az alábbi eredménnyel jártak:

- Hexokináz (élesztő); a rögzítés hozama 9,6 %, a rögzített enzim aktivitása 1 g száraz felületi rétegre számolva $54 \mu\text{mol min}^{-1}$.
- Aldoláz (nyúl); a rögzítés hozama 7,4 %, a rögzített enzim aktivitása 1 g száraz felületi rétegre számolva $11 \mu\text{mol min}^{-1}$.
- ATP-függő foszfofruktokináz; a rögzítés hozama 2,4 %, a rögzített enzim aktivitása 1 g száraz felületi rétegre számolva $59 \mu\text{mol min}^{-1}$.

A β -glükozidázt az előbbieknél jobb hozammal (12,5 %) tudtam a felületi réteghez kötni, a rögzített enzim aktivitása 1 g száraz felületi rétegre számolva $82 \mu\text{mol min}^{-1}$ volt. Bár ez a hozam ahhoz alacsony, hogy egy nagyobb léptékű előállítás alapja legyen, de az eljárás több okból is fontosnak látszik. Egyrészt beigazolódott az a feltevés, hogy a felületi réteg és egy enzimfehérje, különösen a β -glükozidáz között glutáraldehiddel sikeresen lehet kovalens kapcsolatot teremteni. Ezen kívül ez az eljárás tekinthető az eddigi legsikeresebb felületi rétegre történő enzimrögzítésnek.

A felületi réteghez rögzített β -glükozidáz bármelyik vizsgált szerves oldószerben azonnal elvesztette aktivitását, így reverz hidrolitikus folyamatokban alkalmazni nem lehetett, egy másik

kutatási célkitűzésemhez, a borok aromaprofiljának módosítására azonban felhasználhatónak látszott. Az új rögzített enzimek készítmény önmagában azonban több okból nem volt alkalmazható borászati célokra. Ugyanis egyrészt a felületi réteghez rögzített β -glükózidáz (akár a felületi réteg önmagában) még térhálósított formában is egy rendkívül finom eloszlású, csak centrifugálással ülepíthető anyag. Valamint az enzimek készítmény használata – lévén a felületi réteg maga is fehérjéből áll – nem kívánatos módon idegen fehérjét juttatna a borba. Ezért a felületi réteghez rögzített β -glükózidázt a szokásos módon kalcium-alginát gyöngyökbe zártam. A felületi réteg gélbezárása eddig még nem volt ismert.

4.2.3 A felületi réteghez kötött β -glükózidáz kalcium-alginát gyöngyökbe zárása

A felületi réteghez kötött β -glükózidáz kalcium-alginát gyöngyökbe zárását 37 százalékos hozammal hajtottam végre. Az enzimek készítmény aktivitása 1 g kalcium-alginát gélre számolva $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ volt. Ez a megoldás a borok kezelése szempontjából számos előnnyel járt. A felületi réteghez való rögzítés meggátolta, hogy az enzim a gél aránylag nagy pórusain kidiffundáljon, így a β -glükózidáz a bort szennyezze. Ezen kívül a gélbezárás a felületi réteg fehérjetartalmát is távol tartotta. Ráadásul a kalcium-alginát gyöngyökről a bort egyszerűen dekantálni lehetett.

A készítmény alkalmazását a borok aromaanyag tartalmának növelésére a 4.3.1.4 fejezetben ismertetem.

4.2.4 Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz aktivitásának meghatározása, illetve azonnali inaktiválódásának vizsgálata

Az Akrilex C-100 rendkívüli duzzadókéességét [KOSÁRY et al., 1994] figyelembe véve, az erre a hordozóra rögzített glükózidázokkal kapcsolatban egy olyan modellrendszert alakítottam ki, amelyben az aktivitásmérést és a stabilitásvizsgálatot azonos körülmények között tudtam vizsgálni. A liofilizált, rögzített glükózidázokat ennek megfelelően először vízben duzzasztottam. A stabilitásmérés során ugyanis a kezelt, rögzített enzimek kiszűrése és vizes mosása következtében a glükózidázok ugyancsak duzzasztott formában kerültek vizsgálatra.

Mivel az Akrilex hordozóra rögzített β -glükózidáznak a reverz hidrolitikus folyamatokban főszerepet szántam, ezért enzimkinetikai tulajdonságait részletesebben megvizsgáltam. Úgy találtam, hogy a 3.2.3.1 fejezetben ismertetett körülmények között a rögzített enzim kinetikai állandói az alábbiak voltak: V_{max} $233 \mu\text{mol min}^{-1}$, K_M $0,1 \text{ M}$. ezeket a paramétereket tudományos

közleményben publikáltam [BALOGH et al., 2004a]. A rögzített α -glükózidáz rendkívül gyenge rögzítési eredményei és nem túl kedvező stabilitása miatt vele enzimkinetikai méréseket nem végeztem.

Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz azonnali inaktiválódását különböző, 5-15 % víztartalmú, vízzel elegyedő és nem elegyedő aprótikus szerves oldószerben vizsgáltam – a reverz hidrolízis körülményeit modellezendően 10 % hexanol, mint glükóz akceptor jelenlétében. A natív enzimekkel végzett inaktiválódási eredmények alapján nem tartom meglepőnek, hogy a rögzített glükózidázok azonnali inaktiválódása jelentős mértékű volt a legtöbb vizsgált szerves oldószerben, ettől csak a DAE és a TRA hígítószeres esetében és csak a β -glükózidáznál találtam eltérést. A továbbiakban a rögzített α - és β -glükózidáz azonnali inaktiválódását már csak olyan 5-15 % vizet és 10 mM glükóz stabilizálószeret tartalmazó reakcióelegyekben vizsgáltam, amelyek a már korábban tesztelt alkoholokon kívül 0, 50, 90 % DAE, illetve TRA hígítószeret tartalmaztak.

A két Akrilex C-100 hordozóhoz kötött glükózidáz viselkedésében a hígítószeres jelenlétében jelentős különbség mutatkozott. Míg a rögzített β -glükózidáz még 90 % DAE hígítószeret tartalmazó reakcióelegyekben is képes volt megőrizni eredeti aktivitásának kb. 30 százalékát (**9. táblázat**), a rögzített α -glükózidáz analóg körülmények között eredeti aktivitásának majdnem az egészét (85-90 %) elvesztette (**11. táblázat**). Hasonló eredményeket kaptam a TRA hígítószer alkalmazása esetében is (**10. és 12. táblázat**). A rögzített glükózidázok azonnali inaktiválódására vonatkozó értékeket közleményekben foglaltam össze [BALOGH et al., 2004a; BALOGH & KOSÁRY, 2004].

9. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző DAE tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	52±5	25±6	28±4
<i>n</i> -pentanol	42±4	22±5	24±3
<i>n</i> -hexanol	65±5	30±6	35±3
ciklohexanol	71±7	28±7	28±3
2-butoxi-etanol	50±3	31±3	30±3
2-metoxi-etanol	38±3	28±3	28±3
2-fenoxi-etanol	27±3	20±3	22±3

10. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző TRA tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	52±5	36±3	32±3
<i>n</i> -pentanol	42±4	40±3	32±3
<i>n</i> -hexanol	65±5	45±3	43±3
ciklohexanol	71±7	40±3	38±3
2-butoxi-etanol	40±3	35±3	34±3

11. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző DAE tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	32±4	13±4	11±4
<i>n</i> -pentanol	29±4	11±4	10±4
<i>n</i> -hexanol	37±4	15±4	11±4
ciklohexanol	36±4	14±4	11±4
2-butoxi-etanol	25±4	16±3	13±4
2-metoxi-etanol	27±4	14±4	11±4
2-fenoxi-etanol	20±4	12±4	10±4

12. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző TRA tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % a vizes oldatban mért aktivitás).

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	32±4	15±4	13±4
<i>n</i> -pentanol	29±4	12±4	12±4
<i>n</i> -hexanol	37±4	15±4	14±4
ciklohexanol	36±4	14±4	13±4
2-butoxi-etanol	25±4	16±4	13±4

A fenti eredmények alapján arra a következtetésre jutottam, hogy az α -glükózidázzal kapcsolatos további vizsgálatoktól eltekintek. Egyrészt az α -glükózidáz Akrilex C-100 hordozóra rögzítése rendkívül gyenge hozammal járt, másrészt mind a natív, mind a rögzített enzim azonnali inaktiválódása – különösen a DAE és TRA hígítoszerek jelenlétében – majdnem teljes (85-90 % mértékű) volt. Mivel a reverz hidrolitikus folyamatokban nyerhető *o*-alkil-glükózidok felületaktív tulajdonságai csaknem függetlenek az alkilcsoport elhelyezkedésétől, célszerűbbnek találtam, hogy a továbbiakban csak a β -glükózidáz reverz hidrolitikus reakcióival foglalkozzam.

4.3 Az α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazhatóságának modellezése

4.3.1 Rögzített β -glükózidáz készítmények tesztelése borok aromaprofiljának módosítására

A borok aromaprofiljának módosítására kétféle rögzített β -glükózidáz preparátumot teszteltem. Az új, felületi rétegre rögzített β -glükózidáz preparátum alkalmazhatóságát borok kezelésével teszteltem. Mivel a fehérje alapú hordozó megemelte volna a borok fehérje tartalmát, ezért a készítményt alginát gélbe zártam. Hatékonyságát az erre a célra még nem vizsgált, de már ismert Akrilex C-100 hordozóra rögzített készítményhez viszonyítottam.

4.3.1.1 Alkohol tartalom hatása a β -glükózidáz aktivitására

Ahhoz, hogy meg tudjam állapítani a natív és az általam készített két rögzített β -glükózidáz készítmény alkalmasságát az borok aromaprofiljának módosítására, először modelleznem kellett a borokban elvégzendő kísérletek körülményeit. Ennek megfelelően megvizsgáltam a két készítmény azonnali és inkubálási inaktiválódását 5-15 v/v % alkoholtartalmú vizes elegyekben.

Az 5 % és 10 % alkoholtartalmú vizes elegyekben a vizsgált natív és a rögzített β -glükózidáz preparátumok a vizes közegben mért aktivitásához képest azonnali inaktiválódást gyakorlatilag nem tapasztaltam. A 15% alkoholtartalmú elegyekben az azonnali inaktiválódás mértéke némileg nőtt. A vizes közegben mért eredeti enzimaktivitáshoz (100 %) képest a natív β -glükózidáz esetében a maradékaktivitás 82 %, a kalcium-alginát gyöngyökbe zárt felületi rétegre rögzített β -glükózidáz esetében 85 % és az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz esetében pedig 90 % volt.

A 24 órás inkubálási inaktiválódás esetében a vizes közegben mért eredeti enzimaktivitáshoz (100 %) képest a natív β -glükózidáz esetében a maradékaktivitás 59 %, a kalcium-alginát gyöngyökbe zárt felületi rétegre rögzített β -glükózidáz esetében 61 % és az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz esetében pedig 75 % volt. Az eredmények alapján joggal remélhettem, hogy a borok 16 órás aromaprofil módosítási kísérleteim során a vizsgált rögzített β -glükózidáz készítmények aktivitása megfelelő lesz.

4.3.1.2 Dekantálási vizsgálatok

Ezen kívül az előkísérletek során arról is meg kellett bizonyosodnom, hogy az alkalmazott rögzített β -glükozidáz készítmények a kezelés után nem szennyeznek a bort. Már korábban utaltam arra, hogy a kezelés után a bor dekantálása során az Akrilex C-100 hordozó esetében némi felkavarodás volt tapasztalható (3.5.1.1 fejezet), ezért a fenti feltételnek kizárólag a kalcium-alginát gél gyöngyökbe zárt felületi réteghez kötött β -glükozidáz preparátum tett maradéktalanul eleget.

4.3.1.3 A borok kiválasztása

Nagyon aromás, muskotályos borokat választottam. Közülük a 1999 évjáratú Balaton Boglári Muskotály Cuvét, azaz BB bort azért választottam, mert mind összetevői, mind készítési helye szerint Magyarország egyik legjellegzetesebb muskotályos bora. Ismereteim szerint az általam vizsgált évjárat (1999) korábban aromaprofil módosítás céljából enzimés kezelésben nem részesült. A másik vizsgált bor, a ZSO bor, a budafoki Promotor Borászati Szakközépiskola Tangazdaságában készült. Feltehetően azért, mert háromféle típusú, muskotályos aromájú szőlőből készült (zöld veltelíni, szürkebarát és olaszrizling) és illata, muskotályos jellege a BB borénál is erősebb volt. A ZSO bort a vizsgálatok megkezdése előtt (2003) alig egy hónappal készítették, a szokásos borkezelési folyamatokon kívül más kezelési eljárásban nem vett részt. Lehetőségem nyílt arra is, hogy a ZSO bort alkotó szőlőfajták pektin-metil-észteráz és β -glükozidáz aktivitását megvizsgáljam. Ezekről az eredményekről a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok biokémiai vizsgálatával foglalkozó fejezetben (4.3.3 fejezet) számolok be.

4.3.1.4 A borok kezelése rögzített β -glükozidáz készítményekkel

Annak ellenére, hogy kizárólag a felületi rétegre rögzített, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükozidázzal és az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükozidázzal végzett kísérleteim eredményét mutatom be, előzetes kísérleteket végeztem a natív β -glükozidázzal is. A natív β -glükozidáz ugyan nem kívánatos mértékben emelte a borok fehérjetartalmát, de arra alkalmas volt, hogy a borok kezelési paramétereit optimálhassam (3.5.1.1 fejezet).

A kezeletlen és kezelt borok aromaminőségének vizsgálatát gázkromatográfias módszerrel végeztem. Arra ugyan nem volt lehetőségem, hogy teljes aromaprofil vizsgálatokat végezzek, de az aromaprofil gazdagodását két jellemző aromakomponens koncentrációjának szignifikáns változásával jellemeztem (**13.** és **14. táblázat**). Két különböző polaritású gázkromatográfias

oszlopot alkalmaztam és csak akkor tekintettem a jellemző aromakomponensek koncentráció változását szignifikánsnak, ha ez mind a két oszlopon megfigyelhető volt. Az eredmények megadásakor a komponensek mennyiségi arányait a gázkromatográfiás vizsgálatok során kapott görbe alatti területek arányai alapján számoltam, mennyiségének növekedését a kezeletlen borban mért mennyiségre (100 %) vonatkoztattam.

13. táblázat. A kezelt borok gerániol tartalmának változása (%) a rögzített β -glükózidáz készítmények hatására.

	Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz	Felületi rétegre rögzített, kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidáz
BB bor (100 % 0,10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	198	192
ZSO bor (100 % 0,11 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	267	348

14. táblázat. A kezelt borok linalool tartalmának változása (%) a rögzített β -glükózidáz készítmények hatására.

	Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz	Felületi rétegre rögzített, kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidáz
BB bor (100 % 3,20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	378	380
ZSO bor (100 % 5,41 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	236	240

Tehát előzetes eredményeim szerint mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz, mind pedig a felületi rétegre rögzített, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidáz alkalmasnak látszik a borok aromaprofiljának módosítására. Ezeknek az ígéretes eredményeknek azonban egyelőre inkább csak elvi jelentősége van a készítmények korlátozott előállíthatósági lehetőségei és magas előállítási költségei miatt.

A borok aromamódosításával kapcsolatos eredményeimet közleményben foglaltam össze [BALOGH et al., 2004c].

4.3.2 A sárgarépból készült élelmiszeripari készítmények minőségjavítása a pektin-metilészteráz tartalom csökkentésével

Korábban csak a natív sárgarépa PME hőkezelési és nagynyomás hatására bekövetkező inaktiválódásának kinetikáját vizsgálták [NGUYEN et al., 2002a], de a sárgarépból készült élelmiszeripari készítményeket eddig ebből a szempontból még nem vizsgálták. Közülük elsőnek a

legelterjedtebben alkalmazott sárgarépalé és az újabban divatba jött szeletelt sárgarépa PME tartalmának kinetikai vizsgálatát választottam. A készítmények kezelése során felhasználtam azokat a tapasztalatokat, amelyeket a natív sárgarépa PME inaktiválódásával kapcsolatban nyertem. A kétféle készítményt a laboratóriumi körülmények között modelleznem kellett. Ez a szeletelt sárgarépa esetében nem jelentett gondot, de a sárgarépalé készítésekor bizonyos nehézségekkel kellett szembenéznem. A laboratóriumi körülmények között ugyanis nem fordul elő az, hogy a gyümölcscentrifugával végrehajtott lényerés során a sárgarépalébe az erősen a sejtfalhoz kötött PME átjusson, az ipari lényerés során ez azonban mindennapos jelenség. A laboratóriumban készített sárgarépalét ezért a sárgarépalével azonos kémhatású (pH=6,0) natív sárgarépa PME oldattal egészítettem ki (3.3.2.1 B fejezet) és ezt a keveréket kezeltem.

A szeletelt sárgarépában a hő- és nagynyomású kezelés során végbement PME aktivitásváltozásokra a kezelt szeletekből készült kivonatokban mért PME aktivitás alapján következtettem. A hőinaktiválódási kísérletek (3.5.2.1 fejezet) után a kivonatok az irodalmi módszer szerint (3.3.2.1 A fejezet) készítettem, mert a hőkezelésre elegendő mennyiségű (20 g) mintát tudtam felhasználni.

A nagynyomású kezeléseket esetében azonban egy-egy minta mindössze 3,6 g tömegű volt, ezért célszerűbbnek láttam a kivonási eljárás egyéni egyszerűsítését, amely során a kivonást valamivel kevésbé bázikus (pH=8,5 helyett pH=8,0) körülmények között, nátrium-kloridra nézve 1 M töménységű 0,2 M TRISZ (pH=8,0) extraháló pufferrel végeztem (3.3.2.3 fejezet), és közvetlenül a csapadékos elegyek PME aktivitását mértem (3.3.3.1 fejezet). A kétféle módon nyert kivonatok PME aktivitás között nem volt szignifikáns aktivitás különbség, tehát a PME melletti egyéb, a sárgarépában előforduló fehérjék az aktivitásmérést nem zavarták, ráadásul az eljárás így jelentős mértékben egyszerűsödött és egy nappal lerövidült.

4.3.2.1 Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben lévő pektin-metil-észteráz hőinaktiválása

Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező elegyben oldott PME hőinaktiválódása a natív sárgarépa pektin-metil-észterázhoz hasonlóan elsőrendű inaktiválódási kinetikát mutatott (**15. táblázat**) és hasonló értékekkel rendelkezett, mint az azonos kémhatású (pH=6,0) natív sárgarépa PME oldat. Feltételezhető, hogy az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben lévő PME valamivel kisebb mértékű inaktiválódásának hátterében a kivonatban maradt idegen fehérjék stabilizáló hatása is állhat.

15. táblázat. A natív sárgarépa PME (pH 6,0) és sárgarépalében lévő PME hőinaktiválására jellemző kinetikai paraméterei atmoszférikus nyomáson (a standard hiba feltüntetésével).

Hőmérséklet, °C	$D_{\text{sárgarépalé}}, \text{min}$	$D_{\text{natív PME}}, \text{min}$
50	361,27 ± 4,18	284,49 ± 8,19
52	147,06 ± 2,20	122,65 ± 5,07
54	66,62 ± 0,84	47,66 ± 2,56
56	34,75 ± 0,84	24,90 ± 0,22
58	10,27 ± 0,28	10,08 ± 0,14
60	7,32 ± 1,11	3,59 ± 0,22
$z_T, ^\circ\text{C}$	5,73 ± 0,31	5,37 ± 0,15

4.3.2.2 A szeletelt sárgarépa-ban lévő pektin-metil-észteráz hőinaktiválása

A natív sárgarépa pektin-metil-észterázhoz és az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező elegyben oldott pektin-metil-észterázhoz hasonlóan a szeletelt sárgarépa PME aktivitásának hőinaktiválódása is elsőrendű kinetikát mutatott (**16. táblázat**), de az inaktiválódás mértéke a szeletelt sárgarépa-ban jelentősen kisebb volt, az előzőeknél alkalmazott kezelési körülmények között gyakorlatilag nem tapasztaltam inaktiválódást. A szeletelt sárgarépa hőinaktiválódási kinetikájának vizsgálatára ezért magasabb hőmérsékleti tartományt (a korábban alkalmazott 50-60°C helyett 66-74°C) alkalmaztam. Amíg az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező elegyben oldott pektin-metil-észteráz tizedelődési ideje 7,32 perc, illetve a natív pektin-metil-észteráz oldat (pH=6,0) tizedelődési ideje pedig 3,59 perc volt 60°C hőmérsékleten, addig a szeletelt sárgarépa-ban lévő PME tizedelődési ideje 648,51 perc volt 66°C hőmérsékleten. A szeletelt sárgarépa-ban lévő PME lényegesen nagyobb hőstabilitásáért talán az enzim természetes környezetének stabilizáló hatása lehet a felelős.

16. táblázat. A szeletelt sárgarépa PME aktivitásának hőinaktiválására jellemző kinetikai paraméterek atmoszférikus nyomáson (a standard hiba feltüntetésével).

Hőmérséklet, °C	D, min
66	648,51 ± 49,38
68	192,20 ± 18,07
70	64,75 ± 2,92
71	50,91 ± 4,32
73	18,28 ± 0,76
74	5,24 ± 0,40
$z_T, ^\circ\text{C}$	4,13 ± 0,31

4.3.2.3 Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben lévő pektin-metil-észteráz nagynyomású kezelése

Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben lévő PME nagynyomású inaktiválódását kizárólag 10°C belső hőmérsékleten végeztem, ugyanis tartottam attól, hogy a 25°C belső hőmérsékleten már a natív sárgarépa PME esetében is tapasztalt szignifikáns inaktiválódási hajlam az elegyben lévő egyéb fehérjék denaturálódásával összegződik. Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben lévő PME nagynyomású inaktiválódása az előzőekhez hasonlóan elsőrendű kinetikát mutatott és hasonló értékekkel rendelkezett (17. táblázat).

17. táblázat. A natív sárgarépa PME pH=6,0 és a sárgarépalében lévő PME nagynyomású inaktiválódási kinetikájára vonatkozó paraméterek összehasonlítása 10°C hőmérsékleten (a standard hiba feltüntetésével).

Nyomás, MPa	$D_{\text{sárgarépalé}}, \text{min}$	$D_{\text{natív PME}}, \text{min}$
700	171,61 ± 4,04	187,97 ± 9,55
750	77,93 ± 3,60	55,65 ± 1,96
800	36,18 ± 1,87	30,72 ± 0,51
z_p, MPa	147,91 ± 1,21	127,11 ± 25,24

Az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverék PME tartalma a nagynyomású kezelés során gyakorlatilag úgy viselkedett, mint a natív sárgarépa PME oldat.

4.3.2.4 A szeletelt sárgarépa pektin-metil-észteráz nagynyomású inaktiválása

Korábban csak a natív sárgarépa PME hőkezelési és nagynyomás hatására bekövetkező inaktiválódásának kinetikáját vizsgálták [NGUYEN et al., 2002a], de a sárgarépából készült élelmiszeripari készítményeket eddig ebből a szempontból még nem vizsgálták. A rendelkezésemre álló többedényes nagynyomású berendezés lehetővé tette a szeletelt sárgarépa PME tartalma inaktiválódási kinetikájának vizsgálatát. A natív sárgarépa pektin-metil-észterázhoz és az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező elegyben oldott pektin-metil-észterázhoz hasonlóan a szeletelt sárgarépa PME tartalmának nagynyomású inaktiválódása is elsőrendű kinetikát mutatott (18. táblázat). Az inaktiválódás mértéke a szeletelt sárgarépaiban jelentősen kisebb volt, az előzőeknél alkalmazott kezelési körülmények között gyakorlatilag nem tapasztaltam inaktiválódást.

A szeletelt sárgarépa nagynyomású inaktiválódási kinetikájának vizsgálatára ezért – mivel a nyomástartományt nem akartam megváltoztatni – magasabb hőmérsékletet (a korábban alkalmazott 10°C helyett 40°C) alkalmaztam.

A hőinaktiválási kinetika tárgyalásakor indokolt okokból a szeletelt sárgarépa pektin-metil-észteráz tartalmának nagynyomású inaktiválódása is lényegesen erélyesebb feltételek mellett ment végbe, mint a natív sárgarépa pektin-metil-észterázé. A natív sárgarépa PME tizedelődési ideje 10°C belső hőmérsékleten és 750 MPa nyomáson mért tizedelődési idejéhez (55,65 perc) képest a szeletelt sárgarépa tizedelődési ideje ugyanezen a nyomáson, de 40°C belső hőmérsékleten kb. háromszor akkora volt (161,39 perc).

18. táblázat. A szeletelt sárgarépa PME tartalmának nagynyomású inaktiválására vonatkozó kinetikai paraméterek (a standard hiba feltüntetésével).

Alkalmazott nyomás, MPa	<i>D</i> , min
700	391,54 ± 28,09
750	161,39 ± 15,11
800	75,81 ± 3,13
<i>z_P</i> , MPa	140,25 ± 6,44

A különböző sárgarépa készítmények PME aktivitásának hőkezelési és nagynyomás hatására bekövetkező inaktiválódási kinetikáját vizsgálatának tanulmányozása során egyenlőre nem találtam olyan speciális paraméter kombinációt, amely lehetővé tenné mind a szeletelt sárgarépaiban, mind az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverékben a PME igazán kíméletes, gyors és hatékony inaktiválását.

A különböző sárgarépa készítmények PME tartalmának hőinaktiválódására és nagynyomás hatására bekövetkező aktivitáscsökkenésére vonatkozó eredményeimet közleményben foglaltam össze [BALOGH et al, 2004b].

4.3.3 Az élelmiszeriparban alkalmazott növényi eredetű alapanyagok saját α- és β-glükozidáz, illetve pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálata

Az élelmiszeriparban alkalmazott növényi eredetű alapanyagok gazdag, saját enzimek készletének vizsgálata számos információval szolgálhat, amelyek alapján nemcsak jelenlegi állapotukra és eltarthatóságukra lehet következtetni, hanem más növényi jellemzőkre is. Az Alkalmazott Kémia Tanszéken folytatott, a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok tárolásával kapcsolatos

kutatásba kapcsolódva kamatoztathattam az α - és β -glükózidázzal, valamint a pektin-metil-észterázzal kapcsolatos ismereteimet. Már a vizsgálatok elején az általános tapasztalatom az volt, hogy a friss, valamint tárolt zöldségekben és gyümölcsökben az invertázban kifejezhető α -glükózidáz aktivitás rendkívül alacsony és a kivonatokban ez az aktivitás is nagyon gyorsan eltűnik. Ezért a további tesztelések során ezzel az enzimmal nem foglalkoztam.

A Tanszéken folyó kutatás során többféle enzimet, többféle szempontból és többféle céllal vizsgáltak. Ezek közül néhány olyan területet mutatok be, amelyekben egyéb enzimeken kívül az β -glükózidázt és a pektin-metil-észterázt is teszteltük. E vizsgálatok során világossá vált, hogy egyes célokra (pl. a zöldségek előfőzöttségének vizsgálata) a vizsgált növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok β -glükózidáz és a pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálata rendkívül alkalmas. Voltak olyan területek is, ahol ezen enzimek aktivitásának vizsgálata nem adott új információt a kutatás céljával kapcsolatban.

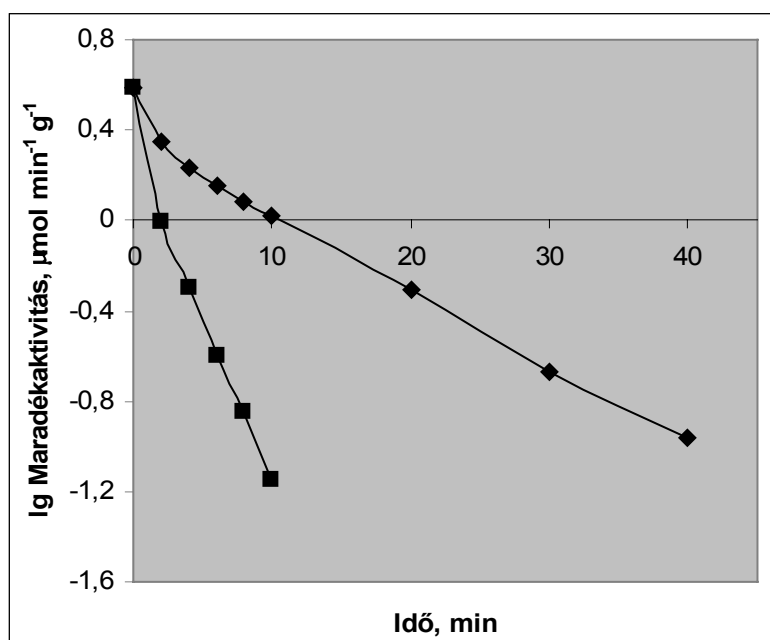
4.3.3.1 A különböző célokra szolgáló növényi kivonatok készítésének egységesítése

A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagokból nem tudtam olyan kivonatot készíteni, amely valamennyi, a kutatás során tesztelt enzim (a fent említett α - és β -glükózidázon, valamint a pektin-metil-észterázon kívül peroxidáz, lipoxigenáz, laktát-dehidrogenáz, α -kimotripszin, lipáz, polifenol-oxidáz, stb.) aktivitásmérésére alkalmas lett volna. Az a kivonószer, amelyet az α - és β -glükózidáz aktivitásmérésére fel tudtam használni, a pektin-metil-észterázon kívül valamennyi enzim vizsgálatára alkalmas volt (3.2.4.3 és 4.1.2 fejezet).

A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok pektin-metil-észteráz aktivitásának méréséhez BARNAVON speciálisan szőlő PME mérésre kidolgozott kivonatkészítési eljárását [BARNAVON et al., 2001] használtam, amelyet később az igényeimnek megfelelően jelentősen módosítottam, elsősorban rövidítettem (4.1.3 fejezet). Ez a rövidített eljárás igen tömény (0,5 mM) és erősen bázikus kémhatású (pH=8,5) növényi kivonatot eredményezett. Ezért a PME aktivitásméréshez nem a szokásosan alkalmazott, semlegesre állított kémhatású almapektin oldatot használtam (3.3.3.1 fejezet), hanem a pektin oldásakor eredetileg keletkező erősen savas oldatot (pH=3,0), mert csak ennek a segítségével lehetett a PME aktivitásméréséhez szükséges semleges kémhatást (pH=7,0) beállítanom.

4.3.3.2 A hazai primőr sárgarépa (*Daucus carota*) vizsgálata

Leuveni kísérleteim honosítása során szükségesnek láttam a kint használt sárgarépa és a kereskedelmi forgalomban kapható hazai sárgarépa PME aktivitásának összevetését, azonban az alkalmazott model rendszerek jelentősen eltértek. A két fajta külső megjelenésében (szín, méret és héjvastagság) és PME aktivitásában is különbözött egymástól. A Leuvenben vizsgált sárgarépa PME aktivitása $1,38 \mu\text{mol min}^{-1} \text{sárgarépa g}^{-1}$, a vizsgált hazai sárgarépáé pedig $3,88 \mu\text{mol min}^{-1} \text{sárgarépa g}^{-1}$ volt. A hazai sárgarépa inaktiválódási kinetikáját előfőzési kísérletekben vizsgáltam. A PME a hőkezelt sárgarépában 68°C kezelési hőmérsékleten gyakorlatilag teljesen megőrizte az aktivitását, 76°C kezelési hőmérsékletnél viszont már teljesen inaktiválódott.



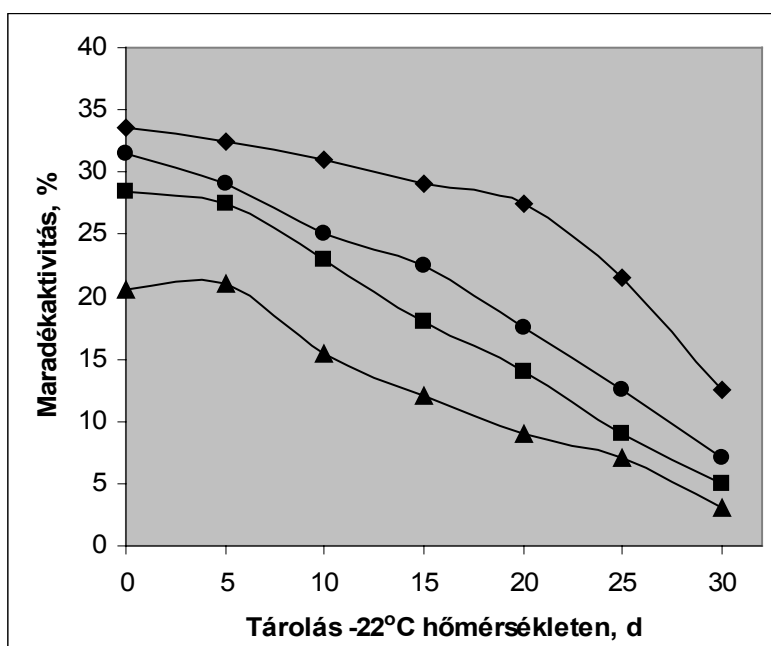
7. ábra. A PME inaktiválódási kinetikájának félogaritmikus összefüggése a hőkezelt sárgarépában.
 (◆) A kezelés hőmérséklete 72°C , (■) A kezelés hőmérséklete 74°C .

Feltételezhető, hogy a két alkalmazott modell rendszer jelentősen különbözött egymástól. Az itthoni vízfürdő hőtartása nem volt megfelelő, valamint a hazai sárgarépa sokkal keményebb textúrájú volt a belgiumi répánál. Valószínűleg a hőátadási gondok okozták az inaktiválódási kinetika, a logaritmikus összefüggés (7. ábra) nem teljes linearitását.

4.3.3.3 A brokkoli (*Brassica oleracea* convar. *Botrytis* provar. *Italica*) előfőzési kísérletei

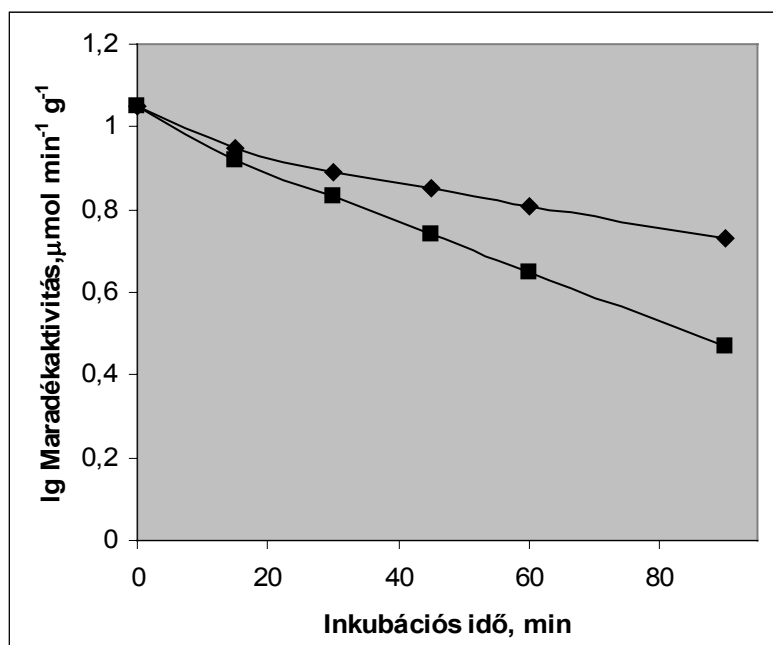
A Tanszéken már régóta folynak kísérletek olyan enzimek tesztelésére, amelyek az általánosan használt peroxidáznál alkalmasabbak az előfőzés eredményességének vizsgálatára. Az előfőzött brokkolit számos enzimre teszteltük, többek között a β -glükózidázra és a pektin-metil-észterázra. A brokkolit több tulajdonsága teszi alkalmas tanulmányozási modellnek az előfőzés és az azt követő hűtőtárolás tesztelésére. Elsősorban az, hogy egyes enzimeinek aktivitása – a többi zöldségféléhez képest – aránylag magas. A friss brokkoli β -glükózidáz aktivitása $144 \mu\text{mol min}^{-1} \text{brokkoli g}^{-1}$, PME aktivitása pedig $11,42 \mu\text{mol min}^{-1} \text{brokkoli g}^{-1}$ volt. Ezenkívül igen értékes, ugyanakkor még kevésbé vizsgált zöldségféle, amely a káposztafélékhez (Brassicaceae) tartozik és Magyarországon csak az elmúlt néhány évben vált népszerűvé.

Úgy találtam, hogy a brokkoli esetében a vizsgálatba bevont új enzimek közül mind a β -glükózidáz, mind a PME alkalmasnak mutatkozott az előfőzöttség jellemzésére. Közvetlenül a hőkezelés után a β -glükózidáz maradékaktivitása az alkalmazott hőmérséklettől függően 20-30% volt és az enzim aktivitása folyamatosan tovább csökkent a hűtőtárolás során (**8. ábra**).



8. ábra. A β -glükózidáz aktivitás alakulása az előfőzött: (◆) 90°C, 6 perc, (■) 95°C, 3 perc, (▲) 95°C, 4 perc, (●) 98°C, 2 perc, majd fagyasztott brokkoliban.

A PME az előfőzés alkalmazott paramétereire hatására (2-6 perc, 90-98°C) teljesen inaktiválódott és aktivitása a hűtőtárolás során sem regenerálódott, ezért érdemesnek találtam a brokkoli PME hőinaktiválódási kinetikájának részletes tanulmányozását. A hőkezelt brokkoliban a PME 65°C kezelési hőmérsékleten azonnal elvesztette aktivitását, ugyanakkor az 55°C kezelési hőmérsékleten még a 60 perces hőkezelés után is megőrizte teljes aktivitását. Úgy találtam, hogy a brokkoliban a PME inaktiválódási kinetikája 60 és 62°C közötti hőmérsékleti intervallumban végrehajtott hőkezelésnél tanulmányozható. A sárgarépa PME viselkedéséhez hasonlóan a brokkoli PME inaktiválódási kinetikája a logaritmusos összefüggése (9. ábra) alapján nem teljesen lineáris.

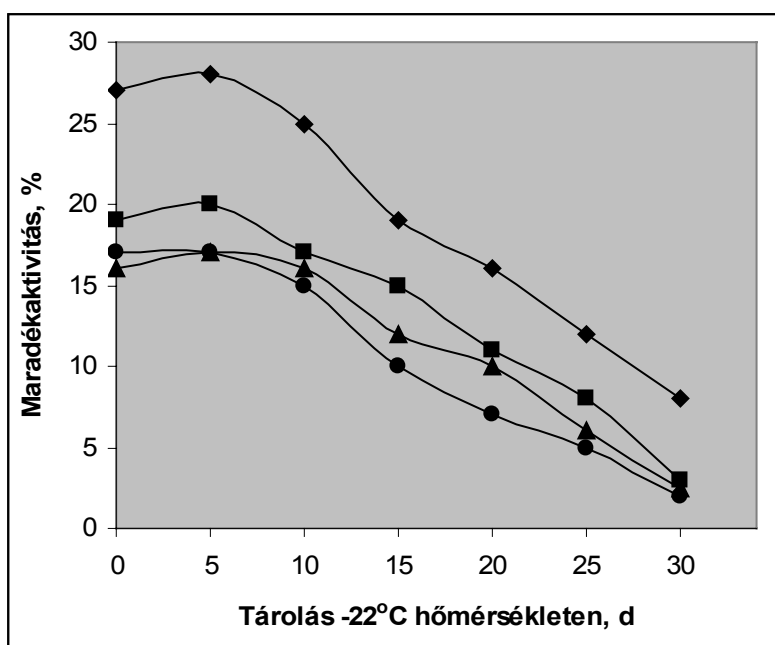


9. ábra. A PME inaktiválódási kinetikájának féllogaritmusos összefüggése a hőkezelt (◆) 60°C és (■) 62°C brokkoliban.

Feltételezésem szerint e két enzim aktivitásának vizsgálata nemcsak az előfőzés eredményességének jellemzésére, hanem a hűtőtárolás nyomon követésére is alkalmas lehet. A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok β -glükozidáz és a pektin-metil-észteráz tartalmának az előfőzés során bekövetkező változásáról konferencia kiadványban közölt publikációban számoltunk be [BALOGH et al., 2004d].

4.3.3.4 A karfiol (*Brassica cretica*) β -glükózidáz és pektin-metil-észteráz aktivitása

A karfiol előfőzésének vizsgálatakor is mértem a β -glükózidáz és a PME aktivitást. A karfiol β -glükózidáz aktivitása $377 \mu\text{mol min}^{-1} \text{karfiol g}^{-1}$ és PME aktivitása $3,93 \mu\text{mol min}^{-1} \text{karfiol g}^{-1}$ volt. A karfiol esetében is úgy találtam, hogy mind a β -glükózidáz, mind a PME alkalmas az előfőzöttség jellemzésére. Közvetlenül a hőkezelés után a β -glükózidáz maradékaktivitása az alkalmazott hőmérséklettől függően 15-27 % volt és az enzim aktivitása folyamatosan tovább csökkent a hűtőtárolás során (10. ábra). A karfiol PME a brokkoliéhoz hasonlóan az előfőzés körülményei között azonnal inaktiválódott és aktivitása a hűtőtárolás során sem regenerálódott.



10. ábra. A β -glükózidáz aktivitás alakulása az előfőzött: (◆) 90°C, 6 perc, (■) 95°C, 3 perc, (▲) 95°C, 4 perc, (●) 98°C, 2 perc, majd fagyasztott karfiolban.

4.3.3.5 A mandula (*Amygdalus communis*) hidroláz enzimekészetének vizsgálata

A Tanszéken folyó kutatás során számos esetben erőfeszítések voltak annak megállapítására, hogy az egyes növények különböző fajtái között az enzimekészetben, illetve az egyes enzimek aktivitásában van-e különbség. Kiderült, hogy több esetben ez a megkülönböztető paraméter a lipoxigenáz izoenzim összetétel. Ezt tapasztalták a mandula esetében is, ezért tartottam érdekesnek

a különböző mandulafajták β -glükózidáz és pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálatát. E két hidroláz tesztelésére azért is szükség volt, hogy megállapíthassam, a mandula és a belőle előállítható marcipán tárolása során az oxidatív folyamatokon kívül hidrolitikus folyamatok is szerepet játszanak-e.

A különböző édesmandula-fajták között lényeges eltérést nem találtam, átlagos β -glükózidáz aktivitás $59,72 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mandula g}^{-1}$ volt. Ez az aktivitás az oxidatív lebomlási folyamatokat modellező hőkezelés hatására (infralámpával előidézett 50°C hőmérsékleten 4 nap alatt) gyakorlatilag teljesen elveszett. Megállapítottam, hogy az édesmandula-fajták átlagos PME aktivitása $1,30 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mandula g}^{-1}$ és a különböző fajták között lényeges eltérést nem találtam, ez az aktivitás hőkezelés hatására (infralámpával előidézett 50°C hőmérsékleten 4 nap alatt) 22 százaléka csökkent. Ez a két enzim a mandula és a marcipán tárolása során nem játszik számottevő szerepet. A tapasztalatokat publikációkban foglaltuk össze [KOSÁRY et al., 2004a,b].

4.3.3.6 A borkészítésre kiválasztott szőlők (*Vitis vinifera*) β -glükózidáz és pektin-metil-észteráz aktivitása

Mindhárom szőlőfajtában, amelynek keverékéből készült borral (ZSO bor, 3.5.1.1 fejezet) aromaprofil módosítási kísérleteket végeztem, megmértem a β -glükózidáz és a PME aktivitást is. (19. táblázat). Nemcsak a szőlőbogyók, hanem a mustkészítés során visszamaradó préselmenyt és a mustot is vizsgáltam. A várakozásnak megfelelően a különböző mustokban a PME aktivitás gyakorlatilag nulla, a β -glükózidáz aktivitás pedig minimális ($< 2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{must g}^{-1}$). Nem kellett tehát attól félnem, hogy a borban számottevő enzimaktivitás marad.

19. táblázat. A kiválasztott szőlőfajták pektin-metil-észteráz és β -glükózidáz aktivitása, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

Vizsgált anyag	A β -glükózidáz és a pektin-metil-észteráz aktivitása, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$					
	Szürkebarát		Olaszrizling		Zöld Veltelíni	
	β -glükózidáz	PME	β -glükózidáz	PME	β -glükózidáz	PME
szőlő	49,8	0,629	53,00	1,110	85,86	0,847
pép	34,07	0,472	41,34	0,742	58,85	0,652
must	1,59	0	1,60	0	0,5	0

4.4 A felületaktív *O*-glükozidok szintézise α - és β -glükozidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal

A glükóz alifás alkoholokkal képzett *O*-glükozidjai a nem ionos, felületaktív anyagok egyik nagyon fontos csoportját képezik, amelyek ráadásul nem is toxikusak és biológiailag lebonthatók (2.6.1 fejezet). Mivel közülük néhányat nemcsak a gyógyszeriparban, hanem az élelmiszeriparban is sikeresen alkalmaznak detergensként, ezért szintézisük glükozidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal élelmiszeripari jellegűnek is tekinthető.

A 2.4.1.1 fejezetben és a 4. fejezet elején részletesen tárgyaltam azokat a korábbi tanszéki eredményeket, amelyekre reverz hidrolitikus vizsgálataim megtervezését alapozhattam. Céлом e kutatások folytatásaként részben az akkori eredmények pontosítása volt, valamint kísérletet tettem új reakciókörülmények bevezetésére, illetve eddig nem ismert *O*-glükozidok előállítására. Egyes reakciókörülmények kialakításánál is figyelembe kellett vennem a korábbi tapasztalatokat [KOSÁRY et al., 1998a,b,c]. Ennek megfelelően az α - és β -glükozidázok katalizálta reverz hidrolitikus reakciókban 5-15 % víztartalmat és 10 mM glükóz tartalmat alkalmaztam. Mint ezt már korábban említettem, ez utóbbi nemcsak szubsztrát, hanem az enzimet stabilizáló szer is volt. Ugyancsak a korábbi eredményekre alapozva a kapcsolási reakciókat szobahőmérsékleten, hat napig végeztem.

Mivel az inkubálási inaktiválódás méréséhez szükséges reakciókörülmények azonosak voltak a reverz hidrolitikus reakció körülményeivel, lehetőségem nyílt arra, hogy a stabilitási vizsgálatokat a reverz hidrolízissel egyidejűleg, azonos reakcióelegyben végezzem. Ezeknél a vizsgálatoknál a reakcióelegyekből, amelyek a vizes hígítás után a szerves oldószer elegyedőképességétől függően egy- vagy kétfázisú elegyek voltak, nemcsak a reverz hidrolízis konverziójára utaló glükóz analízist végeztem el, hanem a glükozidázok maradékaktivitását is meghatároztam. A vízzel hígított elegyekben számolni kellett a még nem inaktiválódott β -glükozidáz aktivitás hidrolizáló hatásával, ezért az elegyek vizsgálatát az *O*-glükozid tartalom meghatározásával és/ vagy a maradék glükóz mennyiségének meghatározásával kellett haladéktalanul megkezdenem.

4.4.1 Az α - és β -glükozidáz inkubálási inaktiválódása

A korábbi tapasztalatok alapján az Akrix C-100 hordozóra rögzített β -glükozidáz inkubálási inaktiválódását már csak olyan 5-15 % vizet és 10 mM glükóz szubsztrátot, egyben stabilizálószerrel

tartalmazó reakcióelegyekben vizsgáltam, amelyek a már korábban tesztelt alkoholokon kívül 0, 50 és 90 % DAE vagy TRA hígítószeret tartalmaztak. A fentiek értelmében az inkubálási inaktíviálódásra vonatkozó kísérleteket szobahőmérsékleten, 6 napig végeztem.

Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz inkubálási inaktíviálódására a DAE és a TRA oldószerek hatását a leggyakrabban tesztelt alkoholokra a **20.** és **21. táblázatban** foglaltam össze. Az azonnali inkubálási eredmények bemutatásához hasonlóan a tömörség kedvéért a reakcióelegyek víztartalmára (5, 10 és 15 %) vonatkozó konkrét értékeket átlagoltam és az eltérést zárójelben adtam meg. A rögzített β -glükózidáz inkubálási inaktíviálódására vonatkozó értékeket közleményekben foglaltam össze [BALOGH et al., 2004a; BALOGH & KOSÁRY, 2004 közlésre beküldve].

20. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz inkubálási (szobahőmérséklet, 6 nap) inaktíviálódási értékei (maradékaktivitás %) különböző DAE tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % az inkubáció elején mért aktivitás).

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	42±4	32±6	30±6
<i>n</i> -pentanol	42±5	33±6	30±6
<i>n</i> -hexanol	43±6	34±8	31±6
ciklohexanol	41±4	35±7	30±7
2-butoxi-etanol	43±4	40±7	30±7

21. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz inkubálási (szobahőmérséklet, 6 nap) inaktíviálódási értékei (maradékaktivitás %) különböző TRA tartalmú (víztartalom 5-15 %) reakcióelegyekben (100 % az inkubáció elején mért aktivitás).

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	42±4	35±7	32±6
<i>n</i> -pentanol	42±5	35±7	34±6
<i>n</i> -hexanol	43±6	37±7	33±6
ciklohexanol	41±4	34±7	31±6
2-butoxi-etanol	43±4	41±7	35±6

Felbátorodva a rögzített β -glükózidázzal kapcsolatos eredményeimen, a DAE és TRA hígítószereket a natív β -glükózidázzal is kipróbáltam. A preparatív szintézis szempontjából legkedvezőbb reakciókörülmények (alkohol-szerves oldószer 1:9, 10 % víztartalom) között. A

modellként szolgáló alkoholokat a kapcsolási reakciókat figyelembe véve választottam ki (*n*-hexanol és 2-butoxi-etanol). A natív β -glükózidáz nem azonos mértékben inaktiválódott az inkubációs vizsgálatok során. Az alkohol-DAE 1:9 reakcióelegyekben az inaktiválódás sokkal gyorsabb ($k \approx 16 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), a TRA jelenlétében viszont gyakorlatilag azonos mértékű volt, mint a rögzített β -glükózidáz esetében ($k = 9,05$, illetve $8,50 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) (4.4.2 fejezet) (**22. táblázat**). Ez volt az indíték, amiért megpróbáltam az *o*-glükózidok natív β -glükózidáz katalizálta preparatív szintézisét TRA hígítószerben (4.4.3.3 fejezet).

22. táblázat. A natív β -glükózidáz inkubálási (szobahőmérséklet, 6 nap) inaktiválódási értékei (maradék aktivitás %) 10 % vizet tartalmazó, alkohol-hígítószer (DAE vagy TRA) 1:9 összetételű reverz hidrolitikus reakcióelegyekben (100 % az inkubáció elején mért aktivitás).

	DAE	TRA
<i>n</i> -hexanol	10	27
2-butoxi-etanol	27	29

Mind a natív, mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz azonnali inaktiválódási értékei rendkívül kedvezőtlenek voltak, valamint a rögzítés hozama is alacsony, mindössze 4 % volt. Ez volt az oka annak, hogy a rögzített α -glükózidáz esetében a hígítószer alkalmazásától eltekintettem. A különböző alkoholokban is csak azért vizsgáltam meg az inkubálási inaktiválódást, mert ezt a reverz hidrolitikus folyamatok során meg tudtam határozni. A maradékaktivitás értékek a vártak megfelelően rendkívül alacsonyak voltak (**23. táblázat**).

23. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz inkubálási (szobahőmérséklet, 6 nap) inaktiválódási értékei (maradékaktivitás %) különböző, 10 % víztartalmú alkoholokban (100 % az inkubáció elején mért aktivitás).

	Maradékaktivitás (%)
<i>n</i> -butanol	15
<i>n</i> -pentanol	13
<i>n</i> -hexanol	18
ciklohexanol	13
2-butoxi-etanol	15

4.4.2 Az α - és β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának kinetikai elemzése

A natív és az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidázok inkubálási inaktiválódási adatai alapján kiszámítottam az inaktiválódás sebességi konstansait (k értékek). A k értékek meghatározásához mind a 4.1.2.1 és 4.2.4 fejezetekben bemutatott azonnali inaktiválódások (a vizes oldatban mért aktivitásra vonatkoztatott %), mind a 4.4.1 fejezetben bemutatott hatnapos inkubálás során mért inkubálási inaktiválódások (az inkubálás kezdetén mért aktivitásra vonatkoztatott %) abszolút értékeire (A_0 , illetve A) volt szükségem, a natív enzim esetében $\mu\text{mol min}^{-1}$ fehérje mg^{-1} , a rögzített enzim esetében pedig $\mu\text{mol min}^{-1}$ száraz gél g^{-1} mértékegységben. A k értékeket (10^{-3} h^{-1}) az elméleti enzimkinetikai mérések gyakorlatának megfelelően [KELETI, 1985] az inkubáció során mért abszolút aktivitási értékek és az inkubációs idő féllogaritmikus összefüggésének lejtéséből számítottam ki a $\lg A/A_0 = -0,4343 kt$ egyenlet alapján (a 0,4343 szorzó a természetes alapú és tizesalapú logaritmus közötti átszámolásból származik). Ugyanezen értékekből a felezési idő $t_{1/2}$ (h) is kiszámítható a $t_{1/2} = \ln 2/k$ egyenlet segítségével. Mivel azonban ezek az értékek újabb információt nem tartalmaznak, bemutatásuktól eltekintek.

24. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidázra vonatkozó inaktiválódási konstansok ($k \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) 10 % vizet és 0-90 % DAE hígítószeret tartalmazó reverz hidrolitikus reakcióelegyekben a szobahőmérsékleten, 6 napig tartó inkubálás folyamán.

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	6,03	7,92	8,36
<i>n</i> -pentanol	6,03	7,92	8,36
<i>n</i> -hexanol	5,89	7,51	8,13
ciklohexanol	6,17	7,30	8,36
2-butoxi-etanol	5,87	6,36	8,36

25. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidázra vonatkozó inaktiválódási konstansok ($k \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) 10 % vizet és 0-90 % TRA hígítószeret tartalmazó reverz hidrolitikus reakcióelegyekben a szobahőmérsékleten, 6 napig tartó inkubálás folyamán.

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	6,03	7,30	7,90
<i>n</i> -pentanol	6,03	7,30	7,51
<i>n</i> -hexanol	5,89	6,91	7,69
ciklohexanol	6,17	7,51	8,10
2-butoxi-etanol	5,87	6,19	7,30

26. táblázat. A natív β -glükózidázra vonatkozó inaktiválódási konstansok ($k \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) 10 % vizet tartalmazó, alkohol-hígítószer (DAE vagy TRA) 1:9 összetételű reverz hidrolitikus reakcióelegyekben a szobahőmérsékleten, 6 napig tartó inkubálás folyamán.

	DAE	TRA
<i>n</i> -hexanol	15,98	9,05
2-butoxi-etanol	16,69	8,50

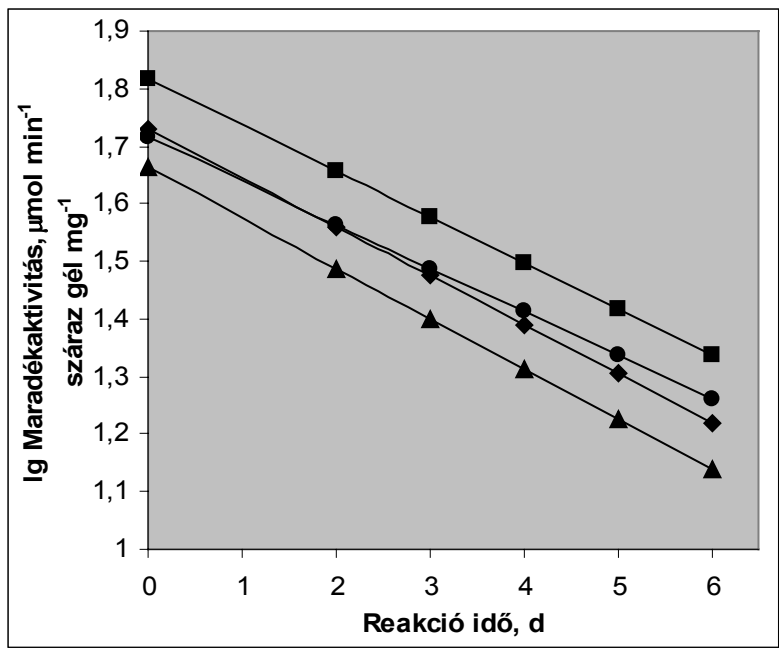
27. táblázat. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidázra vonatkozó inaktiválódási konstansok ($k \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) 10 % vizet tartalmazó reverz hidrolitikus alkoholokban a szobahőmérsékleten, 6 napig tartó inkubálás folyamán.

	$k \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
<i>n</i> -butanol	13,17
<i>n</i> -pentanol	14,18
<i>n</i> -hexanol	11,90
ciklohexanol	14,16
2-butoxi-etanol	13,65

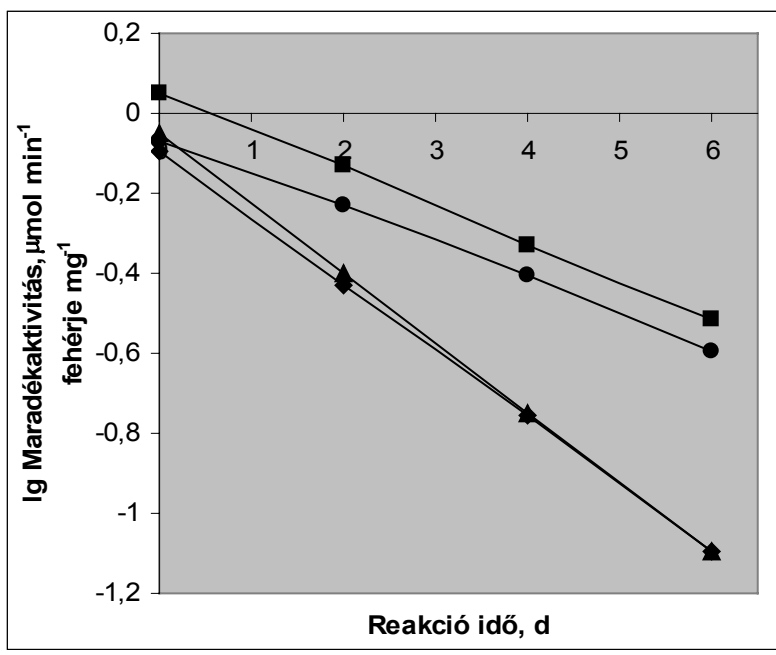
A vizsgált glükózidázok inaktiválódási kinetikájának részletes vizsgálatára elsősorban gyakorlati okokból volt szükségem. Ugyanis az eredmények elsősorban az inaktiválódási reakció k reakció konstansainak ismeretében tudtam az *o*-alkil-glükózidok előállítását célzó reverz hidrolitikus folyamatokat optimalni. Az enzimek inaktiválódásának enzimkinetikai vizsgálatait csak a szintetikus reakciókban legelőnyösebbnek látszó 10 % víztartalommal végeztem el.

Az eredmények kiértékelése során, a k reakció konstansok alapján megállapíthattam, hogy a DAE és TRA hígítószer csak minimális mértékben növelik az inaktiválódási hajlamot (**24.-27. táblázat**). Ez a kedvező tény jelentette azt a lehetőséget számomra, hogy a reverz hidrolitikus folyamatok során különböző okokból (szilárd vagy túlságosan drága hidroxil-vegyület) hígítószerként nem is alkalmazható hidroxil-vegyületekkel is próbálkozzam az *o*-glükózidok preparatív előállítása céljából. Számomra ugyanis ez volt a hígítószer alkalmazásának igazi célja (4.4.4 fejezet).

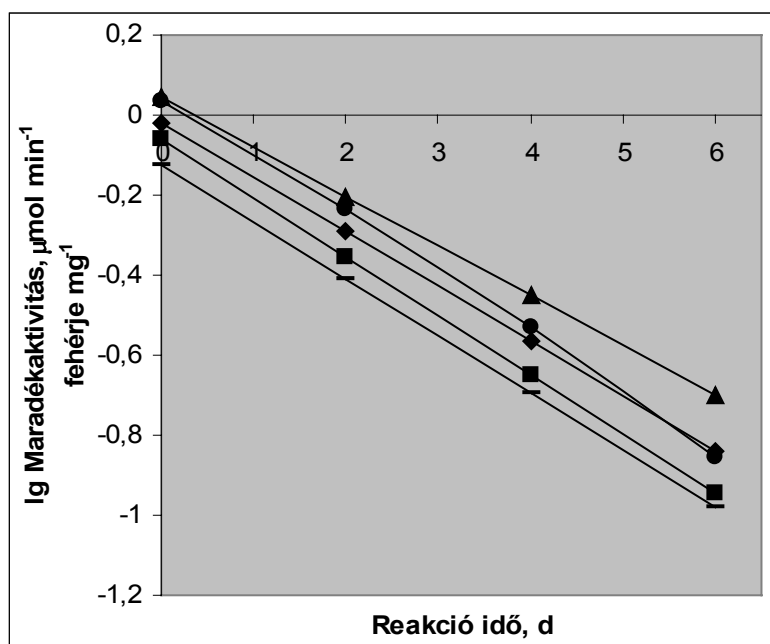
Az enzimkinetikai számítások és a féllogaritmikus ábrázolások (**11.-13. ábra**) alapján igazolható volt eredeti feltételezésem, hogy mind a natív, mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz inaktiválódási kinetikája elsőrendű, tehát az inaktiválódást nem előzi meg disszociáció.



11. ábra. Az Akrix C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz inkubálási (szobahőmérséklet, 6 nap) inaktíválódásának félogaritmikus ábrázolása 10 % vizet tartalmazó, alkohol-hígítószer (DAE vagy TRA) 1:9 elegyekben. (◆) *n*-hexanol – DAE, (■) *n*-hexanol – TRA, (▲) 2-butoxi-etanol – DAE, (●) 2-butoxi-etanol – TRA.



12. ábra. A natív β -glükózidáz inkubálási (szobahőmérséklet, 6 nap) inaktíválódásának félogaritmikus ábrázolása 10 % vizet tartalmazó, alkohol-hígítószer (DAE vagy TRA) 1:9 elegyekben, (◆) *n*-hexanol – DAE, (■) *n*-hexanol – TRA, (▲) 2-butoxi-etanol – DAE, (●) 2-butoxi-etanol – TRA.



13. ábra. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz inkubálási (szobahőmérséklet, 6 nap) inaktiválódásának félogaritmikus ábrázolása 10 % vizet tartalmazó, alkoholokban, (◆) *n*-butanol, (■) *n*-pentanol, (▲) *n*-hexanol, (●) ciklohexanol, (—) 2-butoxi-etanol.

4.4.3 AZ *O*-glükózidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének optimalálása

A korábbi tanszéki tapasztalatok azt mutatták, hogy mind a natív, mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz többé-kevésbé alkalmas olyan *O*-alkil-glükózidok előállítására reverz hidrolízissel, amelyeknek megfelelő alkoholok a reakcióelegyben hígítószerként is szolgálhatnak [KOSÁRY et al, 1998a,b,c]. Ezek az előzetes kísérletek azonban még a reverz hidrolízisre alkalmasabbnak tűnő β -glükózidáz esetében sem látszottak alkalmasnak preparatív szintézisre. Ezen munka során nyert tapasztalatok azonban számos támpontot nyújtottak az *O*-glükózidok reverz hidrolízissel történő, preparatív léptékű szintézisére irányuló kutatásomhoz.

Céлом eléréséhez először kistérelű előkísérleteket végeztem a reakció komponenseinek és körülményeinek megfelelő kialakítására. Ezt követte a legalkalmasabbnak talált eljárások optimalálása, majd a tételnövelés. A szintetikus célú kutatás szerteágazó volta, valamint a párhuzamosan végzendő inkubálási inaktiválódási és kinetikai vizsgálatok (4.4.1 és 4.4.2 fejezetek) igen nagyszámú kísérlet elvégzését tették szükségessé, ezért az előkísérletek során csak a reakcióelegyek analízisére, elsősorban glükóztartalmának meghatározására szorítkoztam. Ugyanis a

reakcióelegyek glükóztartalmának csökkenéséből aránylag pontosan lehetett következtetni az *o*-alkil-glükozidok képződésére. Ezeket a vizsgálatokat elsősorban a 3.2.2.2 fejezetben ismertetett, enzimes analízis általam módosított változatával (4.1.1 fejezet) végeztem. Később, a reakció körülmények optimalása, illetve a pontos enzimkinetikai mérések elvégzése során az enzimes analitikai (3.2.2.2 fejezet) és HPTLC módszereket (3.2.3 fejezet) párhuzamosan alkalmaztam. Csak azokat az eredményeket tartottam elfogadhatónak, amelyek három párhuzamos kísérletben a kísérleti hibán belül ($\pm 5\%$ relatív eltérés) megegyeztek.

4.4.3.1 A reakciókörülmények kiválasztásának szempontjai

A megfelelő reakcióparaméterek megállapításához optimaltam a már korábban, a Tanszéken végrehajtott legsikeresebb kapcsolási reakciókat (*n*-butanol, *n*-pentanol, *n*-hexanol és ciklohexanol, mint glükozilező ágensek és hígítószer, valamint natív és Akrix C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükozidáz) [KOSÁRY et al., 1998a,b,c]. Megállapítottam, hogy a korábban alkalmazott reakciókörülmények közül a reakció hőmérséklete (szobahőmérséklet), időtartama (6 nap), illetve az elegy víztartalma (5-15 %) valóban optimálisnak mondható. Itt jegyzem meg, hogy az α -glükozidáz esetében mindig, a β -glükozidáz esetében pedig általában a 10 % víztartalom bizonyult a legkedvezőbbnek.

Eltérést tapasztaltam azonban a reakcióelegyek korábban alkalmazott és az optimálisnak bizonyult glükózkoncentrációja között. A korábbi kísérletekben a reakcióelegyek glükóztartalma aránylag magas (100 mM) volt, ez pedig magában rejtheti a diszacharid képzés veszélyét [EL-SAYED & LÁSZLÓ, 1994]. Alacsonyabb glükózkoncentráció (10 mM) alkalmazásakor az enzimalízis alapján számított hozamok megnöttek, például 10 és 15 % víztartalmú hexanolban 6 nap után a konverzió meghaladta az 50 százalékot, míg a magasabb glükózkoncentráció esetén a hozamok korábban 20-25 % közé estek.

Az alkalmazott enzim mennyiségével kapcsolatban inkább tapasztalati megfontolásaim voltak, mert az enzim működését a tényleges enzimaktivitáson kívül a reakcióelegyek heterogén jellege is erősen befolyásolta. Ugyanis általában az enzimek, közöttük természetesen az α - és β -glükozidázok is, a szerves oldószer túlnyomó többségével heterogén rendszert képeznek nemcsak immobilizált, hanem natív formában is. Ehhez a kedvezőtlen tényezőhöz továbbiak járulnak (elsősorban a szubsztrát korlátozott oldékonysága következtében), ez okozza a reverz hidrolitikus reakcióelegyek komplex heterogenitását.

Célkitűzéseim között nemcsak hígítószerke bevezetése és az *O*-alkil-glükózidok preparatív léptékű előállítás volt, hanem egy új, eddig még ismeretlen felületaktív *O*-alkil-glükózid csoport, az *O*-alkoxi-alkil-glükózidok szintézise is. Ennek érdekében a vizsgált alkoholok körét két alkoxi-alkohollal és egy ariloxi-alkohollal bővítettem (2-metoxi-etanol, 2-butoxi-etanol, illetve 2-fenoxi-etanol).

Az irodalmi összefoglalásban (2.6.1.2 fejezet) jeleztem, hogy a reverz hidrolitikus reakciókban általában hígítószerként is a glükózilező ágens alkoholt alkalmazták. Volt ugyan néhány – nem túl sikeres próbálkozás – hígítószerke bevezetésére. A hígítószernek szánt szerves oldószerke alkalmasságát a natív és az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz azonnali inaktiválódásával teszteltem (4.1.2.1 és 4.2.4 fejezet). Ezen kísérletek során is bebizonyosodott az a közismert tény, hogy a rögzített enzimek általában kevésbé inaktiválódnak szerves oldószerkeben, mint a natív enzimek. A fenti enzimek azonnali inaktiválódási vizsgálatai során jeleztem a kipróbált szerves oldószerke legtöbbjével kapcsolatos sikertelenségeket. Hígítószerként a legkülönbözőbb típusú szerves oldószerkeket próbáltam ki – sikertelenül. Közöttük voltak egyaránt hidrofil aprótikus oldószerke (pl. dimetil-formamid), éterek (pl. dioxán), ketonok (pl. aceton), apoláros oldószerke (pl. hexán), az észterke közül az etilacetát, valamint egyéb oldószerke (pl. acetonitril). A 4.1.2.1 fejezetben ismerttettem azokat a körülményeket, amelyek a két – később sikeresnek bizonyult – észter hígítószer, a DAE és a TRA bevezetéséhez vezettek.

A hígítószerke kiválasztásának különböző szempontjai voltak. Ismert, hogy az α - és a β -glükózidáz erősebben képesek kötődni a hidrofőb, illetve a kevésbé hidrofil szubsztrátokhoz, mint az erősen hidrofilekhez [MITSUO et al., 1984] és a szerves oldószerke csökkenthetik a szubsztrát és az enzim kötőhelyén lévő aminosav oldalláncok közti hidrofőb kölcsönhatás erősségét [NILSSON, 1986]. Ez volt az oka annak, hogy elsősorban hidrofőb jellegű, legalábbis nem erősen hidrofil oldószerkeket próbáltam ki. Ebből a szempontból a dimetil-formamid kivételnek számít, lévén erősen hidrofil, aprótikus oldószer, amely erős hidrogénkötéseket képez. A dimetil-formamidot azért próbáltam ki, mert az aminoacilázzal kapcsolatban korábban a Tanszéken rendkívül kedvezőek voltak a tapasztalatok [KOSÁRY et al., 1994]. Azonban a dimetil-formamid a glükózidázok esetében teljes kudarcnak bizonyult. A hígítószerke kiválasztásánál szempont volt az elérhetőség és a költség is.

4.4.3.2 Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz katalizálta, kisléptékű reverz hidrolitikus reakciók optimalizált eredményei

A reverz hidrolitikus folyamatokkal kapcsolatban a hígítószerke bevezetésének vizsgálata során a tesztelés menete némileg eltért a szokásostól. Ugyanis először az azonnali inaktiválódási vizsgálatok során legstabilabbnak talált formát Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz tanulmányoztam részletesen. A korábban indokoltak szerint (4.4 fejezet) az inkubálási inaktiválódást és a reverz hidrolízis során bekövetkező kapcsolási reakció hozamát ugyanabban a reakcióelegyben vizsgáltam. Ezekben a reakcióelegyekben (0,5 ml) a bevitt enzimaktivitás $0,46 \mu\text{mol min}^{-1}$, a glükózkoncentráció 10 mM volt, a reakciót szobahőmérsékleten, hat napig folytattam. Az inkubálódási kinetikai vizsgálatok miatt és a kapcsolási reakciók hozamának optimalizálása céljából párhuzamos kísérleteket hajtottam végre a reakcióelegyek naponta-kétnaponta történő feldolgozására.

A nagyszámú előzetes kísérletek glükózanalízisre alapozott értékelését az enzim glükóz meghatározási módszer alapján (3.2.2.2 fejezet) végeztem, a **28.** és **29. táblázatokban** bemutatott eredményeket azonban már a HPTLC módszer (3.2.3 fejezet) alkalmazásával is igazoltam. Mind kapcsolási reakciók hozama (az *o*-alkil-glükózidokra nézve 40-60 %), mind a rögzített enzim inkubálási inaktiválódási vizsgálatai alapján úgy döntöttem, hogy a tételnövelési kísérleteket kizárólag 10 % víztartalommal rendelkező reakcióelegyekben végzem. A mindössze 10 % glükózilező alkoholt tartalmazó reakcióelegyek kedvező eredményei felbátorítottak arra, hogy olyan hidroxil-vegyületekkel (fenol, 4-nitro-fenol) is próbálkozzam, amelyek segítségével előállítható *o*-glükózidokat még soha nem állítottak elő reverz hidrolízissel. Ezek a próbálkozások sikeresek voltak.

Az irodalomban eddig még nem ismert *o*-alkoxi-, illetve ariloxi-alkil-glükózidok szintézisét illetően kevésbé voltak kedvezőek az eredmények. Annak ellenére, hogy a tesztelt alkoholok jelenlétében (2-metoxi-etanol, 2-butoxi-etanol és 2-fenoxi-etanol) rögzített enzim azonnali inaktiválódási értékei meglehetősen kedvezőtlenek voltak, néhány szintetikus reakciót végrehajtottam. A három vizsgált alkohol közül kizárólag a 2-butoxi-etanol (hozam 55-58 %) látszott alkalmasnak arra, hogy vele preparatív léptékű szintézist hajtsak végre. Nem tartom kizártnak, hogy a négytagúnál hosszabb szénláncú alkoxi-etanolok is alkalmasak reverz hidrolízisre, de ezek azonban megfizethetetlenül drágák. Ezzel szemben a vizsgált három alkohol, mint “celloszolv-származék” olcsó és a kereskedelemben (Reanal, illetve Fluka) könnyen hozzáférhető.

28. táblázat. Az *o*-glükózidok Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisének HPTLC módszerrel meghatározott maximális hozamai (%) különböző alkohol-DAE elegyekben. Víztartalom 10 %, szubsztrát glükóz koncentráció 10 mM, reakcióidő 6 nap, szobahőmérsékleten.

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	45*	43	40
<i>n</i> -pentanol	46** (48)	46	42
<i>n</i> -hexanol	57*	60	55
ciklohexanol	52*	56	51
2-butoxi-etanol	55	58	55
2-metoxi-etanol	28	20	15
2-fenoxi-etanol	25	22	15

* Azonos hozam (%) 15% víztartalomnál is

** Maximális hozam (%) 15% víztartalomnál

29. táblázat. Az *o*-glükózidok Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisének HPTLC módszerrel meghatározott maximális hozamai (%) különböző alkohol-TRA elegyekben. Víztartalom 10 %, szubsztrát glükóz koncentráció 10 mM, reakcióidő 6 nap, szobahőmérsékleten.

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	45	40	38
<i>n</i> -pentanol	46	43	40
<i>n</i> -hexanol	57	55	51
ciklohexanol	52	50	48
2-butoxi-etanol	55	51	50

Annak ellenére, hogy az eredményesnek bizonyult hígítószer, elsősorban a DAE bevezetésében nemcsak elvi megfontolások játszottak szerepet, hanem a véletlen és a szerencse is (4.1.2.1 fejezet), eredményességük némileg megindokolhatónak látszik. Mind a két hígítószer aránylag hidrofób karakterű, ugyanakkor vízben való oldódása számottevő: 143 g l⁻¹ (DAE), 72 g l⁻¹ (TRA), (a két hígítószer log P értékének meghatározását tervezem). Ez a két tényező elegendőnek látszik arra, hogy az általam alkalmazott reverz hidrolitikus reakcióelegyekben csökkentse a rendszer komplex heterogenitását. Nem találtam összefüggést az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz inkubálási inaktiválódásának sebessége, az általa katalizált reverz hidrolitikus folyamatok hozama, illetve a két alkalmazott hígítószer különböző fizikai paramétereit között.

4.4.3.3 A natív β -glükózidáz katalizálta, kisléptékű reverz hidrolitikus reakciók optimált eredményei

A natív β -glükózidáz inkubálási inaktiválódása előre nem várható eredményt hozott, mivel az alkohol-DAE 1:9 reakcióelegyekben az inaktiválódás sokkal gyorsabb ($k = \text{kb. } 7 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), a TRA jelenlétében viszont gyakorlatilag azonos mértékű volt, mint a rögzített β -glükózidáz esetében ($k = 3,93$, illetve $3,69 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) (4.4.2 fejezet). Ez elegendő indoknak látszott arra, hogy annak ellenére megkísérleljem az *o*-glükózidok natív β -glükózidáz katalizálta preparatív szintézisét TRA hígítószerben, hogy az általános tapasztalat szerint a reverz hidrolitikus reakciókra a rögzített enzimek alkalmasabbak.

A natív β -glükózidáz kipróbálását azon feltételezésem alapján is indokoltnak láttam, miszerint a DAE és a TRA csökkentik a reverz hidrolitikus reakcióelegyekben a rendszer komplex heterogenitását. A vizsgálatok eredményei (30. és 31. táblázat) alapján (hozam kb. 30-40 %) úgy döntöttem, hogy ezekben a reakciókban is megkísérlem a tételnövelést. Az *o*-alkoxi-alkil-glükózidok, illetve *o*-ariloxi-alkil-glükózidok előállításához tesztelt három alkohol közül ebben az esetben is csak a 2-butoxi-etanol látszott alkalmasnak. Ezek alapján azt sem tartom kizártnak, hogy a natív β -glükózidázt preparatív léptékű szintézisre is fel lehet használni.

30. táblázat. Az *o*- β -D-glükózidok natív β -glükózidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisének HPTLC módszerrel meghatározott maximális hozamai (%) különböző alkohol-DAE elegyekben. Víztartalom 10 %, szubsztrát glükóz koncentráció 10 mM, reakcióidő 6 nap, szobahőmérsékleten.

	0 % DAE	50 % DAE	90 % DAE
<i>n</i> -butanol	36	40	41
<i>n</i> -pentanol	33	37	36
<i>n</i> -hexanol	36	42	44
ciklohexanol	25	30	32
2-butoxi-etanol	37	41	42
2-metoxi-etanol	25	12	15
2-fenoxi-etanol	18	11	10

31. táblázat. Az α - β -D-glükózidok natív β -glükózidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisének HPTLC módszerrel meghatározott maximális hozamai (%) különböző alkohol-TRA elegyekben. Víztartalom 10 %, szubsztrát glükóz koncentráció 10 mM, reakcióidő 6 nap, szobahőmérsékleten.

	0 % TRA	50 % TRA	90 % TRA
<i>n</i> -butanol	36	38	35
<i>n</i> -pentanol	33	33	32
<i>n</i> -hexanol	36	40	39
ciklohexanol	25	30	28
2-butoxi-etanol	37	45	42

4.4.3.4 Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz katalizálta, kisléptékű reverz hidrolitikus reakciók optimált eredményei

Már az azonnali inaktiválódási kísérletekben (4.1.2.1 fejezet) bebizonyosodott, hogy a natív α -glükózidáz teljesen alkalmatlan preparatív léptékű reverz hidrolízisre. Később az is megállapítható volt, hogy az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz nem képes a vizsgált hígítószerke jelenlétében reverz hidrolízisre. Így vizsgálataim csak a különböző alkoholokban korábban már sikeresen végrehajtott reverz hidrolitikus kapcsolási reakciók optimalizálására korlátozódtak, csak ebben a rendszerben vizsgáltam az inkubálási inaktiválódást (4.2.4 fejezet) is. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz esetében az optimalizálás lényegesen kevésbé látványos eredményekkel járt (**32. táblázat**), mint a β -glükózidáznál, mivel a hozamok a korábban közltekénél csak mintegy 5-10 százalékkal voltak magasabbak, míg ez az növekedés a β -glükózidázra 80-90 százalékos volt.

32. táblázat. Az α - α -D-glükózidok Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisének HPTLC módszerrel meghatározott maximális hozamai (%) különböző alkoholokban. Víztartalom 10 %, szubsztrát glükóz koncentráció 10 mM, reakcióidő 6 nap, szobahőmérsékleten.

	Hozam (%)
<i>n</i> -butanol	22
<i>n</i> -pentanol	25
<i>n</i> -hexanol	28
Ciklohexanol	22
2-butoxi-etanol	18

4.4.4 Az *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok preparatív léptékű szintézise reverz hidrolízissel

A 4.4.3 fejezetben bemutatott, kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisek alkalmatlanok voltak a keletkezett *o*-glükozidok izolálására, mivel a reakcióelegy (0,5 ml) mindössze 9 mg glükózt tartalmazott. A preparatív izolálhatóság és az azonosíthatóság érdekében a szintézisek léptékét mintegy tízszeresére kellett növelnem. Egy reakció tételnövelésekor számos, a reakció sikere szempontjából kedvezőtlen körülmény léphet fel. Ezek közül esetemben a reakcióelegyek komplex heterogenitása következtében jelentősen megnehezült anyagtranszfer jelentette a legnagyobb problémát. A kizárólag alkoholokat, mint szerves oldószereket tartalmazó reakcióelegyekben tételnövelési kísérleteim még a legjobb eredményeket felmutató Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükozidáz esetében is kudarcot vallottak. Ez utóbbi esetében a reakcióelegyek heterogenitását némileg csökkentő DAE és TRA hígítószer alkalmazása azonban meghozta a kívánt eredményt.

Ugyanakkor a DAE vagy TRA hígítószer tartalmazó, növelt tételű reverz hidrolitikus reakcióelegyekből a képződött *o*-glükozidok, azaz pontosabban az *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok izolálása meglehetősen nehézségekkel járt. A DAE forráspontja 79-81°C (145 10³ Pa), a TRA forráspontja ugyanezen a nyomáson 110°C felett van, ezért a DAE esetében nehézkes, a TRA esetében gyakorlatilag lehetetlen volt a reakcióelegyek teljes bepárlása laboratóriumi körülmények között, még erős vákuum alkalmazása esetében is.

A kísérleteknek abban a fázisában, amikor még csak a DAE hígítószerrel foglalkoztam, a növelt léptékű reakcióelegyek feldolgozására *bepárlásos-vastagrétegkromatográfiás módszer* dolgoztam ki. Ennek keretében a rögzített enzim kiszűrése és vizes mosása után visszamaradó szűrletből a vizet, az alkoholt és a DAE hígítószeret vákuumban kidesztilláltam, majd a lepárolt maradékból a *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidokat vastagrétegkromatográfia segítségével izoláltam (3.6.1.3 fejezet) (**33. táblázat**). A lepárolt maradékban maradt DAE nyomok ezt a tisztítási fázist nem befolyásolták. A TRA esetében azonban a lepárolt maradék olyan sok hígítószeret tartalmazott, hogy a vastagrétegkromatográfiás módszer gyakorlatilag lehetlenné vált.

33. táblázat. A preparatív bepárlásos-vastagrétegekromatográfiás módszerrel izolált *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok hozamai (%) Akrilex C-100 hordozóra kötött β -glükozidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisével különböző alkohol-DAE 1:9 elegyekben. Víztartalom 10 %, szubsztrát glükóz koncentráció 0,2 M, hidroxil-vegyület koncentráció 2 M, rögzített enzim koncentráció 6 mg/ml, reakcióidő 6 nap, szobahőmérsékleten.

Helyettesítő csoport	Hozam (%)
<i>n</i> -butil [MITSUO et al., 1984]	15
<i>n</i> -pentil [REEVES & MAZZENO, 1954]	17
<i>n</i> -hexil [SCHWENDENER et al., 1981]	19
ciklohexil [REEVES & MAZZENO, 1954]	19
<i>n</i> -oktil [DE GRIP, W.J. & BOVEE-GEURTS, 1979]	18
<i>n</i> -nonil [DE GRIP, W.J. & BOVEE-GEURTS, 1979]	16
<i>n</i> -decil [DE GRIP, W.J. & BOVEE-GEURTS, 1979]	12
fenil* [DE BRUYNE et al., 1979]	13
4-nitro-fenil* [WEBER & FINK, 1980]	11

*A hidroxil-vegyület nem alkalmazható hígítószerként

Arra az esetre, amikor a növelt léptékű reakció elegyek DAE vagy TRA hígítószer tartalmaztak, egy új izolálási eljárást (*extrakciós-vastagrétegekromatográfiás módszert*) dolgoztam ki. Ennek keretében a rögzített enzim kiszűrése és vizes mosása után visszamaradó szűrletet vízzel háromszorosára hígítottam, majd a szűrletből az alkoholt, illetve a hígítószer extrakcióval (kloroform) távolítottam el. A vizes fázist vákuumban lepároltam, majd a lepárolt maradékot vastagrétegekromatográfia segítségével tisztítottam. Ez az extrakciós feldolgozási módszer kétségtelenül járt némi anyagveszteséggel, de a TRA alkalmazása környezeti szempontból előnyösebbnek látszik, így mind a két hígítószer, illetve izolálási eljárást alkalmasnak tartom az *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok preparatív léptékű szintézisére (**34. táblázat**).

34. táblázat. A preparatív extrakciós-vastagrétegekromatográfiás módszerrel izolált *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok hozamai (%) Akrilex C-100 hordozóra kötött β -glükozidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisével különböző alkohol-hígítószer elegyekben. Víztartalom 10 %, szubsztrát glükóz koncentráció 0,28 M, hidroxil-vegyület koncentráció 0,71 M, rögzített enzim koncentráció 4,3 mg/ml, reakcióidő 6 nap, szobahőmérsékleten.

Helyettesítő csoport	Alkohol-DAE (1:1)	Alkohol-DAE (1:9)	Alkohol-TRA (1:9)
<i>n</i> -hexil	23	25	19
2-butoxi-etil	20	23	15
fenil*	19	20	15
4-nitro-fenil*	15	16	10

*A hidroxil-vegyület nem alkalmazható hígítószerként

A bepárlásos és az extrakciós módszerek esetében némileg eltérő összetételű reakcióelegyeket használtam, ennek azonban nem elvi, hanem kizárólag praktikus okai voltak. A preparatív léptékű szintézisek során az alkoholok és fenolok kiválasztásánál arra törekedtem, hogy a reverz hidrolízis során keletkező *o*-glükozid az irodalomban ismert (**33. táblázat**) legyen (de szintézisét nem reverz hidrolízissel végezték), ez ugyanis megkönnyítette szerkezetük azonosítását. Ettől csak az irodalomban még nem közölt *o*-2-butoxi-etil- β -D-glükopiranozid esetében tértem el. A szintetizált *o*-glükozidok szerkezetét és optikai tisztaságát az $^1\text{H-NMR}$ spektrumok alapján igazoltam. Az *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok $^1\text{H-NMR}$ spektrumában ugyanis a β -glükozidos kötéssel azonos szénatomhoz kapcsolódó, α -térállású hidrogén jellegzetes kémiai eltolódásnál (δ) jelentkeznek: 4,50-4,56 ppm (1 H, d, 1-H) [DE BELDER et al., 1966].

5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

PhD értekezésem új tudományos eredményeit az alábbiakban foglalom össze.

1., Hígítószerke bevezetése az *o*-alkil-glükozidok reverz hidrolitikus szintézisébe

A natív (azaz a kereskedelmi forgalomban kapható, liofilezett por formájú) és az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükozidáz enzimkinetikai állandói, valamint különböző víztartalmú alkoholokban mért stabilitási viszonyai (azonnali és inkubálási inaktiválódási kinetikája) alapján meghatároztam azokat a reakciókörülményeket, amelyekben a különböző szerves oldószereket hígítószerként teszteltem. A vizsgált hígítószerke közül az 1,2-diacetoxi-etán és a triacetin bizonyult alkalmasnak az *o*-alkil-glükozidok új, preparatív léptékű az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükozidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisére a megfelelő alkoholokkal képzett 9:1 arányú elegyben. Megállapítottam, hogy a triacetin hígítószerben még a natív β -glükozidáz is megfelelően stabil a szintéziséhez.

2., Az *o*-alkil-glükozidok preparatív léptékű előállítása reverz hidrolízissel

A hígítószerkeket is tartalmazó reakcióelegyekből az *o*-alkil-glükozidok preparatív kinyerésére a hígítószerkektől függően két új módszert (a bepárlásos-vastagrétegekromatográfiás, illetve az extrakciós-vastagrétegekromatográfiás módszert) dolgoztam ki. A hígítószerke segítségével lehetségessé vált olyan *o*-helyettesített glükozidok reverz hidrolitikus előállítása is, amelyeknek megfelelő hidroxil-vegyület nem használható hígítószerként, például fenollal *o*-fenil- (13 %) és 4-nitro-fenollal *o*-4-nitro-fenil- β -D-glükopiranozid (11 %).

3., A felületi réteg, mint hordozó alkalmazása enzimek rögzítésére

Elsőként rögzítettem enzimeket a felületi réteghez (S-layer). Erre a műveletre új, egyszerűsített koimmobilizálási módszert dolgoztam ki, amely során a felületi réteg és rögzíteni kívánt enzim keverékét kombinált keresztkötésekkel kapcsoltam össze glutáraldehid segítségével. Ezzel a módszerrel nemcsak a β -glükozidázt (12,5 %), hanem más rögzített enzimeket is előállítottam, közülük néhányat 10 % körüli hozammal.

4., Rögzített β -glükózidáz preparátumok alkalmazásának vizsgálata borok aromapotenciáljának módosítására

A felületi réteghez rögzített β -glükózidáz élelmiszeripari alkalmazhatóságát a borok aromaprofiljának módosításával teszteltem. A fehérje alapú hordozó nem kívánatos módon növelte a borok fehérjetartalmát, ezért új rögzített β -glükózidáz készítményt állítottam elő, a felületi réteghez rögzített, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidázt. Ennek az újabb készítménynek a viselkedését az erre a célra még nem tesztelt Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz viselkedésével hasonlítottam össze és megállapítottam, hogy mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített, mind a felületi rétegre rögzített, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidáz képes arra, hogy módosítsa a muskotályos borok aromaprofilját.

5., A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz és a sárgarépa készítmények pektin-metil-észteráz tartalma inaktiválódásának kinetikai vizsgálata

Megállapítottam, hogy mind a modellként alkalmazott natív (azaz izolált és tisztított) sárgarépa pektin-metil-észteráz, mind a különböző sárgarépa készítmények (szeletelt sárgarépa, sárgarépalé) PME tartalmának inaktiválódási kinetikája az élelmiszeripari tartósításra használt hőkezelés és a nagynyomású kezelés hatására egyaránt elsőrendű.

6., A növényi alapanyagok élelmiszeripari felhasználása során bekövetkező állapotváltozásainak jellemzése a β -glükózidáz és a pektin-metil-észteráz aktivitásváltozásával

Megállapítottam, hogy a sárgarépa, a brokkoli és a karfiol előfőzöttségére és fagyasztott tárolásának jellemzésére a β -glükózidáz és a pektin-metil-észteráz inaktiválódási viselkedése az általánosan elterjedten használt peroxidázénál jellemzőbb.

ÖSSZEFOGLALÁS

Doktoranduszi kutatómunkám célja az α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazhatóságának modellezése volt egyes folyamatokban (pl. a glükózidázokra a borok aromaprofiljának módosítása, a pektin-metil-észterázra pedig a zöldségek közül elsősorban a sárgarépa készítmények minőségjavítása). Ahhoz, hogy ilyen jellegű modellezési kísérleteket végezhessek, a vizsgálandó enzimek viselkedését a modellrendszerek tervezett körülményei között tesztelnem kellett. Ezen kívül az élelmiszeriparban detergensként használt nem ionos, nem toxikus és biológiailag lebontható felületaktív *o*-alkil-glükózidok glükózidázok katalizálta, olyan szintézisével is foglalkoztam, amely lehetővé teszi korábban eddig ilyen módon nem szintetizálható *o*-glükózidok előállítását akár preparatív léptékben is.

Célkitűzéseim összetettségének megfelelően kutatómunkám is sokrétű volt. Az élelmiszeripari alkalmazások modellezéséhez először a natív α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz, később különböző rögzített glükózidáz készítmények enzimkinetikai tulajdonságait és stabilitási viszonyait (azonnali és inkubálási inaktiválását) vizsgáltam olyan körülmények között, amelyek a későbbi felhasználásnak megfeleltek. Ezen vizsgálatok során megállapítottam, hogy az α -glükózidáz még Akrilex C-100 hordozóra rögzített formában sem alkalmas az *o*-alkil-glükózidok a preparatív léptékű reverz hidrolitikus szintézisére.

Kétféle rögzített β -glükózidáz készítményt állítottam elő. Ezek közül az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz igen alkalmasnak bizonyult az *o*-alkil-glükózidok általam kidolgozott új, preparatív léptékű reverz hidrolitikus szintézisére. Ennek során a hígítószerként leginkább alkalmasnak talált 1,2-diacetoxi-etán és triacetin segítségével lehetségessé vált olyan *o*-helyettesített glükózidok reverz hidrolitikus előállítása is, amelyeknek megfelelő hidroxil-vegyület nem használható hígítószerként. Mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz, mind az új, felületi rétegre rögzített, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidáz készítmény pedig megfelelőnek bizonyult a borok aromaprofiljánál módosítására.

Megállapítottam, hogy mind a modellként alkalmazott natív sárgarépa pektin-metil-észteráz, mind a különböző sárgarépa készítmények (az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverék, szeletelt sárgarépa) inaktiválódási kinetikája a hőkezelésre és a nagynyomású kezelésre egyaránt elsőrendű. Úgy találtam, hogy a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok saját β -glükózidáz és pektin-metil-észteráz aktivitásának változásai egyes élelmiszeripari folyamatok hatásaira jellemezőek lehetnek.

SUMMARY

My aim was to develop different model systems for the application of α - and β -glucosidases and pectinmethylesterase in food industry (e.g. glucosidases for flavour enrichment of wines and pectinmethylesterase for the quality amelioration of vegetables, especially carrot preparations). In order to design the model systems I examined the behaviour of the enzymes within the parameters of these planned systems. I also studied a special synthesis of *o*-alkyl-glucosides, even in preparative scale, that was not possible in this way earlier. These *o*-alkyl-glucosides are non-ionic and non-toxic surfactants with antimicrobial activity and some of them are used as detergent in food industry.

Both my research goals and my actual research were complex in character. For the modeling of food-industrial applications the kinetic properties and stability relations (immediate deactivation and deactivation kinetics) of native α - and β -glucosidases and pectinmethylesterase, then immobilized α - and β -glucosidase preparations were studied at conditions practically equal to the applications planned. In the course of these experiments I found that neither the native form of α -glucosidase nor the immobilized form on Acrylex C-100 can be used for the reverse hydrolytic synthesis of *o*-glucosides in preparative scale.

I made two types of immobilized β -glucosidase preparations. One of the main goals of my thesis was to establish whether β -glucosidase immobilized on Acrylex C-100 had significant *o*-glucosylation activity in a preparative-scale synthesis of *o*-glucosides by reverse hydrolytic reactions using my novel reaction system. In this reaction system alcohols as solvents were replaced with 1,2-diacetoxyethane or triacetin as diluting agents. I found that 1,2-diacetoxyethane and triacetin can be useful not only for alcohols but also for other glucosyl donor compounds unsuitable for the role of solvent in the synthesis of *o*- β -D-glucosides by reverse hydrolysis. Moreover, I found that not only β -glucosidase on Acrylex C-100 support can be used for flavour enrichment of wines but the second immobilized β -glucosidase preparation as well. In the latter preparation the immobilization of β -glucosidase on the surface layer by co-cross-linking with glutaraldehyde was combined with entrapping in calcium alginate gel.

Another goal of my thesis was to find deactivation kinetics of first order for both native carrot pectinmethylesterase as a model system and different carrot preparations (a mixture for modelling carrot juice made in industrial conditions and carrot slices) in the case of both heat inactivation and high pressure treatment. I managed to establish that the change in the activity of endogenous β -glucosidase and pectinmethylesterase in different raw materials of plant origin can be characteristic for the effect of some processes in food industry.

I. MELLÉKLET (IRODALOMJEGYZÉK)

- ADELHORST, K., BJÖRKLING, F., GODFREYSEN, S. E. & KIRK, O. 1990. Enzyme catalysed preparation of 6-*O*-acylglucopyranoside. *Synthesis*. 112-115
- ADISSON, L., BOLTE, J., DEMUYNCK, C. & MANI J.-C. 1988. Enzymatic synthesis of aspartyl-containing dipeptides. *Tetrahedron*. 44, 2185-2191
- ADLERCREUTZ, P. 1993. Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochem Biophys Acta*. 1163, 144-148
- ALONSO, J., HOWELL, N. & CANET, W. 1997. Purification and characterisation of two pectinmethylesterase from Persimmon (*Diospyros kaki*). *J. Sci. Food Agric.* 75, 352-358
- ANDERSSON, M. & ADLERCREUTZ, P. 2001. A kinetic study of almond- β -glucosidase catalysed synthesis of hexylglycosides in low aqueous media Influence of glycosyl donor and water activity. *J. Mol. Cat. B: Enz.* 14, 69-76
- ANINDYAWATI, T., ANN, Y.-G., ITO, K., IIZUKA, M. & MINAMURA, N. 1998. Two kinds of novel α -glucosidases from *Aspergillus awamori* KT-11: Their purifications, properties and specificities. *J. Ferm. Bioeng.* 85(5), 465-469
- ASANO, N., TANAKA, K. & MATUSI, K. 1991. Enzymatic synthesis of p-nitrophenyl- α -glucobiosides by use of native and immobilized rice α -glucosidase. *Carbohydr. Res.* 217, 255-261
- AUNSTRUP, K. 1979. Production, isolation and economics of extracellular enzymes. 27-69. In: Wingard, L.B., Katchalski-Katsir, E., Goldstein, L. (eds.) Applied biochemistry and bioengineering. Vol2. Academic Press, New York
- BALOGH, T. & KOSÁRY, J. 2004. A preparativ-scale synthesis of *O*-alkyl- β -D-glucosides by enzymatic reverse hydrolysis. *Acta Alim.* (közlésre beküldve).
- BALOGH, T., KOSÁRY, J. & BOROSS, L. 2004a. Novel reaction system for the synthesis of *O*-glucosides by enzymatic reverse hydrolysis. *Tetrahedron*. 60, 679-682
- BALOGH, T., NGUYEN, B.L., VAN LOEY, A.M., FACHIN, D., SMOOTH, C. & HENDRICKX, M.E. 2004b. Thermal and high-pressure inactivation kinetics of carrot pectinmethylesterase (PME): from model system to real foods. *IFSET* (közlésre elfogadva)
- BALOGH, T., TÓTH, Á. & KOSÁRY, J. 2004c. Immobilized β -glucosidase preparations for the treatment of wines. *Acta Alim.* (közlésre beküldve)
- BALOGH, T., VITÉZ, V. & KOSÁRY, J. 2004d. Új enzimek tesztelése az előfőzés jellemzésére. VI. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia, Szeged, 6 oldal, CD-ROM
- BARNAVON, L., DOCO, T., TERRIER, N., AGEORGES, A., ROMIEU, C. & PELLERIN, P. 2001. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry*. 58, 693-701
- BARNBY, F.M., MORPETH, F.F. & PYLE, D.L. 1990. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marximus*. I. resolution, purification and partial characterisation of the enzyme. *Enzyme Microbiology and Technol.* 12, 891-897
- BAR-PELED, M., LEWINSHON, E., FLUHR, R. & GRESSEL, J. 1991. UDP-rhamnose: Flavanone-7-*O*-glucoside-2-*O*-rhamnosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 20953-20959
- BASAK, S. & RAMASWAMY, H.S. 1996. Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase, *Food Res. Int.* 29/7, 601-607
- BE MILLER, J. 1986. An introduction to pectin: structure and properties. 3-11 In Fishman, M.L. and Jen, J.J. (ed) Chemistry and functions of pectin. Am. Chem. Soc., Washington DC.
- BEUTLER, H.O, KIRK, J., MICHAL, G. & RUMMEL, M. 1974. Enzymes as aids in pharmaceutical analysis. *Chem. Labor. Betr.* 27, 314-318
- BHAT, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Adv.* 18, 355-383
- BINTSIS, T., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. & ROBINSON, R.K. 2000. Existing and potential application of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *J. Sci. Food Agric.* 80, 637-645
- BIRÓ, G. 2001. Élelmiszer-biztonság. Agroinform, Budapest. 2001. 396 old.
- BLANCO, P., SIEIRO, C., DÍAZ, A., REBOREDO, N.M. & VILLA, T.G. 1997. Grape juice biodegradation by polygalacturonases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Biodet. & Biodeg.* 40, 115-118
- BLOM, H. 1983. Partial characterisation of thermostable antocyanin- β -glycosidase from *Aspergillus niger*. *Food Chem.* 12, 197-204
- BOCHOKOV, A.F. & ZAIKOV, G.E. 1979. Chemistry of the glycosidic bond. Formation and cleavage. Pergamon, Oxford

- BORDENAVE, M., BRETON, C., GOLDBERG, R., HUET, J.-C., PEREZ, S. & PERNOLLET, J.-C. 1996. Pectinmethylesterase isoforms from vigna radiata hypocotyl cell walls: Kinetic properties and molecular cloning of a cDNA encoding the most alkaline isoform. *Plant Mol. Biol.* 31, 1039-1049
- BORNSCHEUER, U.T. & KAZLAUSKAS R.J. 1999. Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations. John Wiley & Sons Inc., New York
- BOURQUELOT, E. & BRIDEL, M.J. 1912. Travaux originaux sur une réaction synthétisante de l'émulsine. *J. Pharm. Chim.* 7, 569-573
- BOWERS, L.D. & CARR P.W. 1980. Immobilized enzymes in analytical chemistry. In: Fiechter A. (Ed) Advances in biochemical engineering, vol 5, Springer, Berlin Heidelberg New York, 89-129
- BRAVDO, B. A. 2001. Effect of cultural practises and environmental factors on fruit and wine quality, Review paper, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 66, No. 1, 13-20
- BROUN, G., THOMAS, D., GELLF, G., DOMURADO, D, BERJONNEAU, A. M. & GUILLON C. 1973. New methods for binding enzyme molecules into a water-insoluble matrix: properties after insolubilization. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 359-375
- BRUCKNER, GY. 1974. Szerves kémia I-2. (Aminosavak, peptidek, fehérjék, szénhidrátok). Tankönyvkiadó, Budapest. 1150-1151
- BURGER, J.F.W., BRANDT, E.V. & FERREIRA, D. 1987. Iridoid and phenolic glycosides from *Harpagophytum Procumbens*. *Phytochem.* 26, 1453-1457
- BUSTO, M.D, ORTEGA, N. & PEREZ-MATEOS, 1994. Studies on microbial β -D-glucosidase immobilized in alginate gel beads. *Process biochemistry.* 30/5, 421-426
- BUTZ, P., FERNÁNDEZ GARCIA, A., LINDAUER, R., DIETRICH, S. BOGNÁR, A. & TAUSCHER, B. 2001. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *J. Food. Eng.* 56, 233-236
- CABAROGLU, T., SELLI, S., CANBAS, A., LEPOUTRE, J.P. & GÜNATA, Z. 2003. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme and Microbial Technology.* 33, 581-587
- CALDINI, C., BONOMI, F., PFIFFERI, P.G., LANZARINI, G. & GALANTE, Y.M. 2002. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *E. M. Tech.* 16, 286-291
- CALL H.P., WALTER, J., & EMEIS, C.C. 1985. Maceration activity of an endopoligalacturonase from *Candida macedoniensis*. *J. of Food Biochem.* 9, 325-348
- CANTARELLA, M., CANTARELLA, L. & ALFANI, P. 1991. Hydrolytic reactions in two-phase systems. Effect of water-immiscible organic solvents on stability and activity of acid phosphatase, β -glucosidase, and β -furanosidase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 13, 547-553
- CARREA, G., OTTOLINA, G. & RIVA, S. 1995. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.* 13, 63-70
- CHAIKEN, I.M., ANDO, S. & FASSINA, G. 1992 Enzymatic synthesis processing and the formation of biologically active peptides and proteins. *Adv. Biosci.*, 65, 141-150
- CHARNAY, D., NARI, J. & NOAT, G. 1992. Regulation of plant cell-wall pectin methylesterase by polyamines-interactions with the effects of metal ions. *Eur. J. Biochem.* 205, 711-714
- CHEN, C.S. & SIH, C.J. 1989. General aspect and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 695-707
- CHIBA, S. 1988. α -Glucosidases, In The Amylase Research Society of Japan (ed.), Handbook of amylases and related enzymes, Pergamon Press, Oxford. 104-116
- CHIBATA, I., TOSA, T. & SATO, T. 1986. Immobilized cells and enzymes. *J. Mol. Catalysis.* 37, 1-24
- CORDONNIER, R., BAYONOVE, C. & BAUMES, R. 1986. Données récentes sur les précurseurs d'arôme du raisin, perspectives de leur exploitation en vinification. *Rev. Fr. Oenol.* 102, 29-41.
- CRAMER, B. & IKAN, R. 1986. Sweet Glucosides from the stevia plant. *Chemistry in Britain.* 22, 915-916
- CRELIER, S., ROBERT, M.-C., CLAUDE, J. & JUILLERAT, M.A. 2001. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat- and pressure-induced inactivation. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5566-5575.
- CROUT, H.G., MACMANUS, D.A., RICCA, J.M., SINGH, S., CHRITCHLEY, P. & GIBSON, W.T. 1992 Biotransformation in the peptide and carbohydrate fields. *Pure Appl. Chem.* 64, 1079-1084
- CRUEGER, W. & CRUEGER, A. 1987. Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. 175-203. R. Oldenburg Verlag, München, 372 pp
- DE ASSIS, S.A., FERNANDES, P., FERREIRA, B.S., CABRAL, J.M. & OLIVIERA, F. 2004. Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). *J. Chem. Tech. & Biotech.* 79 (3) 277-280

- DE ASSIS, S.A., LIMA, D.C. & OLIVIERA, F. 2001. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry*. 74, 133-137
- DE ASSIS, S.A., TREVISAN, H.C., MASCARENHAS, O.M. & OLIVIERA, F. 2003. Immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). *Biotech. Lett.* 25 (11), 869-872
- DE BELDER, A.N.; BOURNE, E.J. & WEIGEL, W. 1966. Studies on *tert*-butyl derivatives of D-glucose. *Carbohydr. Res.* 3, 1-6.
- DE BRUYNE, C.K., AERTS, G.M., DE GUSSEM, R.L.V. 1979. Hydrolysis of aryl beta-D-glucopyranosides and beta-D-xylopyranosides by an induced β -D-glucosidase from *Stachybotrys atra* Eur. *J. Biochem* 101, 257-267
- DE GRIP, W.J. & BOVEE-GEURTS, P.H.M 1979. Synthesis and properties of alkylglucosides with mild detergent action: improved synthesis and purification of β -octyl-, -nonyl and -decyl-glucose. Synthesis of β -1-undecyl-glucose and β -1-dodecyl-maltose. *Chem. Phys. Lipids*. 23, 321-335
- DEL-VAL, M.I. & OTERO, C. 2003. Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. *Enz. Microb. Tech.* 33, 118-126
- DENÈS, J.-M., BARON, A. & DRILLEAU, J.-F. 2000. Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (cv Golden Delicious). *J Sci Food Agric.* 80, 1503-1509
- DESROSIER, N.W. 1976. Technology of food preservation. 4th ed. Westport, Conn.: Avi Publishing Co. 110p.
- DIMITRIADIS, E. & WILLIAMS, P.J., 1984. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 66-71
- EAGREMAN, B.A. & ROUSE, A.H. 1976. Heat inactivation temperature-time relationship for pectinesterase inactivation in citrus juices. *J. Food Sci.* 41, 1396-1397
- EL-SAYED, H. & LÁSZLÓ, E. 1994. Condensation of glucose by reversed hydrolysis reaction of glucoamylase III. Effect of organic solvents and immobilization forms. *Acta Alimentaria*. 23, 359-375
- ENZYMES STRUCTURES DATABASE: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes> (2004.12)
- FARKAS, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 189-204
- FEDERICI F. 1985. Production, purification and partial characterisation of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 51, 139-150
- FERSHT, A. 1984. Enzyme structure and mechanism. Freeman, Oxford
- FLOWERS, H.M. 1987. Chemical synthesis of oligosaccharides. *Meth. Enzymol.* 138, 359-404
- FRANCIS, M.J.O. & ALLCOCK., C. 1969. Geraniol β -D-glucoside; occurrence and synthesis in rose flowers. *Phytochem.* 8, 1339-1347
- FREER, S.N. 1993. Kinetic characterisation of β -glucosidase from a yeast, *Candida wickerhamii*, *J. Biol. Chem.* 268 (13), 9337-9342
- GALLIFUOCO, A., ALFANI, F., CANTARELLA, M., SPANGA, G., & PFIFFERI, P.G. 1999. Immobilized β -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. *Proc. Biochem.* 35, 179-185
- GALLIFUOCO, A., D'ERCOLE, L., ALFANI, F., CANTARELLA, M., SPANGA, G., PFIFFERI, P.G. 1998. On the use of chitosan-immobilized β -glucosidase in wine making: kinetics and enzyme inhibition. *Process Biochemistry*, 33, 163-168
- GARCIA, A., CARCEL, C., DULAU, L., SAMSON, A., AGUERA, E., AGOSIN, E. & GÜNATA, Z. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a muscat wine. *J. Food Sci.* 67, 1138-1143
- GASZTONYI, K. & LÁSZTITY, R. 1992. Élelmiszer-kémia I. Mezőgazda Kiadó. 788 o.
- GHOSE, U. & GANGOPADHYAY, H. 2002. Enzymatic clarification of Beal juice by calcium alginate gel immobilized PME of *Aspergillus oryzae*. *Ind. J. Chem. Techn.* 9(5), 471-480
- GIOVANE, A., SERVILLO, L., BALESTRIERI, C., RAIOLA, A., D'AVINO, R., TAMBURRINI, M., CIARDIELLO, M.A., CAMARDELLA, L. 2003. Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* (article in press)
- GLOVER, H. & BRANDY, C. 1994. Purification of three pectin esterases from ripe peach fruit. *Phytochemistry*. 37 (4), 949-955
- GODFREY, T. & REICHEL, J. 1983. Industrial enzymology: The application of enzymes in industry. Macmillan Ltd., London, 600 pp
- GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P., JANBON, G., ARNAUD, A. & GLAZY, P., 1996. A very efficient β -glucosidase-catalyst for the hydrolysis of flavor precursors process of wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2336-2340
- GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P., PIEN, S., ARNAUD, A. & GLAZY, P. 1997. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *J. Biotech.* 55. 151-156
- GUPTA, M. N., 1992. Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem.* 203, 25-32

- GÜNATA, Y.Z., BAYONOVE, C., BAUMES, R. & CORDONNIER, R.E., 1985. The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* 331, 83-90
- GÜNATA, Z., BLONDEEL, C., VALLIER, M.J., LEPOUTRE, J.P., SAPI, C.J. & WATANABE, N. 1988. An endoglucosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandria, hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2748-2753
- HALVORSON, H. 1966. α -glucosidase from yeast. *Meth. Enzymol.* 8, 559-562
- HARTMEIER, W. 1988. Immobilized biocatalysts. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokio, 33-39
- HAYASHI, R. (Ed.) 2002. Trends in high pressure bioscience and biotechnology. Elsevier
- HEICHAL-SEGAL, O., RAPPORT, S. & BRAUN, S. 1995. Immobilization in alginate-silicate sol-gel matrix protects β -glucosidase against thermal and chemical denaturation. *Biotechnology.* 13, 798-800
- HELFERICH, B., & KLEINSCHMIDT, T. 1965. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 340, 31
- HENDRICKX, M.E., LUDIHKUYZE, L.R., VAN DEN BROECK, I. & WEEMAES, C.A. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 197-203
- HERNÁNDEZ, L.F., ESPINOSA, J.C., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M. & BRIONES, A. 2002. β -glucosidase activity in a *Sacharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171-176
- HESTRIN, S. & LINDEGREN, C.C. 1952. Carbohydrases in *Sacharomyces* haploid stocks of defined genotype. II. Gene-controlled induction of glucosidases by alpha-glucosides. *Arch. Biochem. Biophys.* 38, 317-334
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis.* 6, 103-112
- HOMPAGE OF THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. A visual Survey of Homodimeric Protein-Protein Interfaces. http://www.scripps.edu/pub/goodsell/interface/interface_images/1cbg.html (2004. 07.)
- HOROWITZ, M. & ZIMRAN, A. 1994. Mutations causing gaucher disease. *Hum. Mutat.* 3, 1-11
- HOSTETTLER, F., BOREL, E. & DEUDEL, H., 1951. Reduction of 3,5 dinitrosalicilic acid by sugars. *Helv. Chim. Acta*, 34: 2132-2139
- HOWARD, S. & WITHERS, S.G. 1988. *Biochemistry.* 37, 3858-3864
- HSIEH, M.-C. & GRAHAM, T.L. 1997. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry.* 58, 995-1005
- HUGHES, F.A. & LEW, B.W. 1970. Physical and functional properties of some higher alkyl polyglucosides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47, 162-167.
- JAKUBKE, H.-D. 1991. Enzymochemische Peptidsynthese (Teil 1). *Kontakte* (Darmstadt) 3, 60-72
- JENADET, P., BESSISI, R., SBAGHI, M., MEUNTER, P. 1994. Occurrence of resveratrol β -D-glucosidase in wine: Preliminary studies. *Vitis.* 33, 183-184
- JENKINS, D. 1980. Institute of food science and technology Proc. 13/1, 51-56
- JENKINS, J., MAYANS, O., SMITH, D., WORBOYS, K. & PICKERSGILL, R.W. 2001. Three-dimensional structure of *Erwinia chrysantemi* pectin methyl-esterase reveals a novel esterase active site. *J. Mol. Biol.* 305, 951-960
- JOHANSSON, K., EL AHMAD, M., FRIEMANN, R., JÖRNVALL, H., MARKOVICI, O. & EKLUND, H. 2002. Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett.* 514, 243-249.
- JONES, J.D., HACKING A.J. & CHEETAM P.S.J., 1992. Biological method for protection of 6-position of sucrose and its use in synthesis of disaccharide high-intensity sweetener. *Biotechnol. Bioeng.* 39 (2), 203-210
- KANNAN, T., LOGANATHAN, D., BHATIA, Y., MISHRA, S. & BISARIA, V. et al., 2004. Transglycosylation catalyzed by almond β -glucosidase II using glycosylasparagine mimetics as novel acceptors. *Biocat. Biotransf.* 22, 1-7
- KASHYAP, D.R., VOHRA, P.K., CHOPRA, S. & TEWARI, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology.* 77, 215-227
- KELETI, T., 1985. Enzimkinetika. Tankönyv Kiadó, Budapest, 30-32
- KENGEN, S. W. M., & STAMS, A. J. M. 1994. An extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*; a comparison with other glycosidases. *Biocatalysis.* 11, 79-88
- KERTÉSZ, Z.I. 1955. Pectic enzymes. In S.P. Colowick & N.O. Kaplan, New York, Academic Press. *Meth. Enzymol.* 1, 158-163
- KERTÉSZ, Z.I. 1957. Preparation and determination of pectic substances. *Meth. Enzymol.* 3, 28-30
- KHAN, N.A., KHALIL, J.K. & KHAN, I. 1975. Changes in the carotene content of carrots during maturity, processing and storage under different temperature conditions. *Pakistan J. Sci. Res.* 27, 112-114
- KIM, H. & GERBER, L.E. 1988. Influence of processing on quality of carrot juice. *J. Food Sci. Technol.* 20 (5), 683-690

- KIMURA, K., IDA, M., YOSHIDA, Y., OHKI, K., FUKUMOTO, T. & SAKUI, N. 1994. Comparison of keeping quality between pressure-processed jam and heat-processed jam: changes in flavour components, hue and nutrients during storage. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1386-1391
- KISHIMOTO, N., SHIRAIISHI, T., INAGAKI, K., SUGIO, T., TANAKA, H. & TANO, T. 1999. Purification and properties of an acid α -glucosidase from *Acidobacterium capsulatum*. *J. Appl. Glycoscience.* 46(2), 121-127
- KIZAWA, H., SHINOYAMA, H. & YASUI, T. 1991. Synthesis of new xyloyloligosaccharides by transglycosylation with *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* 55, 671-678
- KLAUS, R., FISCHER, W. & HAUCK, H.E. 1989. Use of a new adsorbent in the separation and detection of glucose and fructose by HPTLC. *Chromatographia.* 28, 364-366
- KLAVONS, J.A. & BENETT, R.D. 1986. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectin. *J. Agric. Food Chem.* 34, 597-599
- KLIBANOV, A. M. 1979. Enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.* 93, 1-25
- KLIBANOV, A. M. 1983. Immobilized enzymes and cells as practical biocatalysts. *SCIENCE.* 219, 722-727
- KOBAYASHI, S., ADACHI, S., NAKANISHI, K. & MATSUNO, R. 2000. Synthesis of alkyl glycosides through β -glucosidase-catalyzed condensation in an aqueous-organic biphasic system and estimation of the equilibrium constants for their formation. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 11, 13-21
- KOBAYASHI, S., KAASHIWA, K., KAWASAKI, T. & SHODA, S. 1991. Novel Synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulase as catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 3079-3084
- KONNO, H., YAMASAKI, Y., KATOH, K. 1996. A β -glucosidase associated with cell walls from cell suspension cultures of carrot. *Phytochemistry.* 43, 1157-1161
- KOSÁRY J., BALOGH T., KISS N., KORBÁSZ M. 2004a. A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 3. A mandula (*Prunus amygdalus*) vizsgálata biokémiai módszerekkel. *Olaj, szappan, kozmetika* 53, 11-13
- KOSÁRY, J., KORBÁSZ, M., KISS, N., BALOGH, T. 2004b. Almond lipoxigenases Proceedings of the 16th International Plant Lipid Symposium, 8 oldal, CD-ROM
- KOSÁRY, J., SISAK, C., SZAJÁNI, B., BOROSS, L. 1994. Acylation of amino acids by native and immobilized aminoacylase in non-conventional media. *Biocatalysis.* 11, 329-337
- KOSÁRY, J., STEFANOVITS-BÁNYAI, É. & BOROSS, L. 1998a. Synthesis of detergent *o*-glucosides by reverse hydrolysis in alcohol-water biphasic system using α - and β -glucosidases. *Pharmazie.* 53, 611-614.
- KOSÁRY, J., STEFANOVITS-BÁNYAI, É. & BOROSS, L. 1998b. Reverse hydrolytic process for *o*-alkylation of glucose catalysed by immobilized α - and β -glucosidases. *J. Biotechnol.* 66, 83-86.
- KOSÁRY, J., STEFANOVITS-BÁNYAI, É. & BOROSS, L. 1998c. Comparison of synthesis for detergent glucosides in organic solvent-water mixtures using native glucosidases. *A. Alim.* 27, 265-275.
- KÖRNER, B., ZIMMERMAN, G. & BERK, Z. 1980. Orange pectinesterase: purification, properties and effects on cloud stability. *J. Food. Sci.* 45, 1203-1206
- KRAVTCHEKOV, T.P., VORAGEN, A.G.J & PILNIK, W. 1992. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carboh. Polym.* 18, 17
- LADO, B.H. & YOUSEF, A.E. 2002. Alternative food preservation technologies: efficacy and mechanism. *Microbes and Infection.* 4, 433-440
- LARNER, J. 1960. Other glucosidases. In: Boyer, P.D.; Lardy, H., Myrbäck K. (Szerk.) *The Enzymes.* (2. kiadás) 4 Vol. Academic Press, New York, 369-378
- LAROUTE, V. & WILLEMOT, R-M. 1992. Glucoside synthesis by glucoamylase or β -glucosidase in organic solvents, *Biotech. Lett.* 14, 169-174
- LÁSZLÓ, A. 1993. Enzymopathiák. Medicina könyvkiadó Rt.
- LÁSZTITY, R.. 1981. Az élelmiszer-biokémia alapjai. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 52, 57, 229-235 old.
- LEE, T.H.J., AHN, C. & DEWEY, D.Y.R. 1983. Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology,* 5, 41-45
- LEGIN, E., COPINET, A. & DUCHRION, F. 1998. Production of thermostable amylolytic enzymes by *Thermococcus hydrothermalis*. *Biotech. Lett.* 20, 363-367
- LIM, J., YAMASAKI, Y., SUZUKI, Y. & OZAWA, J. 1984. Multiple forms of endopolygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. *Agr. Biol. And Chem.* 44, 473-480
- LIMBERG G, KÖRNER, R., BUCHHOLT, H.C., CHRISTENSEN, M.I.E., ROEPSTORFF, P. & MIKKELSEN, J.D. 2000. Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II form *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.* 327, 321-332
- LIN, J.T., RIEDEL, S., KINNE, R. 1979. The use of octyl- β -D-glucoside as detergent for hog kidney brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 557, 179-187

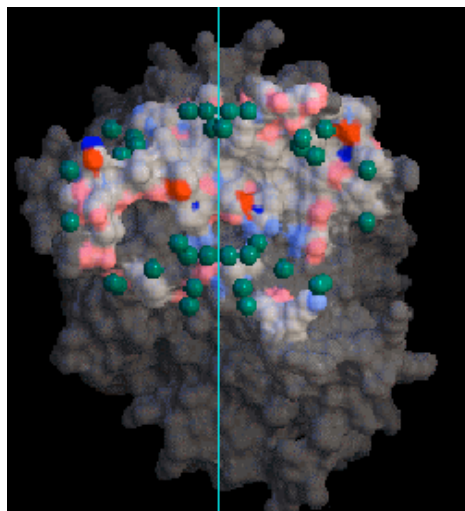
- LJUNGER, G., ADLERCREUTZ, P. & MATTIASSON, B. 1994. Enzymatic synthesis of octyl- β -glucoside in octanol at controlled water activity, *Enzyme. Microb. Technol.* 16, 751-755
- LOSMAN, M., 1974. β -glucosidase Activity as a Diagnostic Index of Gaucher's Disease, S.-A. *Mediese Tydskrif.* 1150.
- MACKENZIE, L. F., WANG, Q., WARREN, R. A. J. & WITHERS, S. G. 1998. Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5883
- MAKROPOULOU, M., CHRISTACAPOULOS, P., TSITSIMPIKOU, C., KEKOS, D., KOLISIS, F.N. & MACRIS, B.J. 1998. Factors affecting the specificity of β -glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl- β -D-glucosides. *Int. J. of Biol. Macromol.* 22, 97-101
- MARAI, J., 1983. Terpens in the aroma of grapes and wines: A reviews. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 4, 49-60
- MARTINO, A., DURANTE, M., PIFFERI, P. G., SPANGA, G. & BIANCHI, G. 1995. Immobilisation of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. *Process Biochemistry.* 31, 281-285
- MATSER, A.M., KREBBERS, B., VAN DEN BERG, R.W. & BARTELS, P.V. 2003. Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends Food Sci. Technol.* (article in press)
- MCCARTER, J.D. & WITHERS, S.G. 1996. *J. Biol. Chem.* 276, 6889-6894
- MERCK INDEX 1989. 11. Kiadás. Merc & CO., Inc. Rahway, N.J., USA, 3767, illetve 9504 cikkszám
- MICHEL, F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6, 414-419
- MIKLÓSY, É. & PÖLÖS, V. 1995. Yeasts with β -glucosidase activity: properties and possible application in wine making processes, *A. Alim.* 24, 167-180
- MINGYU, Q.J., ZHANG, H. & MIN, D.B. 1999. Pulsed electric fields processing effects on flavour compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chem.* 65, 445-451
- MITSUO, N., TATEICHI, H., & SATOH, T. 1984. Synthesis of alkyl glucosides by enzymic transglucosylation. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 1183-1187
- MONOT, F., BORZEIX, F., BARDIN, M. & VANDERCASTEELE, J.P. 1991. Strategies for enzymatic esterification in organic solvents: Comparison of non-aqueous and aqueous micellar or biphasic systems. *App. Microbiol. and Biotech.*, 35 759-765
- MONSAN, P. & COMBES, D. 1988. Enzyme stabilization by immobilization. *Meth. Enzymol.* 137, 584-598
- MORACCI, M., TRINCONE, A. & ROSSI, M. 2001. Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 11, 155-163
- MOSBACH, K. & MOSBACH, R. 1966. Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their application in column techniques. *Acta Chem. Scand.* 20, 2807-2810
- NAIDU, G.S.N. & PANDA, T. 1999. Performance of Pectolytic enzymes during hydrolysis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach. *Enzyme and Microbial Technology.* 25, 116-124
- NEWMAN, V., TEDESHI, G., FAERBER, S. & PIERCE, J.P. 1996. Plant-based diet and breast cancer recurrence: Report of a feasibility study. *J. Am. Dietetic Assoc.* 96, A 55
- NGUYEN, B.L., VAN LOEY, A.M., FACHIN, D., VERLERNT, I. & HENDRICKX, M.E. 2002a. Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). *Biotechnology and Bioengineering.* 78 (6), 683-691
- NGUYEN, B.L., VAN LOEY, A.M., FACHIN, D., VERLERNT, I., INDRAWATI, & HENDRICKX, M.E. 2002b. Partial purification, characterization, and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carrota* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50 (19), 5437-5444
- NILSSON, K. G. I. 1986. A comparison of the enzyme catalyzed formation of peptides and oligosaccharides in various hydroorganic solutions using the nonequilibrium approach. In: *Byocatalysis in Organic Media* Proceedings of an International Symposium held at Wageningen Elsevier Science Publishers Amsterdam pp. 369-374
- NISIZAWA, K. & HASHIMOTO, Y. 1970. In *The Carbohydrates*, Vol. IIA, 241
- O'NEIL, H., ANGLE, C.V., HEMERY, I., EVANS B.R, DAI, S. & WOODWARD, J. 2002. Properties of carbohydrate metabolizing enzymes immobilized in sol-gel beads: stabilization of invertase and beta-glucosidase by Blue Dextran. *Biotech. Lett.* 24 (10), 783-790
- OGAWA, H., FUKUHISA, K., KUBO, Y. & FUKUMOTO, H. 1990. Pressure inactivation of yeast, molds, and pectinesterase in Satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH, organic acid, and comparison with heat sanitation. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1219-1225
- OKAMOTO, K., NAKANO, I-I., YATAKE, T., KIM, T. & KITAKATA, S. 2000. Purification and some properties of a β -glucosidase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64 (2), 333-340

- PAINTRARUX, C., ADACHI, S. & MATSUNO, R. 1996. n-Octyl β -D-glucoside synthesis through β -glucosidase catalyzed condensation of glucose and n-octanol in a heterogeneous system with high glucose concentration. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1, 165-172
- PAINTRARUX, C., ADACHI, S., YOICHI, A., KIMURA, Y. & MATSUNO, R. 1995. Equilibrium yield of n-alkyl- β -D-glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by β -glucosidase in biphasic system, *Enz. Microb. Tech.* 17, 32-40
- PEMBERTON, M.S., BROWN, R.D. & EMERT, G.H. 1980. the role of β -glucosidase in the bioconversion of cellulose to ethanol. *Can. J. Chem. Eng.* 58, 723-729
- PILLER, K., DANIEL, R.M. & PETACH, H.H. 1996. Properties and stabilization of extracellular α -glucosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermococcus* strain AN1: enzyme activity at 130 °C. *Biochem. Biophys. Acta.* 1292, 197-205
- PILNIK, W. & VORAGEN, A.G.J. 1970. The biochemistry of Fruits and their Products. (Ed.: Hulme, A.C.) Vol. 1. Academic Press, London. 73-84
- PÓCSI, I. & KISS, L. 1988. Kinetic studies on the broad-specificity β -D-glucosidase from pig kidney. *Biochem. J.* 256, 139-146
- PONTOH, J. & LOW, N.H. 2001. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 32, 679-690
- POZSÁR-HAJNAL, K. & POLACSEK-RÁCZ, M. 1975. Determination of pectinmethylesterase, polygalacturonase and pectic substances in some fruits and vegetables. Part I. Study into the pectolytic enzyme content of tomatoes. *Acta Alim.* 4, 271-289
- RAVET, C., THOMAS, D. & LEGOY, M. D. 1993. Gluco-oligosaccharide synthesis by free and immobilized β -D-glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering.* 42, 303-308
- REEVES, R.E. & MAZZENO, L.W. 1954. The rearrangement of acetylated and benzoyleated β -glucosides catalyzed by titanium tetrachloride. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2219-2221
- REXANOVA-BENKOVA, L. & MARKOVIC, O. 1976. Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 33, 323-385
- RICCIO, P., ROSANO, R., VINELLA, M., DOMIZIO, P., ZLTO, F., SANSEVERINO, F., D'ELLA, A. & ROSI, I. 1999. Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from two yeast strains of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 123-129
- ROMBOUTS, F.M. & PILNIK, W. 1979. Enzymes in the fruit juice industry. Intern. Microb. Food Ind. Congr., Paris
- ROSI, I., DOMIZIO, P., VINELLA, M. & SALICONE, M. 1995. Hydrolysis of grape glycosides by enological yeast β -glucosidases. In: Charalambous G, editor. Food Flavors: Generation, analysis and process influence. London, Elsevier Science. 1623-1625
- SALGÓ, A. & LÁSZTITY, R. 1988. A zöldségitalok táplálkozásélettani jelentősége. *Élelmiszeripar.* 6, 211-213
- SÁRA, M. & SLEYTR, U.B. 2000. S-layer proteins. Minireview. *J. Biotech.* 182, 859-868
- SCHELLER, F.W., SCHUBERT, F., RENNENBERG, R., MÜLLER, H.G., JAENCHEN, M. & WEISE, H. 1985. Biosensors: Trends in commercialization. *Biosensors.* 1, 135-160
- SCHIRALDI, C., MARTINO, A., COSTABILE, T., GENEROSO, M., MAROTTA, M. & DE ROSA, M. 2004. Glucose production from maltodextrins employing a thermophilic immobilized cell biocatalyst in packed-bed reactor. *Enzyme Microb. Tech.* 34, 415-421
- SCHULZ, M. & KUNZ, H. 1992. Enzymatic glycosylation of o-glycopeptides. *Tetrahedron. Lett.* 33, 5319-5322
- SCHUSTER, B., GULFER, P.C., PUM, D. & SLEYTR, U.B. 2003. Interplay of phospholipase A(2) with S-layer supported monolayers. *Langmuir* 19, 3393-3397
- SCHUSTER, B., PUM, D., SÁRA, M., BRAHA, O., BAYLEY, H. & SLEYTR, U.B. 2001. S-layer ultrafiltration membranes: A new support for stabilizing functionalized lipid membranes. *Langmuir* 17, 499-503
- SCHWENDENER, R.A., ASANGER, M. & WEDER, H.G. 1981. N-Alkyl glucosides as detergents for the preparation of highly homogenous bilayer liposomes of variable sizes (60-240 nm, diam.) applying defined rates of detergent removal of dialysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100, 1055-1062
- SENTI, F.R. & RIZEK, R.L. 1975. Nutrient levels in horticultural crops. *Hort. Science.* 10, 243-256
- SEYDERHELM, I., BUGLAVSKI, S., MICHAELIS, G. & KNORR, D. 1996. Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *J. Food. Sci.* 61, 308-310
- SHINOYAMA, H. & YASUI, T. 1988. Superiority of *Aspergillus niger* β -xylosidase for the enzymatic-synthesis of alkyl- β -xylosides in the presence of variety of alcohols. *Agric. Biol. Chem.* 52, 2375-2377
- SHOSEYOV, O., BRAVDO, B.A., SIEGEL, D., GOLDMAN, A., COHEN, S., SHOSEYOV, L. & IKAN, R. 1990. Immobilized endo- β -glucosidase enriches flavour of wine and passion fruit juice. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1973-1976

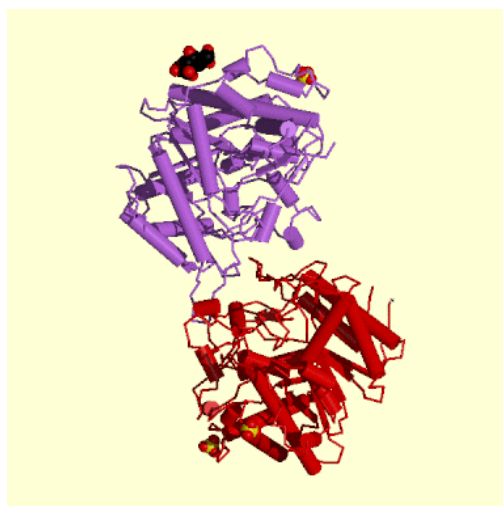
- SILHA, H., JAHN, W. & GIERSCHNER, K. 1996. Effect of a new canning process on cell wall pectic substances, calcium retention and texture of canned carrots. *Pectins and Pectinases*. (Visser J. and Voragen AGJ editors) 495-508
- SIMON, L.M., LÁSZLÓ, K., VÉRTESI, A., BAGI, K. & SZAJÁNI, B. 1998. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 4, 41-45
- SIMS, C.A., BALABAN, M.O. & MATTHEWS, R.F. 1993. Optimisation of carrot juice colour and cloud stability. *J. Food Sci.* 58, 1129-1131
- SLEYTR, U.B., SÁRA, M., KÜPCÜ, Z. & MESSNER, P. 1986. Structural and chemical characterization of S-layers of selected strains of *Bacillus stearothermophilus* and *Desulfotomaculum nigrificans*. *Arch. Microbiol.* 146, 19-24
- SMITH, N.K., GILMOUR, S.G. & RASTALL, R.A. 1997. statistical optimization of enzymatic synthesis of derivatives of trehalose and sucrose, *Enz. Microb. Tech.* 21, 349-354
- SONG, Y., LOVE, M.H. & MURPHY, P. 1990. Subcellular localization of lipoxygenase-1 and -2 in germinating soybean seeds and seedlings. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 961-965
- STERNBERG, D., VIAYAKUMAR, P. & REESE, E.T. 1977. β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.* 23, 139-147
- STRAUSS, C.R., DIMITRIADIS, E., WILSON, B. & WILLIAMS, P.J. 1986. Studies on the hydrolysis of two megastima 3, 6, 9 triols rationalizing the origin of some volatile C13 norisoprenoids of *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.* 34, 145-149
- SVASTI, J., PHONGSAK, T. & SARNTHIMA, R. 2003. Transglycosylation of tertiary alcohols using cassava β -glucosidase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 305, 470-475
- SZABOLCSI, G. 1991. Enzimes analízis. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- SZAJÁNI, B., IVONY, K. & BOROSS, L. 1980a. Aminosav racémátok mszétválasztása optikai izomerekre immobilizált aminoacilázzal. *Magyar Kémiai Folyóirat.* 86, 350-357
- SZAJÁNI, B., KISS, A. & BOROSS, L. 1980b. Investigation of the active center and catalytic mechanism of porcine kidney aminoacylase: a model of the active center. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 15, 29-37.
- TAKEWAKI, S., KIMURA, A., KUBOTA, M. & CHIBA, S. 1993. substrate specificity and subsite affinities of honeybee α -glucosidase II. *Biosci, Biotechnol., Biochem.* 57(9), 1508-1513
- TIJSKENS, L.M.M., WALDRON, K.W., NG, A., INGHAM, L. & VAN DIJK, C. 1997. The kinetics of pectin methyl esterase in potatoes and carrots during blanching. *J. Food Eng.* 34, 371-385
- TUBOLY, E., LEBOVICS, V.K., GAÁL, Ö., MÉSZÁROS, L. & FARKAS, J. 2003. Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. *J. Food Eng.* 56, 241-244
- TUNÇEL, G., NOUT, M. J. R. & BRIMER, L. 1997. Degradation of cyanogenic glycosides of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. *Food Chemistry.* 63, 1. 65-79
- UHLING, H. 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wiley & Sons Inc., New York
- VAN ALEBEEK, G.-J., ZABOTINA, O., SCHOLS, H., BELDMAN, G., VORAGEN, A. 2002. De-esterification of methyl-esterified oligogalacturonides, posyter, forrás: <http://www.ftns.wau.nl/lmt/posters/Gert-Jan1.pdf> (2004. 08. 17)
- VAN RANTWIJK, F., WOUDEBERG-VAN OOSTEROM, M. & SHELDON, R.A. 1999. Glycosidase catalysed synthesis of alkyl-glycosides. *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*. 6, 511-532
- VASSEROT, Y., ARNAUD, A. & GLAZY P. 1993. Evidence for marc monoterpenol glycosides hydrolysis by free or immobilized yeast β -glucosidase. *Biosource Technol.* 43, 269-271
- VASSEROT, Y., CHERMADIN, P., ARNAUD, A., GLAZY, P., 1989. Purification and properties of a β -glucosidase of *Hanseniaspora vinea* Van der Walt with the view to its utilization in fruit arom liberation. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 271-279. *Bioresource Technol.* 43, 269-271
- VAUGHN, R.H., JAKUBCZYL, T., MC MILLAN, J.D., HIGGINS, T.E., DAVE, B.A. & CRAMPTON, V.M. 1969. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology.* 18. 771-775
- VEIBEL, S. 1950. β -Glucosidase, in: Boyer, P.D.; Lardy, H., Myrbäck K. (Szerk.) *The Enzymes*. (2. kiadás) 1 Vol., Academic Press, New York, 583.
- VIC, G. & CROUT, D. H. G. 1994. Synthesis of glucosidic derivatives with a spacer arm by reverse hydrolysis using almond β -D-glucosidase. *Tetrahedron: Asymetry*, 5, 2513-2516
- VIC, G. & CROUT, D. H. G. 1995. Synthesis of allyl and benzyl β -D-glucopyranosides, and allyl β -D-galaktopiranozid from D-glucose or D-galactose and the corresponding alcohol using almond β -D-Glucosidase. *Carbohydrate Research* 279, 315-319
- VIC, G., BITON, J., LE BELLER, D., MICHEL, J.-M. & THOMAS, D. 1995. Enzymatic, glycosilation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction using almond β -D-glucopiranoside. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 109

- VISSER, S., VAN ROOIJENA, P. J., SCHATTKERKB, C. & KERLINGB, K. E. T. 1976. Peptide substrates for chymosin (Rennin). Kinetic studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101–112 of bovine κ -casein. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymology*. 438, 265-272
- VOIRIN, S., BAUMES, R., BITTERU, S., GÜNATA, Z. & BAYNOVE, C. 1990. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1373-1378
- VORA, H.M., KYLE, W.S.A. & SMALL, D.M.. 1999. Activity, localization and thermal inactivation of deteriorative enzymes in Australian carrot (*Daucus carota* L) varieties. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1129-1135
- VULFSON, E. N., PATEL, R., BEECHER., J. E., ANDREWS, A. T. & LAW, B. A. 1990. I. Alkyl- β -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzym. Microb. Technol.* 12, 950-954
- WARRILOW, A.G.S., JONES, M.G. 1995. Different forms of tomato pectinesterase have different kinetic properties. *Phytochem.* 39, 277-282
- WATANABE, T. & KUWAHARA, M. 1993. affinity chromatography of glucosidases on crosslinked methacrylamide copolymer bearing glycamine, *Makuzai Gakkaishi* 39(3), 368-373
- WEBER, J.P. & FINK, A.L. 1980. Temperature dependent change in the rate-limiting step of β -glucosidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 255, 9030-9032
- WEBER, V., WEIGERT, S., SARA, M., SLEYTR, U.B. & FALKENHAGEN, D. 2001. Development of affinity microparticles for extracorporeal blood purification based on crystalline bacterial cell surface proteins. *Therapeut. Apheresis* 5, 433-438
- WEYGAND, M., SCHALKE, M., HOWERS, P.B., KAJER, K., FRIEDMAN, J., WETZER, B., PUM, D., SLEYTR, U.B. & LOSCHE, M. 2000. Coupling of protein sheet crystals (S-layer) to phospholipid monolayers. *J. Materials Chem.* 10, 141-148
- WHITAKER, J.R. 1984. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microbial Techn.* 6/ 8, 341-349
- WIESMAN, A. (ed.) 1975. Handbook of enzyme Biotechnology. Halsted Press, New York
- WILLIAMS, P.J., STRAUSS, C.R., WILSON, B. & MASSY-WESTROPP, R.A. 1982. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*. 21, 2013-2021
- WILLIAMS, P.J., STRAUSS, C.R., WILSON, B. & MASSY-WESTROPP, R.A. 1983. Glycosides of 2-phenylethanol and benzilalcohol in *Vitis vinifera* grapes. *Phytochemistry* 22, 2039-2041
- WOODWARD, J. & CAPPS, K.M. 1992. Cellobiose hydrolysis by glutaraldehyde- treated β -glucosidase entrapped in propylene glycol alginate/bone spheres. *Appl. Biochem. Biotech.*, 34/35, 341-347
- WOODWARD, J. & CLARKE, K. M. 1991. Hydrolysis of cellobiose by immobilized β -glucosidase entrapped in maintenance-free gel spheres. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 28, 277-283
- WOODWARD, J. (Ed.) 1985. Immobilised Cells and Enzymes. IRL Press Ltd., Oxford Washington DC
- YAO, X., MAULDIN, R. & BYERS, L. 2002. Multiple sugar binding sites in α -glucosidase. *Biochim. Biophys Acta.* 1645, 22-29
- ZEMEK, J., AUGUSTIN, J., BORISS, R., KUNIAK, L., SVABOVA, M. & PACOVA, Z. 1981. Polysaccharide-hydrolysing enzymes in the genus *Bacillu*. *Folia Microbiol.* 26, 403-407

II. MELLÉKLET (A β -GLÜKOZIDÁZ SZERKEZETE)

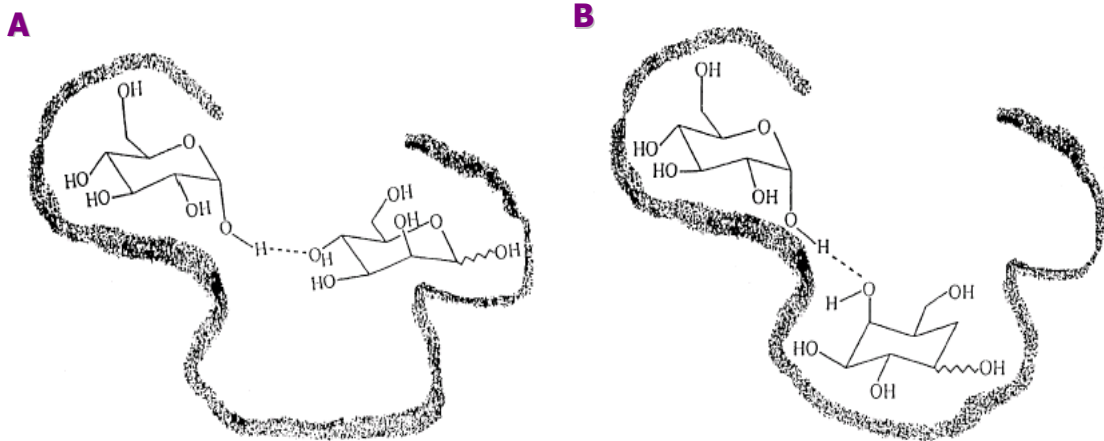


http://www.scripps.edu/pub/goodsell/interface/interface_images/1cbg.html

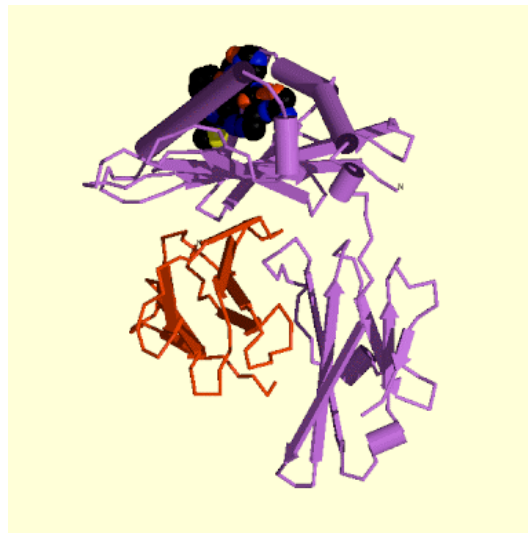


Az izolált, tisztított β -glükózidáz háromdimenziós szerkezete.
[<http://edi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes>]

III. MELLÉKLET (AZ α -GLÜKOZIDÁZ SZERKEZETE)

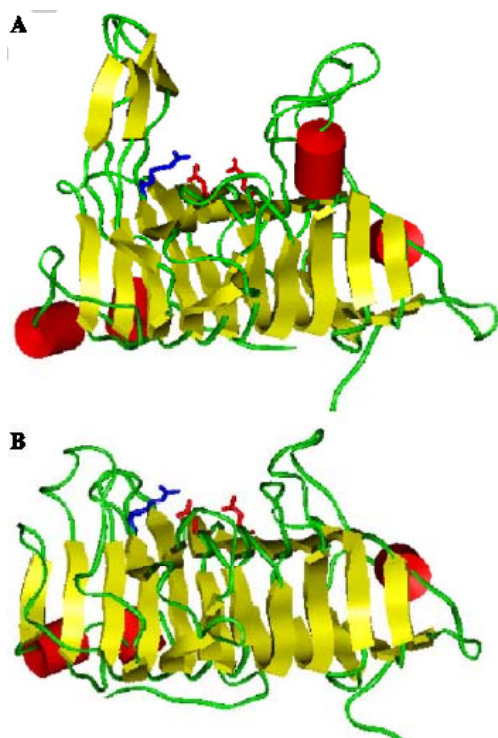


A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő törzs α -glükozidáz aktív helyének sematikus ábrája.
(A) glükózzal és mannózzal; (B) glükózzal és galaktózzal [YAO et al., 2002].

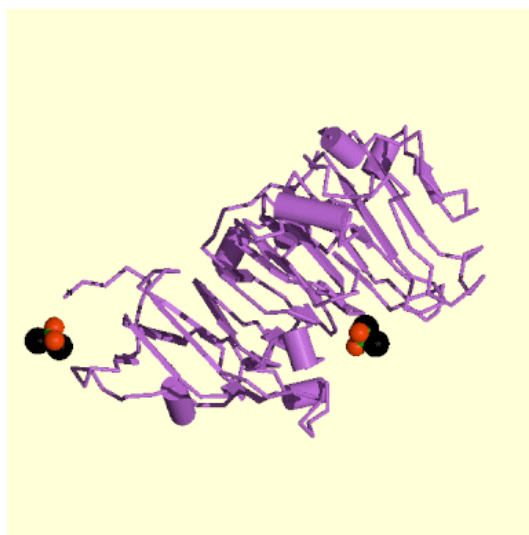


Az izolált, tisztított α -glükozidáz háromdimenziós szerkezete.
[<http://edi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes>]

IV. MELLÉKLET (A SÁRGARÉPA PME HÁROMDIMENZIÓS KÉPE)

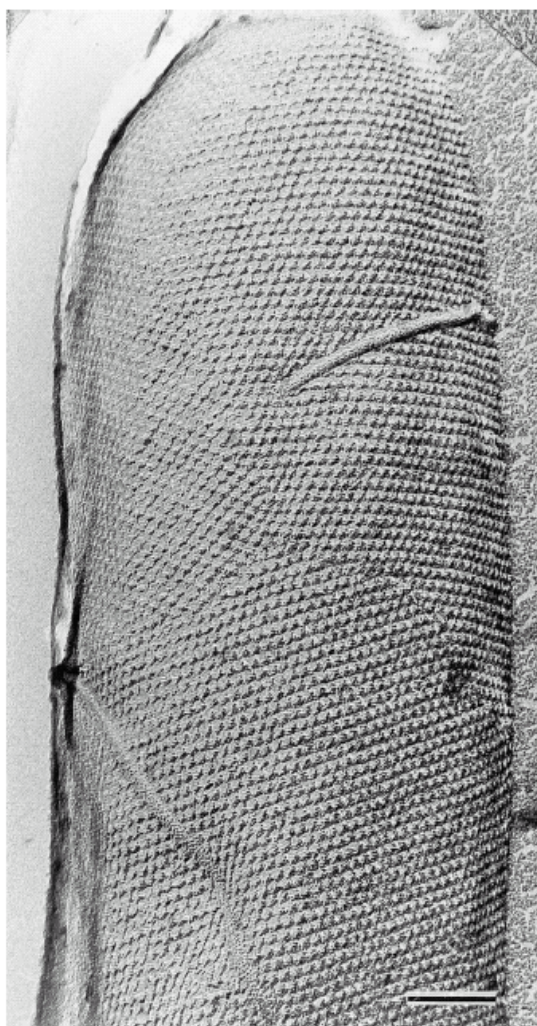


Az *Erwinia Chrysanthemi* (A) és a sárgarépa PME (B) kristályszerkezete. A sárga nyilak a β -redőket jelölik, míg a piros hengerek mutatják az α -hélix szerkezet helyét [JENKINS et al., 2001, JOHANSSON et al., 2002].



Az izolált, tisztított pektin-metil-észteráz háromdimenziós szerkezete.
[<http://edi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes>]

V. MELLÉKLET AZ S-LAYER SZERKEZETE



Fagyasztva hasított elektronmikroszkópos kép, amely egy teljes *Bacillus stearothermophilus* PV 72 sejtet mutat a hatszögletű S-layer ráccsal [Sára & Sleytr, 2000].

VI. MELLÉKLET (A PME VIZSGÁLATA SORÁN ALKALMAZOTT BERENDEZÉSEK)

A pektin-metil-észteráz enzim izolálása, tisztítása és nagynyomású-kezelése során alkalmazott eszközök kerülnek bemutatásra.



Affinitás kromatográfia (Åkta Prime, Amersham Bioscience, Svédország).



Több edényes nagynyomású készülék, (Resato, Hollandia).

VII. MELLÉKLET (A REVERZ HIDROLÍZISRE ALKALMAZOTT OLDÓSZEREK TULAJDONSÁGAI)

Oldószer	Oldószer egyéb neve	Röv.	Szerkezeti képlet	Összegképlet	Moltömeg g mol ⁻¹	Forráspont, °C	Vizidhatóság 25 °C, g l ⁻¹	Stabilitás szobahőm.
Triacetin	Fungacetin, triacetát, triacetilglicerol	TRA	(CH ₃ COOCH ₂) ₂ CH(OCOCH ₃)	C ₉ H ₁₄ O ₆	218,21	258	72	stabil
1,2-Diacetoxietán	Etilénglikol-diacetát	DAE	CH ₃ COO(CH ₂) ₂ OCOCH ₃	C ₆ H ₁₀ O ₄	146,1	79	143	stabil
Butoxi-etanol	Etilén glikol monobutiléter, butil glikol butil celloszolv	BOE	CH ₃ (CH ₂) ₃ O(CH ₂) ₂ OH	C ₆ H ₁₄ O ₂	118,2	170	1712	stabil
Fenoxi-etanol	2-hidroxietil feniléter, 2-etoxietil-alkohol, etil-celloszolv	FEN	C ₆ H ₅ O(CH ₂) ₂ OH	C ₈ H ₁₀ O ₂	90	134,8	23	stabil
Dimetil-formamid	-	DMF	HCON(CH ₃) ₂	C ₃ H ₇ NO	73	153	korlátlan	stabil
Butil-alkohol	n-butil alkohol, 1 hidroxibután	-	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	C ₄ H ₁₀ O	74,1	118	92	stabil
Pentil-alkohol	n-amilalkohol, n-butilkarbinol, n-pentilalkohol	-	CH ₃ (CH ₂) ₄ OH	C ₄ H ₁₀ O	88,2	138	27	stabil
Hexanol	n-hexil-alkohol	HEX	CH ₃ C(H ₂) ₄ CH ₂ OH	C ₆ H ₁₄ O	102,18	158	6	stabil
Ciklohexil-alkohol	Ciklohexil alkohol, Hexalin, adrono	NAOL		C ₆ H ₁₂ O	100,16	161	36	stabil

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönet illeti témavezetőmet, **Dr. Kosáry Judit** egyetemi tanárt az MTA doktorát, aki a doktoranduszi munkám 36 hónapja alatt fáradhatatlanul vezetett, támogatott és a reménytelennek tűnő helyzetekben is utat mutatott.

Dr. Fodor Péter egyetemi tanárnak az MTA doktorának, az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjének köszönettel tartozom a támogatásáért, és amiért lehetővé tette, hogy doktoranduszként az Alkalmazott Kémia Tanszéken végezzem kutatásaimat.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Dernovics Mihály** tanársegédnek, aki mint idősebb doktorandusz társam az összes felmerülő probléma megoldásában azonnal segítségemre sietett. Tapasztalatait megosztotta velem. A Marie Curie ösztöndíj megpályázása során nélkülözhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönet illeti **Uwe B. Sleytr** professzort és **Dr. Margit Sára** egyetemi docenst a bécsi Agrár Egyetem munkatársait az enzimrögzítéshei felhasznált felületi réteg rendelkezésre bocsátásáért.

Köszönet illeti **Dr. Nógrádi Mihályt** az MTA doktorát, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szerves Kémia Tanszékének címzetes egyetemi tanárát az O-glükózidok preparatív léptékű előállításánál nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni **Dr. Marc Hendrickx** professzor úrnak és az összes **belgiumi kollégámnak** a lehetőségért, hogy Tanszékükön kutatásokat végezzek és tapasztalatokat gyűjtsék, valamint amiért munkámat még hazatérésem után is támogatták.

Köszönettel tartozom **Dr. Tóth Árpád** egyetemi adjunktusnak, aki a gázkromatográfiás mérések megtervezésénél, végrehajtásánál és kiértékelésénél segített és vezetett.

Tömöry Istvánnak szeretném kifejezni hálámat, aki mint rendszergazda mind az otthoni, mind pedig a Tanszéki munkámat megkönnyítette. Az összes felmerülő informatikai probléma megoldásában nélkülözhetetlen segítséget nyújtott.

Az ábrák nagy részének elkészítésében **Dr. Fodor Marietta** egyetemi adjunktus sietett segítségemre, köszönet illeti ezért.

Dr. Boross László professzor úrnak az MTA doktorának is szeretnék köszönetet mondani értékes tanácsaiért.

Külön megköszönöm **Rezessyné Dr. Szabó Judit** egyetemi adjunktusnak és **Dr. Sisak Csabának** a kémiai tudomány kandidátusának, hogy elvállalták a műhelyvitán a bíráló feladatát és építő jellegű kritikával segítették munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani az **Alkalmazott Kémia Tanszék összes munkatársának**. Az eltöltött négy év alatt nem tudtam olyat kérni tőlük, amely probléma megoldásában ne siettek volna azonnal a segítségemre.

Köszönet illeti **Sinkó Ilonát** és a **Richter Gedeon Rt munkatársait**, akik a rögzített enzimek liofoilezésének technikai megoldásában nyújtottak segítséget.

Köszönettel tartozom **családomnak**, akik nélkül ma nem lennék itt. Mindvégig mellettem álltak és támogattak.