



BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

NÉHÁNY HIDROLÁZ, AZ α - ÉS β -GLÜKOZIDÁZ, VALAMINT A
PEKTIN-METIL-ÉSZTERÁZ ÉLELMISZERIPARI
ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

BALOGH TERÉZ

doktori értekezésének tézisei

Készült a Budapesti Corvinus Egyetem

Alkalmazott Kémia Tanszékén

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

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori szabályzatában előírt valamennyi feltételének eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

1.1 Az enzimek használata az élelmiszeriparban

A természetben fellelhető enzimeket az ősidőktől fogva 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 XIX. század végén tudtak a fermentációs technológiák fejlődésének következtében viszonylag tiszta enzimeket ipari méretben előállítani és felhasználni. Az enzimek tudományosan megalapozott technológiai felhasználása 1984-ben kezdődött a takadiasztáz alkalmazásával az Egyesült Államokban. Az elmúlt négy évtizedben az enzimológia és a biotechnológia tudománya egymást támogatva fejlődött.

Jelenleg az iparban használt enzimek túlnyomó többségben a 3. enzimosztályba (hidrolázok) tartoznak, ennek értelmében szerepük különböző biomolekulák hidrolitikus lebontása. Az élelmiszeriparban, a legnagyobb mértékben használt enzimek a proteázok, amilázok, lipáz (sajtgyártásban), laktáz (tejiparban), pektin-metil-észteráz (gyümölcs alapanyagok puhításához, lényeréshez 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 enzimipar és az azt kiszolgáló enzimkutató kutatás. Enzimek alkalmazásakor egy gyártási technológia során sok zavaró tényező léphet fel. Az enzimek fehérje jellegükből adódóan hő, pH és só-érzékenyek, így stabilitásukról és a működési paraméterek optimalásáról gondoskodni kell. Az enzimek önmaguk is szennyezést jelentenek 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, enzimkatalizált romlási folyamatai nagy problémát jelentenek az élelmiszeripar számára. Hagyományos élelmiszeripari technológiákban ezt a problémát hőkezeléssel oldották meg, amely nem csak a csírátlanítás elvégzésére volt hivatott, hanem a hőérzékeny és nem kívánatos enzimek inaktiválására is.

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 megtartásával kerüljenek a fogyasztókhoz. A hagyományos élelmiszertechnológiai eljárásokkal készített élelmiszerek ezeknek az elvárásoknak nem felelnek meg. Ezen igények kielégítésére új eljárásokat, kíméletesebb feldolgozási módszereket alakítottak ki.

1.2 Célkitűzések

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. Modellként mind a glükozidázokra, mind a pektin-metil-észterázra egy-egy jellegzetes élelmiszeripari alkalmazás vizsgálatát terveztem. A vizsgált enzimmekkel kapcsolatban, a Tanszék korábbi eredményeire is alapozva az alábbi konkrét célokat tűztem ki:

- Az élelmiszeriparban detergensként használt nem ionos, nem toxikus és biológiailag lebontható, felületaktív *o*-alkil-glükozidok szintézisét terveztem reverz hidrolízissel, azaz glükózból és hidroxivegyületből, szerves oldószerben végrehajtott kapcsolási reakcióval. A korábbi tapasztalatokra alapozva mind az α -, mind a β -glükozidáz alkalmazhatóságát kívántam megvizsgálni és célul tűztem ki olyan új, preparatív szintézis kidolgozását, amely az alkalmazható hidroxivegyületek körét az eddigiekhez képest nagymértékben tágítja.
- A glükozidázok élelmiszerre vonatkozó minőség javító hatását a borok aromapotenciáljának növelésével kívántam vizsgálni.
- A kitűzött feladataimhoz új glükozidáz 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 zöldséglevékben 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 enzimmészletének vizsgálata számos információval szolgálhat. Ezért vizsgálni kívántam, hogy az endogén α - és β -glükozidáz, valamint a pektin-metil-észteráz aktivitásának változásai jellemzőek lehetnek-e egyes élelmiszeripari folyamatok hatásaira.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Az α - és β -glükózidáz aktivitási és stabilitási vizsgálatai

Mind a natív, azaz a kereskedelemben kapható liofilizált formájú, mind a különböző módon rögzített α - és β -glükózidáz aktivitását indirekt módon a reakcióelegy glükóz koncentrációjának változásával jellemeztem. A reakcióelegyek glükóz koncentrációjának meghatározására egyénileg módosított enzimes analízist használtam. Az α - és β -glükózidáz stabilitását a tervezett reverz hidrolitikus folyamatok szerves oldószeres közegében azonnali és inkubációs inaktiválódásuk kinetikai vizsgálatával jellemeztem.

2.2 A natív sárgarépa pektin-metil-észteráz vizsgálata

A natív (azaz izolált és tisztított) sárgarépa pektin-metil-észteráz és a vizsgált sárgarépa készítmények pektin-metil-észteráz aktivitását a pektinből felszabaduló karboxilcsoportok mennyiségével jellemeztem és titrimetriás módszerrel határoztam meg. Mind a modellként alkalmazott natív sárgarépa pektin-metil-észteráz, mind a különböző sárgarépa készítmények (az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverék, illetve szeletelt sárgarépa) pektin-metil-észteráz tartalmának stabilitását a tervezett inaktiváló körülmények (hőkezelés, illetve nagynyomású kezelés) között bekövetkező aktivitásváltozás kinetikai vizsgálatával jellemeztem.

2.3 Növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok endogén α - és β -glükózidáz, valamint pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálata

Az alábbi, a kereskedelmi forgalomban beszerezhető növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok (sárgarépa, brokkoli, szőlő, karfiol és mandula) kezelés előtti, illetve a különböző kezelések utáni α - és β -glükózidáz, valamint pektin-metil-észteráz aktivitásának vizsgálatához különböző kivonatokat készítettem. Megállapítottam, hogy a növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok α - és β -glükózidáz aktivitásának méréséhez a legalkalmasabb kivonat az egyébként a lipoxigenázok kivonására rendszeresített kivonószerezettel (50 mM TRISZ-acetát puffer pH 8,2, amely szacharózra nézve 0,38 M, CaCl_2 nézve 0,02 M töménységű) készíthető (100 mg ml^{-1}). A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok pektin-metil-észteráz aktivitásának méréséhez egyénileg rövidített és módosított kivonó eljárást alkalmaztam. A kivonó szer Triton-X-100, glicerol, nátrium-klorid (137 mg ml^{-1}), polivinil-pirrolidon és ditiotritol összetevőket tartalmazó 0,5 M TRISZ-hidroklorid puffer pH 8,5 volt.

2.4 Az α - és β -glükózidáz rögzítése

Az α - és β -glükózidázok Akrilex C 100 hordozóra történő rögzítését optimalizált karbodiimides módszerrel végeztem és a készítményeket liofilezés után használtam fel. A β -glükózidázt egyéni glutáraldehydes koimmobilizációval rögzítettem a felületi rétegre (Surface layer), ezután kalcium-algináttal gélbezárást hajtottam végre.

2.5 A β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazásának modellezése

A rögzített β -glükózidáz készítmények élelmiszeripari alkalmazhatóságát borok aromaprofiljának módosításával teszteltem. A vizsgált borokat kétféle rögzített β -glükózidáz (Akrilex C-100 hordozóra, illetve a felületi réteghez kötött, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt) készítménnyel rázattam és a kezelt mintákat dietil-éter és pentán elegyével extraháltam. A kezelések hatását gázkromatográfiás úton vizsgáltam.

A pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazását a sárgarépa készítmények (az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverék, illetve szeletelt sárgarépa) minőségjavítási folyamatával modelleztem, amelynek során az endogén pektin-metil-észterázt inaktiváltam. A hőkezelés és a nagynyomású kezelés során alkalmazott inaktiválási körülményeket a modellként alkalmazott izolált natív sárgarépa pektin-metil-észteráz vizsgálata során szerzett tapasztalatok alapján határoztam meg.

2.6 A felületaktív *o*-alkil-glükózidok szintézise reverz hidrolízissel

A felületaktív *o*-alkil-glükózidok szintézisét Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükózidáz katalizálta reverz hidrolízissel hajtottam végre, glikozilező ágensként a megfelelő alkoholokat használtam, hígítószerként különböző szerves oldószereket próbáltam ki. A reakciókat részben indirekt módszerrel, a glükóz tartalom csökkenésének segítségével követtem. A keletkezett *o*-alkil-glükózidok koncentrációjának meghatározását nagynyomású vékonyrétegkromatográfiás módszerrel végeztem.

Az *o*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok általam kidolgozott preparatív léptékű szintézisekor a reakcióelegyek feldolgozásához az 1,2-diacetoxi-etán hígítószer esetében bepárlásos módszert, míg a triacetin esetében extrakciós módszert alkalmaztam. A termékeket vastagrétegkromatográfiás úton izoláltam és szerkezetüket $^1\text{H-NMR}$ spektrumuk segítségével igazoltam.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az élelmiszeripari alkalmazások modellezéséhez először a natív α - és β -glükózidáz, valamint pektin-metil-észteráz, később a különböző rögzített glükózidáz készítmények enzimkinetikai tulajdonságait és stabilitási viszonyait vizsgáltam olyan körülmények között, amelyek a későbbi felhasználásnak megfeleltek.

3.1 A α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz vizsgálata

3.1.1. A reakcióelegyek O-glükozid tartalmának meghatározása

Az α - és β -glükózidázzal kapcsolatos reakcióelegyek O-glükozid tartalmát indirekt módszerrel (glükóz tartalom mérés) és direkt meghatározással (nagy nyomású vékonyrétegkromatográfia) állapítottam meg. A reakcióelegyek glükóz koncentrációjának meghatározására használt, az irodalomban glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz/NADP módszerként ismeretes enzimes analízist a kereskedelemben kapható kettek magas költségei miatt egyéni megoldással helyettesítettem, amelynek keretében a vizsgálat elvét megtartottam, de olcsóbb vegyszereket és más koncentrációkat alkalmaztam.

3.1.2 Az α - és β -glükózidáz stabilitási vizsgálatai

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 – ezt nevezzük reverz hidrolízisnek. Mivel a reverz hidrolitikus reakcióelegyek szerves oldószereket tartalmaznak, a natív és rögzített α - és β -glükózidáz stabilitási viszonyait a szintézisek tervezett körülményei között, de minden esetben szerves oldószerek jelenlétében vizsgáltam. Szerves oldószerekben az enzimek inaktiválódását két különböző módon jellemeztem, a vizes oldatban mért aktivitásra vonatkoztatott *azonnali inaktiválódással* és a szerves oldószerben, a kezdeti időpontban mért aktivitásra vonatkoztatott *inkubálási inaktiválódással*. Az α - és β -glükózidáz azonnali inaktiválódását különböző, 5-15 % víztartalmú, vízzel elegyedő és nem elegyedő aprótikus szerves oldószerben vizsgáltam 10 % hexanol, mint glükóz akceptor és 10 mM glükóz jelenlétében. Mind a natív, mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükózidáz gyakorlatilag valamennyi vizsgált szerves oldószerben azonnal elvesztette az aktivitását. Mind a

natív, mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz a legkedvezőbb stabilitási eredményeket akkor mutatta, ha szerves oldószer 1,2-diacetoxi-etán vagy triacetin volt.

3.1.3 A natív pektin-metil-észteráz vizsgálata

A hőkezelés és a nagynyomású kezelés során olyan inaktiválási körülményeket alkalmaztam, amelyeket később a különböző sárgarépa készítmények kezelésénél is használni akartam. A natív sárgarépa PME oldat hőinaktiválódási és a nagynyomás hatására bekövetkező aktivitásváltozási kinetikáját matematikai modellel jellemeztem, mindkét esetben a kinetika elsőrendű volt. A tizedelődési értékekre az alkalmazott hőmérsékletek és az enzimoldatok kémhatásának is volt befolyása. A natív sárgarépa PME inaktiválódása, mind a hőkezelés, mind a nagynyomású kezelés hatására savas kémhatásnál (pH 4,5) volt a leggyorsabb.

3.2 A glükózidázok rögzítése

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

Mind az α -, mind a β -glükózidáz Akrilex C-100 hordozóra történő rögzítését a már ismert karbodiimides módszerrel, de az általam optimalizált körülmények között végeztem. A rögzített β -glükózidáz aktivitását $73 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ xerogél g}^{-1}$ értékről, $153 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ xerogél g}^{-1}$ értékre növeltem és a hozamot 13 százalékról 27 százalékra javítottam. A rögzített α -glükózidáz aktivitását és hozamát is sikerült megjavítanom, a korábban leírt $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ xerogél g}^{-1}$ értékről $3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ xerogél g}^{-1}$ értékre, a hozamot pedig 3 százalékról 4 százalékra. Az α -glükózidáz Akrilex C-100 hordozóra történő rögzítése azonban erőfeszítéseim ellenére sem vált olyan jelentőssé, hogy arra preparatív szintetikus módszert alapozni lehessen.

3.2.2 A β -glükózidáz rögzítése felületi rétegre

A *Bacillus stearothermophilus* PV72 törzsből izolált felületi réteget eddig még nem használták hordozóként enzimek rögzítésére. A felületi réteg nem megfelelően szilárd szerkezeti tulajdonságai miatt már eddig is általános gyakorlat volt az alkalmazás előtti glutáraldehydes tréhalósítás. Ezt a tréhalósítást koimmobilizálással kötöttem össze: a felületi réteg és a rögzíteni kívánt enzim keverékét kombinált keresztkötésekkel kapcsoltam össze, glutáraldehyd segítségével. Ezt az új módszert több enzimen teszteltem. A legsikeresebbnek a β -glükózidáz rögzítése bizonyult. A felületi réteghez rögzített β -glükózidáz aktivitása 1 g száraz felületi rétegre számolva $82 \mu\text{mol min}^{-1}$, a rögzítés hozama 12,5 % volt. A készítmény a vizsgált szerves oldószerekben azonnal elvesztette aktivitását, így reverz hidrolitikus folyamatokban alkalmazni nem lehetett. A készítményt a borok

kezelésére azért nem lehetett közvetlenül használni, mert a hordozó növelte volna a bor fehérjetartalmát, ezért a felületi réteghez rögzített β -glükózidázt 37 % hozammal kalcium-alginát gyöngyökbe zártam. A felületi réteg gélbezárása eddig még nem volt ismert. A borok aromaprofiljának módosítására kiválóan felhasználható kalcium-alginát gyöngyökbe zárt, felületi réteghez rögzített β -glükózidáz aktivitása 1 g kalcium-alginát géltre számolva $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ volt.

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

3.3.1 Rögzített β -glükózidáz készítmények tesztelése a borok aromaprofiljának módosítására

A felületi réteghez rögzített β -glükózidáz élelmiszeripari alkalmazhatóságát a borok aromaprofiljának módosításával kívántam tesztelni. Mivel a fehérje alapú hordozó nem kívánatos módon növelte a borok fehérjetartalmát, a rögzített készítmény kalcium-alginát gyöngyökbe zárt formáját vizsgáltam erre és az újabb készítmény viselkedését az erre a célra még nem tesztelt Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz viselkedésével hasonlítottam össze. Miután meggyőződtem arról, hogy mind az Akrilex C-100 típusú hordozóra rögzített, mind a kalcium-alginát gyöngyökbe zárt, felületi réteghez rögzített β -glükózidáz a 12-15 % alkoholtartalmú közegekben megfelelő stabilitású, velük muskotályos borok aromaprofil javítási kísérleteit végeztem. A kezeléseket ($200 \mu\text{mol min}^{-1}$ β -glükózidáz aktivitás bor literenként) szobahőmérsékleten ($22-25 \text{ }^\circ\text{C}$) 16 óra hosszat, enyhe rázatás közben. A rögzített enzim dekantálása a kezelt borokból az illó komponenseket extrakcióval (pentán – dietil-éter, 1:2) izoláltam és kivonatok összetételének vizsgálatát gázkromatográfiás módszerrel végeztem. Az aromaprofil gazdagodását két jellemző aromakomponens (gerániol és linalool) koncentrációjának szignifikáns (két-háromszoros) növekedésével jellemeztem. Bár mind a két rögzített β -glükózidáz készítmény alkalmasnak mutatkozott a vizsgált borok aromaprofiljának módosítására, ezeknek a készítményeknek az élelmiszeripari alkalmazása egyelőre korlátozott a magas előállítási költségek miatt.

3.3.2 A sárgarépból készült élelmiszeripari készítmények minőségjavítása a pektin-metil-észteráz tartalom csökkentésével

A pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazását a sárgarépa készítmények (az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverék, illetve szeletelt sárgarépa) minőségjavítási folyamatával modelleztem, amelynek során az endogén pektin-metil-észterázt inaktiváltam. A hőkezelés és a nagynyomású kezelés során olyan inaktiválási körülményeket

alkalmaztam, amelyek a natív sárgarépa pektin-metil-észteráz vizsgálatai során megfelelőnek bizonyultak. Mind az ipari körülmények között nyert sárgarépalét modellező keverék, mind a szeletelt sárgarépa pektin-metil-észteráz tartalmának hő- és nagynyomású inaktiválódása a natív sárgarépa pektin-metil-észterázhoz hasonlóan elsőrendű inaktiválódási kinetikát mutatott.

A szeletelt sárgarépa pektin-metil-észteráz tartalma kevésbé érzékeny volt a hőkezelésre és a nagynyomású kezelésre. Feltevésem szerint ezért az enzim természetes környezetének stabilizáló hatása lehetnek a felelősek. Nem találtam olyan speciális paraméter kombinációt, amely lehetővé tenné a vizsgált sárgarépa készítmények pektin-metil-észteráz tartalmának kíméletes, gyors és hatékony inaktiválását.

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

Azt vizsgáltam, hogy az élelmiszeriparban alkalmazott növényi eredetű alapanyagok endogén α - és β -glükózidáz, illetve pektin-metil-észteráz aktivitásának változásai mennyire jellemzőek az egyes élelmiszeripari folyamatok, elsősorban a hőkezelés és hosszú ideig tartó tárolás hatásaira. Megállapítottam, hogy a vizsgált alapanyagokban az endogén α -glükózidáz aktivitás túl alacsony volt a további vizsgálatokra.

Az előfőzés jellemzésére a brokkolit és a karfiolt vizsgáltam. A brokkoli β -glükózidáz aktivitása $144 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ brokkoli g}^{-1}$, pektin-metil-észteráz aktivitása pedig $11,42 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ brokkoli g}^{-1}$, a karfiol β -glükózidáz aktivitása $377 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ karfiol g}^{-1}$ és pektin-metil-észteráz aktivitása $3,93 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ karfiol g}^{-1}$ volt. Mindkét enzim alkalmasnak mutatkozott az előfőzöttség és a hűtőtárolás nyomon követésére. A β -glükózidáz aktivitás a hőkezelés körülményeitől (2-6 perc, 90-98 °C) függően a brokkoliban 20-35, a karfiolban 15-28 százalékára csökkent és ez az aktivitás a hűtőtárolás során tovább csökkent. A vizsgált zöldségekben a pektin-metil-észteráz aktivitás az előfőzés alkalmazott paramétereire hatására teljesen inaktiválódott, és aktivitása a hűtőtárolás során sem regenerálódott.

A vizsgált növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok (vöröshagyma és édesmandula) huzamosabb tárolása során sem a β -glükózidáz, sem pektin-metil-észteráz aktivitásában nem találtam lényeges változást. Ugyancsak jelentéktelen különbséget találtam a különböző édesmandula-, szőlő- és almafajták β -glükózidáz és pektin-metil-észteráz aktivitása között is.

3.4 A felületaktív *o*-glükozidok preparatív léptékű szintézise α - és β -glükozidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal

3.4.1 AZ *O*-glükozidok kisléptékű reverz hidrolitikus szintézisének optimalása

A preparatív léptékű szintézishez megfelelő reakcióparaméterek megállapításához először optimaltam a korábban, a Tanszéken végrehajtott reverz hidrolitikus kapcsolási reakciókat (*n*-butanol, *n*-pentanol, *n*-hexanol és ciklohexanol, mint glükozilező ágensek és egyben hígítószer, natív és Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükozidáz). Az optimalás következtében sikerült az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükozidáz ($153 \mu\text{mol min}^{-1}$ száraz xerogél g^{-1}) katalizált a reakció esetében a eredetileg 20-25 % hozamot legalább kétszeresére növelnem (40-60 %). A tételnövelési kísérleteket 10 % víztartalmú reakcióelegyekben végeztem. Az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α -glükozidáz esetében az optimalás ellenére sem voltak a hozamok 28 százaléknál magasabbra emelhetők. A szintézisek hozamát minden esetben csak analitikai módszerekkel, elsősorban HPTLC segítségével állapítottam meg.

A preparatív izolálhatóság és az azonosíthatóság érdekében a szintézisek léptékét meg kellett növelnem. Ez a törekvés reakcióelegyek komplex heterogenitása következtében kezdetben sikertelennek bizonyult. Ezért a heterogenitás csökkentésére különböző szerves oldószerek, mint hígítószer bevezetését kíséreltem meg annak ellenére, hogy korábban ilyen jellegű sikeres kísérletekre nem igen volt példa. Számos sikertelen próbálkozás után úgy találtam, hogy az 1,2-diacetoxi-etán és a triacetin hidrofób karakterű, ugyanakkor vízben való oldódásuk számottevő, valószínűleg ezért csökkentik a reverz hidrolitikus reakcióelegyekben a komplex heterogenitást.

A két hígítószer jelenlétében a rögzített β -glükozidáz stabilitása nem sokban különbözött a hígítószer nem tartalmazó reakcióelegyekben mutatott stabilitástól. Ilyen közegben a rögzített α -glükozidáz gyakorlatilag elvesztette aktivitását, ezért továbbiakban csak a rögzített β -glükozidáz katalizálta reakciókkal foglalkoztam. A vizsgált kisléptékű szintetikus reakciók hozama még akkor is elérte a 30-45 százalékot, ha a reakcióelegyekben csupán 10 % glikozilező alkohol volt jelen. A hígítószer bevezetésével lehetségessé vált olyan *o*-helyettesített glükozidok reverz hidrolitikus előállítására is, amelyeknek megfelelő hidroxil-vegyület nem használható hígítószerként. A további vizsgálatokat összekötöttem egy új felületaktív *o*-glükozid típus, az irodalomban eddig még nem ismert *o*-alkoxi-alkil-glükozidok szintézisével.

A kisléptékű reverz hidrolitikus reakciók vizsgálatát összekötöttem az α - és β -glükozidáz inkubálási inaktiválódásának kinetikai elemzésével. Megállapítottam, hogy mind a natív, mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített α - és β -glükozidáz inaktiválódási kinetikája elsőrendű,

ugyancsak megállapítható volt, hogy az 1,2 diacetoxi-etán és a triacetin hígítószer csak minimális mértékben növelték az Akrilex C-100 hordozóra rögzített β -glükozidáz inaktiválódási hajlamát. A natív β -glükozidáz stabilitása triacetin jelenlétében szignifikánsan magasabb volt, mint 1,2-diacetoxi-etán jelenlétében.

3.4.2 Az *O*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok preparatív léptékű szintézise reverz hidrolízissel

A preparatív léptékű reverz hidrolitikus reakcióelegyek a glükózhoz viszonyítva hússzoros feleslegben alkalmaztam a glikozilező hidroxil-vegyületet, a hidroxil-vegyület és a hígítószer aránya 1:9 volt és a reakcióelegyek 10 % vizet tartalmaztak. A képződött *O*-glükozidok, pontosabban az *O*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok izolálása meglehetősen nehézségekkel járt. Az 1,2-diacetoxi-etán forráspontja megfelelő vákuum alkalmazásával elegendően alacsony volt ahhoz, hogy a termékek izolálására *bepárlásos-vastagrétegkromatográfiás módszert* alkalmazzak. A triacetin magas forráspontja ezt lehetetlenné tette, ezért a termékeket *extrakciós-vastagrétegkromatográfiás módszer* segítségével izoláltam. Az *O*-helyettesített- β -D-glükopiranozidok preparatív léptékű szintézisének a hozama 10-25 % volt.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

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 szintézishez.

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 Akrix C-100 hordozóra rögzített β -glükózidáz viselkedésével hasonlítottam össze és megállapítottam, hogy mind az Akrix 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 alanyanyagok 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.

JAVASLATOK

- o A reverz hidrolitikus reakciókkal kapcsolatos tudományos eredményeim alapján indokoltnak tartom az 1,2-diacetoxi-etán és a triacetin, mint hígítószer alkalmazásának kiterjesztését az α - és β -glükózidázokon kívül más glükózidázokra, sőt egyes glikózidázokra is nem csak reverz hidrolitikus, hanem transzglykozilezési reakciókban.
- o A β -glükózidáz felületi rétegre (S-layer) történő sikeres rögzítése arra enged következtetni, hogy az S-layer más, eddig még nem erre nem vizsgált enzimek esetében is előnyös hordozó lehet.
- o Előzetes vizsgálataim alapján indokoltnak tartom mind az Akrilex C-100 hordozóra rögzített, mind a felületi rétegre rögzített, majd kalcium-alginát gyöngyökbe zárt β -glükózidáz esetében a borok aromaprofiljának módosítási kísérleteinek szélesebb borspektrummal és részletesebben történő további vizsgálatát.
- o A különböző sárgarépa készítményekkel végzett hőkezelések és nagynyomású kezelések eredményei alapján úgy gondolom, hogy az egyéb növényi alapanyagokból készült élelmiszeripari készítmények kezelése után az endogén pektin-metil-észteráz aktivitásának kinetikai vizsgálata informatív jelentőséggel bírhat.
- o Véleményem szerint csak további vizsgálatok alapján lehet eldönteni, van-e olyan növényi eredetű élelmiszeripari alapanyag, amely tárolásának jellemzésére vagy különböző fajtáinak megkülönböztetésére eredményesen alkalmazhatók az endogén hidrolázok, elsősorban az α - és β -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz aktivitás változásai.

KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Tudományos közlemény nemzetközi folyóiratban angol nyelven

1. BALOGH, T., BOROSS, L., KOSÁRY, J. 2003. Novel reaction systems for the synthesis of *o*-glucosides by enzymatic reverse hydrolysis, *Tetrahedron*. 60, 679-682 IF 2,641
2. BALOGH, T., SMOUT, C., NGUYEN, B.L., VAN LOEY, A.M. AND HENDRICKX, M.E. 2004. Thermal and high-pressure inactivation kinetics of carrot pectinmethylesterase (PME): from model system to real foods, *IFSET Innovative Food Science and Emerging Technologies* (közlésre elfogadva)
3. BALOGH, T. & KOSÁRY, J. 2004. A preparativ-scale synthesis of *o*-alkyl- β -D-glucosides by enzymatic reverse hydrolysis. *Acta Alim.* (közlés alatt). IF 0,299
4. BALOGH, T., TÓTH, Á., KOSÁRY, J. 2004. Immobilized β -glucosidase preparations for the treatment of wines. *Acta Alim.* (közlésre beküldve) IF 0,299

Tudományos közlemény hazai folyóiratban magyar nyelven

1. KOSÁRY J., BALOGH T., KISS N., KORBÁSZ M. 2004. A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 3. A mandula (*Prunus amygdalus*) vizsgálata biokémiai módszerekkel. *Olaj, szappan, kozmetika* 53, 11-13

Tudományos közlemény nemzetközi konferencia kiadványban angol nyelven

2. BALOGH, T., NGUYEN, B.L., VAN LOEY, A.M., SMOUT, C., HENDRICKX, M.E. 2002. Inactivation kinetics of pectinmethylesterase in model systems and in carrot pieces. 8th PhD Symposium on Applied Biological Sciences, Gent, Belgium, 273-276.
3. KOSÁRY, J., KORBÁSZ, M., KISS, N., BALOGH, T. 2004. Almond lipoxygenases Proceedings of the 16th International Plant Lipid Symposium, 8 oldal, CD-ROM.

Tudományos közlemény hazai konferencia kiadványban magyar nyelven

1. BALOGH T., KOSÁRY J. 2001. Emulgeáló szerek szintézise biokémiai módszerekkel. Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Filka J. szerk., 165-169.
2. BALOGH T., BOROSS L., KOSÁRY J. 2002. Reverz hidrolitikus reakciók eddig még nem vizsgált szerves közegben. Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Filka J. szerk., 255-259.

3. BALOGH T., KOSÁRY J. 2003. A β -glükózidáz inaktiválódása a reverz hidrolízis folyamán. Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Filka J. szerk., 355-359.
4. BALOGH T., KOSÁRY J. 2004. *o*- β -Glükózidok előállítása hígítószert is tartalmazó reverz hidrolitikus reakcióelegyekben. Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Filka J. szerk., 61-64.
5. BALOGH T., KOSÁRY J. 2004. Közvetlenül fogyasztásra kerülő répakészítmények eltarthatóságának növelése. Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Filka J. szerk., 73-77.
6. BALOGH T., VITÉZ V., KOSÁRY J. 2004. Új enzimek tesztelése az előfőzés jellemzésére. VI. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia, Szeged, 6 oldal, CD-ROM.

Egyoldalas kivonat nemzetközi konferenciakötetben angol nyelven

1. BALOGH, T., NGUYEN, B.L., VAN LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. 2002. Effect of pH on the thermostability of carrot pectinmethylesterase, Marie Curie Workshop, Brussel, Belgium
2. BALOGH, T., BOROSS, L., KOSÁRY, J. 2002. Reverse hydrolytic activity of native β -glucosidase in an unusual, environmentally friendly solvent, Applied Biocatalysis, Como, Italy

Egyoldalas kivonat hazai konferenciakötetben magyar nyelven

1. BALOGH T., KOSÁRY J. 2001. Élelmiszer adalékok szintézise biokémiai módszerekkel. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete, Sárospatak
2. BALOGH T., KOSÁRY J. 2001. Új detergensok szintézise enzimes reverz hidrolízissel. Vegyészkonferencia, Hajduszoboszló
3. BALOGH T., KOSÁRY J. 2003. Élelmiszeripari szempontból fontos hidrolázok enzimkinetikai vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany
4. BALOGH T., KOSÁRY J. 2004. β -glükózidáz rögzítése felületi rétegekre. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete, Sopron