



---

Élelmiszertudományi Kar

# Új, rögzített $\beta$ -glükózidáz enzimkészítmény előállítása és élelmiszeripari felhasználhatóságának vizsgálata

RADVA DÁNIEL  
Doktori (PhD) értekezés

Készült:  
Budapesti Corvinus Egyetem  
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2013.

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** **Dr. Felföldi József**  
Egyetemi tanár  
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 feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2013. év december 3.-ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

Biacs Péter, DSc

**Tagjai**

Bélafiné Bakó Katalin, DSc

Halász Anna, DSc

Gelencsér Éva, CSc

Nguyen Duc Quang, PhD

**Opponensek**

Rezessyné Szabó Judit, PhD

Nemestóthy Nándor, PhD

**Titkár**

Woller Ágnes, PhD

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK .....</b>	<b>9</b>
<b>1. BEVEZETÉS.....</b>	<b>10</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 A <math>\beta</math>-glükózidáz (EC 3.2.1.21) .....</b>	<b>12</b>
<i>2.1.1 A <math>\beta</math>-glükózidáz a glikozidázok csoportjában .....</i>	<i>12</i>
<i>2.1.2 A <math>\beta</math>-glükózidáz általános jellemzése .....</i>	<i>12</i>
<i>2.1.2.1 A <math>\beta</math>-glükózidáz szerkezeti felépítése .....</i>	<i>13</i>
<i>2.1.2.2 A <math>\beta</math>-glükózidáz működése és optimum értékei.....</i>	<i>14</i>
<i>2.1.2.3 A <math>\beta</math>-glükózidáz előfordulása és izolálása .....</i>	<i>14</i>
<i>2.1.3 A <math>\beta</math>-glükózidáz aktivitásmérésének általános módszerei.....</i>	<i>15</i>
<i>2.1.3.1 A <math>\beta</math>-glükózidáz aktivitásmérése p-nitro-fenil-<math>\beta</math>-D-glükopiranozid szubsztráton .....</i>	<i>16</i>
<i>2.1.3.2 A <math>\beta</math>-glükózidáz aktivitásának meghatározása a felszabaduló glükóz mennyisége alapján .....</i>	<i>16</i>
<b>2.2 Az enzimek rögzítése .....</b>	<b>17</b>
<i>2.2.1 A rögzített enzimekkel szemben támasztott általános követelmények.....</i>	<i>17</i>
<i>2.2.2 Az enzimrögzítés fontosabb típusai.....</i>	<i>18</i>
<i>2.2.3 Hordozók .....</i>	<i>20</i>
<i>2.2.3.1 Ioncserélők .....</i>	<i>21</i>
<i>2.2.3.2 Polisztirol származékok, mint ioncserélők .....</i>	<i>21</i>
<i>2.2.4 A rögzítés hatása az enzimek tulajdonságaira .....</i>	<i>22</i>
<i>2.2.4.1 A rögzítés hatása az enzimek katalitikus tulajdonságaira .....</i>	<i>22</i>
<i>2.2.4.2 A rögzítés hatása az enzimek stabilitására .....</i>	<i>24</i>
<i>2.2.5 A <math>\beta</math>-glükózidáz rögzítése .....</i>	<i>25</i>
<b>2.3 Enzimmészítmények alkalmazása az élelmiszeriparban .....</b>	<b>28</b>
<i>2.3.1 Hidrolázok alkalmazása az élelmiszeriparban .....</i>	<i>29</i>
<i>2.3.2 A glükózidázok élelmiszeripari felhasználása .....</i>	<i>30</i>
<i>2.3.2.1 A <math>\beta</math>-glükózidáz enzimmészítmények hidrolitikus alkalmazása az élelmiszeriparban.....</i>	<i>31</i>
<i>2.3.2.2 A <math>\beta</math>-glükózidáz enzimmészítmények hidrolitikus alkalmazása borászatban .....</i>	<i>31</i>
<i>2.3.2.3 A <math>\beta</math>-glükózidáz hidrolitikus alkalmazásának lehetősége a gabona eredetű élelmiszeripari alapanyagok <math>\beta</math>-glükán tartalmának lebontásában .....</i>	<i>35</i>
<b>2.4 A hidroláz enzimek preparatív célú alkalmazása .....</b>	<b>38</b>

<b>2.4.1 A glükozidázok preparatív alkalmazása, O-glükozidok szintézise</b> .....	39
2.4.1.1 A O-glikozidok előállítása transzglikozilezéssel .....	39
2.4.1.2 A O-glikozidok előállítása reverz hidrolízissel .....	40
<b>2.5 A HPAEC-PAD, nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfiás módszer alkalmazása a szénhidrát analitikában</b> .....	42
2.5.1 A HPAEC-PAD rendszer működésének feltételei és főbb elemei .....	43
2.5.2 A HPAEC-PAD rendszer felhasználása $\beta$ -glükánok és glükánáz által hidrolizált $\beta$ -glükánok meghatározására .....	45
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	47
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	48
4.1 Kísérletek helye, alkalmazott műszerek és berendezések .....	48
4.2 Felhasznált anyagok .....	49
4.2.1 Enzimmészítmények.....	49
4.2.2 Az enzimmegkötési eljárásához használt hordozó .....	49
4.2.3 Vegyszerek .....	50
4.3 A kísérletek során általánosan alkalmazott műveletek.....	51
4.4 Enzimmegkötési eljárás .....	51
4.4.1 Hordozó előkészítése .....	51
4.4.2 Megkötési eljárás .....	52
4.5 A megkötési eljárás és az enzimmészítmények általános jellemzése során alkalmazott mérési és vizsgálati módszerek .....	52
4.5.1 $\beta$ -glükozidáz enzimaktivitás meghatározása az általánosan alkalmazható szubsztrátok esetén.....	52
4.5.1.1 Enzimaktivitás meghatározás cellobióz szubsztrát esetén .....	52
4.5.1.2 Enzimaktivitás meghatározás a mesterséges p-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozid (pNPG) szubsztrát esetén .....	53
4.5.2 A hordozóhoz adszorpciósan kötött fehérje mennyiségének meghatározása .....	54
4.5.2.1 Meghatározás a megkötési elegy felülúszójának aktivitása alapján.....	54
4.5.2.2 Meghatározás spektrofotometriás módszerrel .....	55
4.5.3 Kinetikus-leoldódási vizsgálat.....	55
4.5.4 Az enzimmészítmények kinetikai paramétereinek meghatározása .....	56
4.5.5 Az enzimmészítmények pH optimumának meghatározása .....	57

<b>4.5.6 Az enzimesztítmények hőmérséklet optimumának meghatározása .....</b>	<b>57</b>
<b>4.6 A megnövelt stabilitású rögzített enzimesztítmény felhasználhatóságának vizsgálati módszerei élelmiszeripari folyamatokban.....</b>	<b>58</b>
<b>4.6.1 Felhasználhatósági vizsgálat a cellobióz hidrolitikus bontásában.....</b>	<b>58</b>
<b>4.6.2 Felhasználhatósági vizsgálat borászati körülmények között.....</b>	<b>59</b>
4.6.2.1 A pH és etanoltartalom hatása az enzimesztítmények katalitikus aktivitására .....	59
4.6.2.2 A rögzített enzimesztítmény felhasználási stabilitásának vizsgálata .....	60
<b>4.6.3 Felhasználhatósági vizsgálat O-glikozidok reverz hidrolitikus módon történő előállításában .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6.4 Felhasználhatósági vizsgálat az árpa <math>\beta</math>-glükán tartalmának lebontásában.....</b>	<b>62</b>
4.6.4.1 A natív enzim inaktiválási lehetőségeinek vizsgálata .....	62
4.6.4.2 A HPAEC-PAD nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfiás mérési módszer .....	63
4.6.4.3 Az enzimidat membránszűrése .....	64
4.6.4.4 Az enzimesztítmények működésének vizsgálata a tiszta árpa $\beta$ -glükán oligo- és diszacharid szubsztrátokon.....	65
4.6.4.5 Az Endo-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glükán-4-glükánhidroláz (glükánáz) által hidrolizált árpa $\beta$ -glükán előállítása.....	66
4.6.4.6 Az enzimesztítmények működésének vizsgálata a glükánáz által hidrolizált árpa $\beta$ -glükánon.....	66
<b>4.7 Mérési eredményeim reprodukálhatósága .....</b>	<b>67</b>
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....</b>	<b>68</b>
<b>5.1 A <math>\beta</math>-glükozidáz enzim aktivitásmérési módszerének kiválasztása és az aktivitásmérés paramétereinek meghatározása.....</b>	<b>68</b>
<b>5.2 Rögzítési eljárás vizsgálata .....</b>	<b>70</b>
5.2.1 A rögzítési vizsgálatok során alkalmazott kinetikus-leoldódási vizsgálat elve.....	71
5.2.2 Adszorpciós rögzítési eljárás vizsgálata .....	72
5.2.2.1 A pH és a só koncentráció hatása az adszorpciós kötődés kialakulására.....	73
5.2.2.2 A hőmérséklet hatása az adszorpciós kötődés kialakulására .....	75
5.2.2.3 Szubsztrát jelenlétének hatása az adszorpciós kötődés kialakulására .....	75
5.2.2.4 A hordozóhoz adszorpciósan rögzíthető aktivitás és enzimfehérje mennyiség meghatározása .....	76
5.2.3 A glutáraldehides kezelési eljárás vizsgálata .....	80
5.2.3.1 A glutáraldehides kezelés idejének hatása a rögzítési eljárás hatásfokára.....	80

5.2.3.2 Különböző pH értékeken végzett glutáraldehydes kezelés hatása a rögzítési eljárás hatásfokára .....	82
5.2.3.3 A glutáraldehyd koncentráció hatása a rögzítési eljárás hatásfokára .....	83
5.2.3.4 Szubsztrát jelenlétének hatása a glutáraldehydes kezelés hatásfokára .....	85
5.2.4 A kombinált rögzítési eljárással elérhető maximális aktivitás és rögzítési hozam meghatározása .....	85
5.2.5 A kombinált rögzítési technika előnyei .....	87
5.3 A rögzített enzimmészítmény jellemzése .....	88
5.3.1 A rögzített enzimmészítmény kinetikai állandóinak ( $V_{max}$ , $K_m$ ) meghatározása .....	89
5.3.2 A rögzített enzimmészítmény aktivitásának pH függése.....	90
5.4 A rögzített enzimmészítmény stabilitásának növelése, ezáltal borászati felhasználásra is alkalmas készítmény előállítása és jellemzése .....	90
5.4.1 Leoldódási vizsgálatok a rögzített enzimmészítménnyel.....	91
5.4.2 A glutáraldehydes kezelés idejének hatása a rögzített enzimmészítmény stabilitására, pH 4,00 kémhatású közegben történő felhasználás esetén .....	92
5.4.3 A megnövelt stabilitású rögzített enzimmészítmény kinetikai állandóinak meghatározása .....	94
5.4.4 A megnövelt stabilitású rögzített enzimmészítmény aktivitásának pH függése .....	96
5.4.5 A megnövelt stabilitású rögzített enzimmészítmény aktivitásának hőmérséklet függése .....	97
5.5 A megnövelt stabilitású rögzített enzimmészítmény élelmiszeripari felhasználhatóságának vizsgálatai .....	98
5.5.1 Felhasználhatósági vizsgálat a cellobióz hidrolitikus bontásában .....	99
5.5.2 Felhasználhatósági vizsgálat borászati körülmények között.....	102
5.5.2.1 A pH és etanoltartalom hatása az enzimmészítmények aktivitásértékeire.....	102
5.5.2.2 A megnövelt stabilitású rögzített készítmény felhasználási stabilitásának vizsgálata .....	104
5.5.3 Felhasználhatósági vizsgálat O-glikozidok reverz hidrolitikus módon történő előállításában .....	106
5.5.4 Felhasználhatósági vizsgálat az árpa $\beta$ -glükán tartalmának lebontásában.....	110
5.5.4.1 A natív enzim inaktiválási lehetőségeinek vizsgálata .....	112
5.5.4.2 Az árpa $\beta$ -glükán oligo- és diszacharidok HPAEC-PAD rendszerrel történő meghatározása .....	114

<i>5.5.4.3 Az enzimek készítmények kinetikai paramétereinek meghatározása a tiszta árpa <math>\beta</math>-glükán oligo- és diszacharid szubsztrátokon</i> .....	116
<i>5.5.4.4 A glükánáz által hidrolizált árpa <math>\beta</math>-glükán oligoszacharid tartalmának meghatározása a reakcióelegyben</i> .....	124
<i>5.5.4.5 Az enzimek készítmények kinetikai paramétereinek meghatározása a glükánáz által hidrolizált árpa <math>\beta</math>-glükánon</i> .....	125
<b>6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b> .....	128
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	130
<b>SUMMARY</b> .....	132
<b>MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	134
<b>PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG</b> .....	148



## RÖVIDÍTÉSEK

Rövidítés	Magyar megfelelő
DAE	Diacetoxi-etán (etilén-glikol-diacetát)
DINISA	A redukáló cukor tartalmat meghatározó dinitro-szalícilsavas módszer
DP	Polimerizáció foka
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav
FD	Fluoreszcensz detektálás
G3G	Laminaribióz
G4G3G	3-O- $\beta$ -cellobiozil-D-glükopiranoz
G4G4G3G	3-O- $\beta$ -cellotriozil-D-glükopiranoz
GC-MS	Gázkromatográfiával összekapcsolt tömegspektrometria
HPAEC-PAD	Nagyhatékonyságú anioncserés kromatográfia pulzáló amperometrikus detektálással
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HPTLC	Nagyhatékonyságú vékonyréteggkromatográfia
$K_m$	Michaelis-Menten féle reakciósebességi állandó
MS rögzített enzim/enzimmészítmény	Megnövelt stabilitású rögzített enzimmészítmény
NaOAc	Nátrium-acetát
pNPG	p-Nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozid
rpm	Fordulatszám
RD	radioaktivitás mérésen alapuló detektálás
S-layer	Felületi réteg
T	Hőmérséklet, °C
t	Idő, perc
TRA	Triacetin (Glicerín-triacetát)
TRISZ	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
Triton X-100	Helyettesített polietilén-glikol (fantázia név)
UVD	Ultraibolya tartományban való detektálás
$V_{max}$	Maximális reakció sebesség

## 1. BEVEZETÉS

Az enzimek nyújtotta lehetőségeket már őseink is kihasználták pl. bőrkikészítés, len megmunkálás vagy éppen indigó előállítás során. A természetben előforduló enzimeket, így régóta az élelmiszer előállítás során is széleskörűen alkalmazzák (pl. sör-, bor- és sajtkészítés esetében). A fermentációs technológiák fejlődésének következtében a múlt század végén nyílt lehetőség az enzimek ipari méretekben történő előállítására, amely lehetővé tette az enzimek felhasználását az ipar számára (pl. textil-, detergens- és élelmiszeripar). A jelenlegi ipari felhasználásban, túlnyomó többségben a 3. enzimosztályba (hidrolázok) tartozó enzimek vannak jelen, amelyek szerepe a különböző biomolekulák hidrolízises lebontása. A proteázokat széleskörűen alkalmazzák a húsiparban, tejiparban, detergensiparban, mosószeriparban, stb. Másik nagyobb csoportba a szénhidrátbontó enzimek tartoznak (főként az amilázok és a cellulázok), mivel a keményítő-, textil-, üzemanyag-, sütő- és detergens ipar nagy mennyiségben használja fel őket. Az élelmiszeripar által leginkább alkalmazott enzimek a proteáz, lipáz (sajtgyártásban), laktáz (tejiparban), pektin-metil-észteráz (gyümölcs alapanyagok puhításához, lényszeréshez és derítéshez), pektináz, transzglutamináz.

A szintén a hidrolázok osztályába tartozó  $\beta$ -glükozidáz enzim az élelmiszeriparban alkalmas lehet a glikozidos kötést tartalmazó biomolekulák hidrolízisére, így a cellulóz bontás utolsó lépésében a cellobióz, a minőséget rontó szacharidok bontására, a glikozidos kötésben levő aromaanyagok felszabadítására, a gabonafélékben előforduló  $\beta$ -glükánok lebontására, valamint a kitűnő emulzió és habstabilizáló képességű *O*-glikozidok és glikoproteinek reverz hidrolízissel történő előállítására. Az enzimek (így a  $\beta$ -glükozidáz enzim is) fehérje jellegükből adódóan hő, pH és só-érzékenyek, emiatt stabilitásukról és a működési paramétereik optimálásáról is gondoskodni kell, a megfelelő és hatékony felhasználásuk érdekében. Problémát jelenthet az is, hogy az enzimek idegen fehérjeként önmaguk is szennyezést jelenthetnek az élelmiszerben, amennyiben eltávolításuk nem kivitelezhető. A rögzített enzimek alkalmazásával a stabilitás, valamint az újrafelhasználhatóság és a könnyű eltávolítás kérdése megoldható és ebből adódóan a költségek is számottevően csökkenthetők. A rögzített enzimek gyakorlati alkalmazási előnyei miatt a  $\beta$ -glükozidáz enzim immobilizálására is már több eljárást kidolgoztak, amelyekben a rögzítéshez használt hordozók többnyire drágák és nehezen beszerezhetőek, a rögzítési technikák sok esetben összetettek és bonyolultak voltak, továbbá sok enzimpreparátum az élelmiszer technológiákban nem alkalmazható. Ilyen immobilizált  $\beta$ -glükozidáz készítmények ipari méretekben történő előállítása ezért nehézkes és gazdaságilag előnytelen lenne. Ezért olyan

enzimpreparátumok előállítására van szükség, amelyek egyszerre tesznek eleget az élelmiszeripari felhasználásra vonatkozó előírásoknak és előállításuk, használatuk gazdaságilag is előnyös.

Az Élelmiszertudományi Kar Alkalmazott Kémia Tanszékén Dr. Kosáry Judit egyetemi tanár témavezetésével, illetve közreműködésével már több olyan pályázati projekt futott, amely hidrolázok, közöttük a  $\beta$ -glükózidáz rögzítését, a rögzített enzimek stabilitását, illetve alkalmazhatóságukat tanulmányozta, elsősorban reverz hidrolitikus folyamatokban. Témavezetésével Balogh Teréz PhD dolgozatában [BALOGH, 2004] kétféle rögzített  $\beta$ -glükózidáz készítményt állított elő. Ezek közül az Akrilex C-100 hordozóra rögzített  $\beta$ -glükózidáz igen alkalmasnak bizonyult az *O*-alkil-glükózidok új, preparatív léptékű reverz hidrolitikus szintézisére. Ezt a készítményt, a felületi réteghez kötött, majd gélbezárt készítménnyel együtt borjavítási kísérletekben is tesztelték.

Doktori munkám során, tehát olyan új, rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimmészítmény előállítására törekedtem, amelynek előállítása olcsó és egyszerű technológiát igényel, valamint az előállított preparátum biztonságosan alkalmazható különböző élelmiszeripari folyamatokban. Különös figyelmet kívántam fordítani az alkalmazott kombinált rögzítési technika (első lépésben adszorpciós rögzítés az Amberlite IRA 900 anioncserélő gyanta felületén, majd keresztkötések kialakítása a felületen megkötődött enzimek között) vizsgálatára, mivel  $\beta$ -glükózidáz enzim esetében először került alkalmazásra, valamint az így kialakított kötőerők és a rögzítési eljárás paraméterei között fennálló összefüggések vizsgálatait még szintén nem végezték el. Ehhez saját vizsgálati módszer kidolgozása volt szükséges. Az újonnan előállított rögzített enzimmészítmények általános jellemzésén túl, minden esetben szükséges megvizsgálni az ipari felhasználhatóságának lehetőségeit, valamint a különböző alkalmazások során annak viselkedését. Ezért az előállított preparátum felhasználhatóságát igyekeztem minél több élelmiszeripari folyamatban megvizsgálni: cellobióz hidrolitikus bontása, borászati körülmények között való felhasználás, *O*-glikozidok reverz hidrolitikus előállítása és az árpa  $\beta$ -glükán tartalmának lebontása során. Az irodalmi áttekintésben felhasználtam azokat a forrásokat és adatokat is, amelyek a Dr. Kosáry Judit által vezetett két évtizedes kutatás során összegyűltek, és amelyeket a többi résztvevővel közösen, szabadon használhattam mind a tudományos diákköri, mind a doktoranduszi munkám során.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A $\beta$ -glükózidáz (EC 3.2.1.21)

#### 2.1.1 A $\beta$ -glükózidáz a glikozidázok csoportjában

A glikozidázok *O*-, *N*- és *S*-glikozid szerkezetű szubsztrátok (szénhidrátok) hidrolizálására szolgálnak. Az egyszerű cukrokból felépülő összetett szénhidrátok hidrolízisét a karbohidroláz enzimek végzik. Az egyszerű cukorrészeket összekapcsoló glikozidos kötések azok, amelyeket bontani képesek. A szénhidrátbontó enzimeken belül is elkülöníthetők, amelyek képesek a nem szénhidrát aglikonnal rendelkező glikozidokat bontani, ezeket heterozidázoknak, valamint azok, amelyek csak a szénhidrátot tartalmazó glikozidokat bontják, ezeket pedig holozidázoknak nevezzük. További csoportosítás végezhető aszerint is, hogy a katalizált reakció során megtartják-e, vagy izomerizálják az anomer hely konfigurációját. A trehaláz és  $\beta$ -amiláz nem változtatja meg az anomer hely konfigurációját, ezért ezeket „konformáció megtartó glikozidázoknak”, amíg az invertáz és lizozim pedig invertáló enzimeknek tekinthetők [VAN RANTWIJK et al., 1999]. A *glükózidázok* a glükóz polimerek hidrolízisét végző holozidáz enzimek. Az iparban kihasználják, hogy a holozidáz enzimekkel heterozidokat is lehet bontani. Ilyen az élelmiszeriparban is alkalmazott holozid típusú szénhidrátbontó enzimek például az  $\alpha$ -,  $\beta$ - és glükóamiláz.

A természetben szinte mindenütt fellelhetők glükozidos kötésben levő vegyületek. Legjellemzőbben a növényvilágban vannak jelen, ahol alkoholok, fenolok és merkaptánok fordulnak elő glükozidos kötésben. A gyümölcsökben is ilyen glikozidok alkotják az aromavegyületek prekursorait. A továbbiakban a témám szempontjából fontos *O*-glikozidázzal, a  $\beta$ -glükózidázzal foglalkozom.

#### 2.1.2 A $\beta$ -glükózidáz általános jellemzése

A  $\beta$ -glükózidáz a béta térállású glükozidos hidroxilt tartalmazó glükóz glükózidjait hidrolizálja. Szinonim nevei a következők: cellobiáz, emulzin, genciobiáz, elatráz, arbutináz és amigdalináz. A legjelentősebb  $\beta$ -glükozidos kötéssel rendelkező diszacharid a cellobióz, innen ered az enzim cellobiáz elnevezése is. Elsőként mandulatej emulzióban azonosították az enzimet, innen ered az emulzin név [WIESMAN, 1975]. Az emulzin jelentős D-galaktozidáz és D-mannozidáz aktivitással is rendelkezik.

### 2.1.2.1 A $\beta$ -glükózidáz szerkezeti felépítése

A  $\beta$ -glükózidáz enzim olyan glikoprotein, amelynek szerkezetét általában 447 aminosav alakítja ki és két aktív alegységből áll [GROVER et al., 1977]. A  $\beta$ -glükózidáz háromdimenziós képét az 1. ábra szemlélteti. A mandulából izolálható  $\beta$ -glükózidáz 117 és 66,5 kDa [HELFERICH & KLEINSCHMIDT, 1965], a *Flavobacterium johnsonae* esetében 72 kDa [OKAMOTO et al., 2000], amíg a *Debaryomyces hansenii*  $\beta$ -glükózidáz enzim molekulái 122 és 95 kDa molekulatömegűek [RICCIO et al., 1999]. A  $\beta$ -glükózidáz enzimek a termelő szervezet fajtája szerint, a  $\beta$ -glükózidos kötés bontásának szempontjából némileg különbözhetnek. A bemutatott eltéréseket az I. aktív centrum méret és alak szerinti eltérései vagy a két aktív centrum (I. és II.) egymáshoz viszonyított távolságkülönbségei eredményezhetik. Veibel és Larner összefoglaló munkát is készített a  $\beta$ -glükózidáz enzimről [VEIBEL, 1950; LARNER, 1960].



**1. ábra**

*Thermogata maritima* törzsből izolált és tisztított  $\beta$ -glükózidáz háromdimenziós szerkezete.

Forrás: <http://\edi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes>

### 2.1.2.2 A $\beta$ -glükózidáz működése és optimum értékei

A  $\beta$ -glükózidáz olyan exohidroláz enzim, amely a  $\beta$ -térállású hidroxil kötést tartalmazó molekulákat hidrolizálja, amelynek első lépéseként a szubsztrátummal bomlékony, komplex vegyületet kialakítva kapcsolódik. Működési hatásmechanizmusát tekintve, az enzimmolekula felületén elhelyezkedő mélyedésekbe a kis szubsztrát molekulák belesimulnak, és ezáltal a szubsztrátumban az elektron eloszlás úgy módosul, hogy a reakció végbemeneteléhez szükséges aktiválási energia lecsökken. A reakció az enzim felületén megy végbe, amelyhez a víz  $\text{OH}^-$  és  $\text{H}^+$  ionjai is szükségesek, majd ezután a kialakult komplex a végtermékekre és az enzimre bomlik szét.

Az enzim nagyon széles szubsztrát specifitással rendelkezik, ugyanis a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) kötés felszakításán túl, egyéb glükóz diszacharidokat pl.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) kötet tartalmazó laminaribiózt, valamint  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) kötet tartalmazó szoforózt is hidrolizálni képes, azonban lényegesen kisebb aktivitással. Az oligomerek lebontása során minden esetben a nem redukáló molekulavégén kezdi meg a bontást [WIESMAN, 1975] és általánosan elmondható, hogy az aktivitása az oligomer lánc hosszának növekedésével csökken [DAY & WITHERS, 1986].

A szubsztráttól, az előfordulási helytől és a termelő szervezettől függően a  $\beta$ -glükózidáz enzim aktivitásának pH optimuma 3,0-7,0 között változik. Aktivitásának hőmérséklet optimumát alapvetően meghatározza az enzimet termelő szervezet hőmérséklet optimuma, így ez az érték 20-85 °C tartományban változik. Az enzim általános aktivátorai az alkáli földfém sók. Inhibitoraiként említhetők a C-vitamin, formaldehid és a nátrium-hidrogénszulfít ( $\text{NaHSO}_3$ ), nehézfém-sók (pl. higany-klorid), glükóz, cellobióz (nagy koncentrációban), genciobióz, maltóz, melibióz, cello-oligoszacharidok, *p*-kloromerkuriobenzoát, EDTA,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  [LARNER, 1960].

### 2.1.2.3 A $\beta$ -glükózidáz előfordulása és izolálása

A  $\beta$ -glükózidáz enzim megtalálható penész-, élesztőgomba törzsekben, baktériumokban, malátában, szilvamagban, édes és keserű mandulában, egyéb növényekben (rizs, cseresznye, szója, stb.), emlősök vesében, májban, az éti csiga emésztőnedveiben és a talajban is. Keserű barackmagból is izolálták már, ahol elősegítheti a magban lévő mérgező ciánglükózidok lebontását [TUNÇEL et al., 1997]. Azonban a mai napig a mandula az elsődleges forrása a kereskedelemben elérhető enzimpreparátumoknak. [GASZTONYI & LÁSZTITY, 1992].

Az enzim izolálása csak többlépcsős tisztítási folyamaton keresztül lehetséges. Az enzim általános forrásai és termelő szervezetei: édes-mandula (*Amygdalus communis*), papaja (*Carica papaya*), kasszava (*Manihot esculenta*), *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Mucor mihei*, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viride*, stb [FREER, 1993]. Mivel az enzim forrása nagymértékben meghatározza annak izolálhatóságát, ezért különböző tisztítási technikák kerültek kidolgozásra, amelyekből néhány változat az alábbiakban kerül bemutatásra.

A *Sulfolobus solfataricus* esetében lecentrifugálták a sejteket, majd 0,05 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,3) felszuszpendálták, amely Triton X-100-at és 0,15 M koncentrációjú nátrium-kloridot tartalmazott. Miután a sejteket feltárták, szűrték a szuszpenziót. A frakciók szétválasztását oszlopkromatográfiás módszerrel végezték el, és gélszűréssel koncentrálták [KENGEN & STAMS, 1994].

Watanabe és Kuwahara *Aspergillus niger*-ből affinitás kromatográfiai technikával, keresztkötéseket tartalmazó metakrilamid kopolimeren tisztították a  $\beta$ -glükózidázt. Az enzimet 0,01 M nátrium-klorid oldattal 0,02 M koncentrációjú acetát pufferrel oldották le az oszlopról [WATANABE & KUWAHARA, 1993].

A szójabab (*Glycine soja*) csíraleveleiből előállított szuszpenziót, 0,2 M töménységű foszfát pufferrel (pH 6,0), amely 0,2-0,5 mM nátrium-kloridot tartalmazott, vákuumban leszűrték. A készítmény jelentősen feldúsult a  $\beta$ -glükózidáz enzimben, miután a nedves csapadékot centrifugálták [HSIEH & GRAHAM, 1997].

### **2.1.3 A $\beta$ -glükózidáz aktivitásmérésének általános módszerei**

Az enzimaktivitás meghatározásánál általános gyakorlat szerint a lehetőségektől függően a szubsztrát mennyiségének, a keletkezett termék mennyiségének, de más reakciópartnert is igénylő reakcióknál a koenzim valamely formájának időegységre eső változását is mérhetjük. Általában a fotometriás mérési módszereket részesítik előnyben, de nem ritka az egyéb műszeres analitikai meghatározási módszer sem.

Kétféle fotometriás módszer lehetséges. A direkt módszerhez olyan reakciókomponens jelenléte szükséges, amely adott hullámhosszon a reakció sebességével azonos ütemben változtatja a rendszer abszorbanciáját. Abban az esetben ha nincs fotometrálnálható reakciókomponens, akkor meghatározott időpontokban kivett mintákban valamelyik reakciótermékből fotometrálnálható származékot kell képezni, és ezen származék koncentráció változásának mérésével, közvetett úton állapítható meg az enzimaktivitás [SZABOLCSI, 1991].

Több módszer is rendelkezésre áll a  $\beta$ -glükózidáz aktivitásának meghatározására, amelyekben természetes vagy mesterséges  $\beta$ -*O*-glükózidok hidrolízisével, és/vagy a reakció során keletkező glükóz koncentrációjának a nyomon követésével állapítható meg az enzim aktivitása. Az enzimreakció nyomon követésének a módját alapvetően a szubsztrát határozza meg, azonban általánosan elterjedtek a közvetett fotometriás módszerek is, amelynek keretében a reakcióelegy glükóz koncentrációját külön mérési elegyben határozzák meg.

#### 2.1.3.1 A $\beta$ -glükózidáz aktivitásmérése *p*-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozid szubsztráton

Általánosan elterjedt a *p*-nitro-, azaz 4-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozid (pNPG) szubsztrátot alkalmazó módszer, amelyben a felszabaduló glükóz koncentráció változásával azonos mértékű *p*-nitro-fenol koncentrációváltozás fotometriásan követhető [STERNBERG et al., 1977]. A *Calzyme Laboratories, Inc.* meghatározása szerint az a  $\beta$ -glükózidáz mennyiség felel meg 1 egységnek, amely katalizálja 1  $\mu$ mol *p*-nitro-fenol egy perc alatti képződését 37 °C hőmérsékleten.

#### 2.1.3.2 A $\beta$ -glükózidáz aktivitásának meghatározása a felszabaduló glükóz mennyisége alapján

Amennyiben nincs speciális színes származékot képző aglikon (mint pl. a pNPG) akkor indirekt módon, a glükóz koncentráció változásának mérésével állapítható meg az aktivitás. Ebben az esetben az az enzimmennyiség felel meg 1 egységnek, amely 1  $\mu$ mol glükózt képes felszabadítani adott szubsztrátból (pl. szalicin, cellobióz, cellotrióz stb.) percenként, pH 5,0 értéken és 37 °C hőmérsékleten. Erre a módszerre elterjedten analitikai kitteket alkalmaznak.

Ha a felszabaduló D-glükózt hexokináz/glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz rendszerben határozzák meg, akkor a hexokináz közreműködése következtében keletkező glükóz-6-foszfátból és a NADP<sup>+</sup> koenzimből a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz jelenlétében keletkező NADPH koncentrációjának növekedése 340 nm hullámhosszon fotometriásan követhető [BEUTLER et al., 1974].

Glükóz analízisre más enzimeket (pl. glükóz-oxidázt) is alkalmazhatnak [SZABOLCSI, 1991]. A redukáló cukrok (pl. glükóz) koncentrációját meghatározó módszerek (pl. a 3,5-dinitro-szalicilsavas módszer) a cellobióz szubsztrát esetében nem alkalmazhatók, lévén a cellobióz is redukáló cukor.



## 2.2 Az enzimek rögzítése

Az élelmiszeripari folyamatokban alkalmazott enzimeket, az adott folyamatokra jellemző körülmények gyakran részben vagy teljes egészében inaktíválhatják. Amint már a bevezetésben utalást tettem rá az enzimek valamilyen hordozóhoz történő rögzítése (immobilizálása), számos gyakorlati előnnyel járhat. Általánosan jellemző, hogy a rögzítési eljárás hatására, a rögzített állapotban lévő enzim veszít az aktivitásából, de ez egyben az enzim aktív konformációjának a rögzülését is eredményezheti, ami az enzim stabilitását jelentősen képes növelni. Az előbb leírtak is hozzájárulnak ahhoz, hogy, a rögzített enzimek általában könnyen eltarthatók, szállíthatók és újra felhasználhatók, valamint kevésbé támadhatók a különböző mikroorganizmusok által [KLIBANOV, 1979].

A rögzített enzimek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek az oldott enzimekhez képest. Mivel elválasztásuk általában egyszerű szűréssel megvalósítható, így nem szennyezik a keletkező terméket. Elkülönítésük után újra felhasználhatók, így fajlagos költségük kisebb. A belőlük készített oszlopreaktorok jól szabályozhatók és folyamatos üzemmódban is alkalmazhatók a folyamatok így jobban kontrollálhatóak és hozam tekintetében is jelentős javulás érhető el [GODFREY & REICHELT, 1983].

A fent bemutatottak jól alátámasztják, hogy miért tudott a rögzített enzimek használata széles körben elterjedni az élelmiszeripari-, és más ipari folyamatokban [HEICHAL-SEGAL et al., 1995]. Az enzimek rögzítésével kapcsolatos kutatások és közlemények száma jelentős mértékben megnőtt az 1980-as évektől kezdődően, így még gyakorlati jelentőséggel nem, vagy csak kismértékben rendelkező enzimeket is számos esetben rögzítettek [MONSAN & COMBES, 1988]. Mivel nincs lehetőségem az összes rögzítési eljárás és hordozó típus bemutatására, ezért az áttekintés és összefoglalás csak a legjelentősebb módszerekkel és a dolgozat témájának szempontjából jelentőséggel bíró rögzítési területekkel foglalkozik.

### 2.2.1 A rögzített enzimekkel szemben támasztott általános követelmények

Az immobilizált enzimkészítményeknek alapvetően két követelménynek kell megfelelniük. A nem-katalitikus tulajdonságokon alapuló követelmények a könnyű izolálhatóságot, újrafelhasználhatóságot és megfelelő stabilitást határozzák meg, amíg a katalitikus sajátságokkal szemben támasztott követelmények a megfelelő aktivitás, produktivitás és hozam elérését jelentik. Mindezen tulajdonságok folyamatfüggők, azaz az adott reakció, szubsztrát, termék, reaktortípus

határozza meg a rögzítés alapanyagát, módszerét és annak körülményeit, ezért kiválasztásuknál mindezekre figyelemmel kell lenni [CAO, 2005].

Általános elvnek mondható, hogy azok az enzimek rögzíthetők könnyen, illetve azok vesztik el kevésbé aktivitásukat, amelyek negyedleges szerkezettel nem rendelkeznek, illetve azok, amelyek működéséhez nem kell koenzim. A biokatalizátorok rögzítésekor törekedni kell arra, hogy a működésükhöz feltétlenül szükséges kötőhelyek szabadon maradjanak.

### ***2.2.2 Az enzimrögzítés fontosabb típusai***

Az enzimek rögzítésére számos módszer ismert. Vannak olyan eljárások, amelyekben az enzimet oldott állapotban immobilizálják és maga a rögzített enzimkészítmény is oldott állapotú lesz, így csak ultraszűrő membrán használatával választható el a rendszertől. Ennél általánosabbak azonban a „tényleges” rögzítést alkalmazó eljárások, ezek között is megkülönböztetjük a kötést és a gélbezárást [WOODWARD, 1985].

Az enzim rögzítése történhet a hordozóhoz valamilyen kémiai kötéssel (adszorpciós-, ionos-, kovalens-, vagy fémes kötéssel), illetve az egyes enzimmolekulák között valamilyen bifunkciós vegyület közreműködésével. Az enzim-fehérje aminosav oldalláncai között kialakuló kovalens keresztkötéseket különböző, általában két reaktív funkciós csoporttal rendelkező kis molekulák hozzák létre (pl. glutáraldehid). Ebben az esetben nem szükségszerű külön hordozó molekula jelenléte, mivel a keresztkötésekkel térhálósított fehérje tekinthető egyben a hordozónak is.

A kombinált rögzítési eljárások meghatározott sorrendben és módon alkalmazzák a hordozót, az enzimet és a keresztkötések kialakítására szolgáló ágenst. Az egyes egységek bonyolult keresztkötéses rendszerrel kapcsolódnak össze, enzim-enzim, hordozó-hordozó kapcsolat is kialakulhat az enzim-hordozó kapcsolaton kívül [WOODWARD, 1985].

Egy enzim és egy oldhatatlan hordozó közötti rögzítés egyik legegyszerűbb és legrégebbi fajtája az adszorpciós kötődés. A módszer előnye, hogy nagyon egyszerű és nem igényel erőlyes kémiai behatásokat. Ebben az esetben az enzimmolekulák a hordozó felületén elsősorban gyenge van der Waals-erőkkel kötődnek, de a kötésben hidrogénhidak és hidrofób kölcsönhatások is részt vehetnek. Hordozóként szervetlen (aluminium, bentonit, szilikagél, üveg stb.) és szerves (cellulóz-származékok, faforgács, polimergyöngyök stb.) hordozók egyaránt használhatók. [ANDREWS & FONTA, 1989; KENNEDY & CABRAL, 1983]. Az egységnyi mennyiségű hordozóra felvihető enzimmennyiség növelése érdekében a porózus szerkezetű hordozók használata célszerű, amelyek lehetővé teszik, hogy az enzimek a hordozó belső felületén is megtapadjanak [IWASAKI et al., 1993]. A kötődés kialakítása

érdekében az általános gyakorlat szerint az enzim vizes oldatát hozzák a hordozóval érintkezésbe. Ennek négyféle kivitelezési módja ismeretes [KENNEDY & WHITE, 1985]: statikus eljárás, elektrodepozíció, adszorpció a reaktorban és adszorpció keverés és rázatás segítségével. Ugyancsak előnyös lehet, hogy egyes adszorpciós rögzítési technikák kivételt képezhetnek a biokatalizátorok rögzítését általánosan követő enzimaktivitás csökkenés alól. Az adszorpciós rögzítés gyakori hátránya, hogy a gyenge kötőerők következtében a reakció közben bekövetkező szubsztrát- és ionkoncentráció változások, illetve a hőmérséklet emelkedésének hatására könnyen deszorpció következhet be [RANI et al., 2000; DIMITRIU et al., 2003].

Az ionos rögzítés az enzim és a hordozó ellentétes töltésű csoportjai közötti elektrosztatikus vonzás révén jön létre. A kötés erősebb, mint az adszorpció esetében, de gyengébb a kovalens rögzítésnél. Ionos csoportokat tartalmazó természetes alapú (pl. cellulóz, dextrán), valamint szintetikus ioncserélőket (pl. polisztirol származékok) alkalmaznak hordozóként. Az enzimek általában nagy aktivitással rögzíthetők, emellett a módszer jelentős előnye a hordozó regenerálhatósága, hátránya viszont a kovalens rögzítéshez képest a gyengébb erősségű kötés és az idegen ionok lehetséges zavaró hatása [GODJEVARGOVA et al., 2006; JANG et al., 2000]. A rögzítési eljárás során különös figyelmet kell fordítani a megfelelő pH és ionerősség biztosítására. Olyan körülményeket kell teremteni, hogy az enzim erősen kötődjön a hordozóhoz. Ehhez az kell, hogy a fehérje felülete kellő számú, a hordozó töltéseivel ellentétes töltéssel rendelkezzen. A fehérjék az izoelektromos pontjuk (pI) alatti pH értéken kationok, a pI feletti pH értéken anionok, ennek megfelelően, a pI alatti pH értékeken kationcserélőkön, a pI feletti értékeken anioncserélőkön rögzíthetők. Az elegy pH értékét úgy kell megválasztani, hogy biztosítsa a fehérjén és a hordozón a megfelelő töltésviszonyokat. Az ionerősség megválasztásánál az az irányadó, hogy a sókoncentráció segítse stabilizálni a fehérjeszerkezetet és ezáltal a katalitikus aktivitást, de a túl magas koncentráció miatt ne szoríthassa le az enzimet a hordozó kötőhelyeiről. Az ioncserélőkként használt anyagokkal a 2.2.3.1 fejezet foglalkozik.

A legelterjedtebb módszer a kovalens rögzítés, amelyet számtalan enzim esetében használtak. A kovalens kötések keresztüli rögzítés esetében a hordozó és a biokatalizátor között megosztott elektronpár képez kapcsolatot. Ez biztosít erős kötést a biokatalizátor és a hordozó egyes funkciós csoportjai között. Olyan, széles szubsztrátkoncentráció tartományban alkalmazható, a környezet változására kevésbé érzékeny makromolekuláris katalizátor keletkezik, amely kémiai értelemben az eredeti enzim katalitikus aktivitását nagyban megőrző, új polimer vegyületnek tekinthető. Az ilyen jellegű rögzítést általában szubsztrát jelenlétében végzik és így elkerülhető a szubsztrátkötő hely, illetve az aktív hely konformáció változása, amely akár a biológiai aktivitás elvesztéséhez is vezethet. Ebbe a csoportba tartozó rögzítési eljárásokat Kennedy és White (1985) rendszerezte. A kovalens

kötések kialakításának legáltalánosabb módszerei: diazotálás, amidkötés képzése, észter kötés képzése, alkilezés és akrilezés, Schiff-bázis képzése, amidálási reakciók,  $\gamma$ -besugárzás által indukált kapcsolás.

Az ún. keresztkötéses módszer az enzim molekulák közötti intermolekuláris kovalens kötések létrehozásán alapul. Lényege hogy az egyes enzim molekulákat bi- vagy multifunkciós reagensek segítségével összekapcsolják egymással, és így nagy molekulaméretű, oldhatatlan aggregátumok alakulnak ki [ILLANES et al., 2006; JIN et al., 2006]. Keresztkötések kialakítására többek között glutáraldehidet, bisz-izocianát származékokat, N,N'-etilén-bisz-maleinimidet alkalmaznak. Ezek közül a legelterjedtebb a glutáraldehid, amely azometin (Schiff bázis) képzés közben reagál a fehérje molekulák oldalláncainak szabad amino csoportjaival, esetenként az iminokötéseket utólag kevert fémhidridekkel aminokká redukálják. Egyes esetekben az enzim aktívcentrumának konformációját érintheti az említett reakció, és ez jelentős mértékű aktivitáscsökkenéshez vezethet, ami inert fehérje (pl. szérum albumin) jelenlétével csökkenthető [WOODWARD, 1985].

A bezárás gélbe vagy membránba történhet. A legelterjedtebbek a természetes alapú gélek, mint például az agaróz, alginát, kitozán vagy karragén. Mivel a gélek pórusai nagyméretűek, így elsősorban ezeket sejtek rögzítésére használják, ugyanis a kisebb mérettel rendelkező biokatalizátorokat (pl. enzimek) nem képes a szerkezetében tartani. Kombinált rögzítés esetén azonban a gélbezárás is megfelelő eredményre vezethet [WOODWARD, 1985; BALOGH et al., 2005].

A bemutatott különböző rögzítési technikák kombinálhatóak is, így lehetővé válik az egyes módszerek hátrányának kiküszöbölése, vagy egyébként gazdaságilag és fizikai tulajdonságaiban előnyös, azonban az enzimrögzítés szempontjából kémiai felépítésében hátrányos hordozók alkalmassá tétele, megfelelő rögzített enzimkészítmények kialakításához. Ilyen, a kutatásom szempontjából is lényeges, az a kombinált rögzítési eljárás amelynek során az első lépésben az enzimet a hordozó pórusszerkezetéhez adszorbeáltatják, amely során van der Waals, ionos kötések és hidrogénhidak alakulhatnak ki a hordozó és az enzim molekulák között. Mivel ezek a kötések nem elég stabilak, ezért a rögzítési eljárás második lépésében glutáraldehydes kezelést alkalmaznak, ami egy stabilabb enzimfehérje-struktúra kialakulását eredményezi, a hordozó felületén levő enzimfehérje molekulák összekapcsolása révén [D'SOUZA & KUBAL, 2002; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; CSANÁDI, 2008].

### **2.2.3 Hordozók**

Az enzimek rögzítéséhez előnyös fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező hordozókra van szükség. Ipari szempontból lényeges, hogy ezek nagy mennyiségben, folyamatosan és lehetőleg olcsón legyenek hozzáférhetők. Reaktortöltetként való alkalmazhatóságuknál meghatározók a mechanikai

tulajdonságok (pl. nyomás- és kopásállóság), továbbá a részecskék alakja (lehetőleg gömb) és felületének jellege, illetve a fajlagos felület nagysága. Eredetüket és kémiai tulajdonságaikat tekintve a hordozók több csoportba sorolhatók. Lehetnek természetes és mesterséges eredetűek, szervetlen és szerves anyagok. Szervetlen hordozók az alumínium-oxid, az aktív szén, a nem porózus és porózus üveg, szaniterporcelán törmelék, homok,  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ , illetve magnetitszemcsék stb. A természetes eredetű szerves hordozók közül kiemelkedő jelentőségűek egyes poliszacharidok (cellulóz, dextrán, agaróz, keményítő), amelyeket általában szintetikusán módosítanak. Olcsó lignocellulóz tartalmú mezőgazdasági hulladékok is szolgálhatnak hordozóként [BOROSS et al., 2008].

Felhasználási terület alapján az enzimmögztítéshez használt hordozók nagy csoportját képi, a munkám során is alkalmazott ioncserélők csoportja, ezért a továbbiakban ez kerül bemutatásra - ezen belül is a polisztirol származékok.

### *2.2.3.1 Ioncserélők*

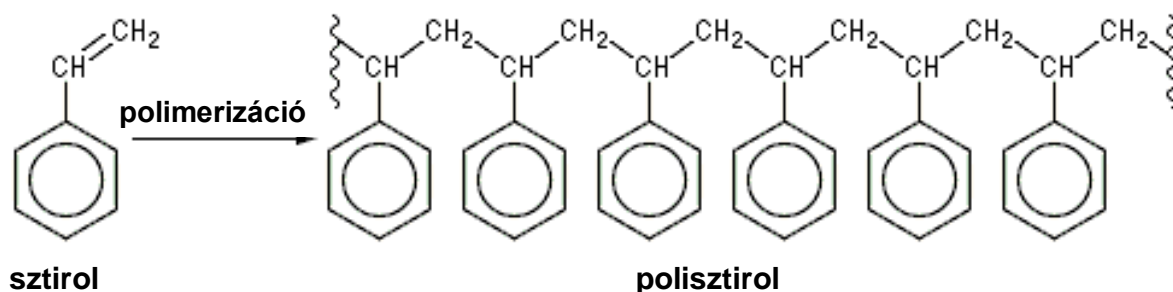
Enzimmögztítéshez különböző ioncserélők alkalmazhatók, amelyeknek két nagy csoportja van: az egyik ún. ioncserélő „gyanták”, amelyek szintetikus ioncserélők (pl. polisztirol származékok), a másik a természetes, pl. cellulóz alapú ioncserélők csoportja. Az ioncserélő gyanták vízben nem oldódó polimerek, rendszerint polisztirolok anionos vagy kationos csoportokkal. A kationos hordozók esetében  $\text{H}^+$  ion, az anionosoknál  $\text{OH}^-$  ion cserélődik a megfelelő töltéssel rendelkező molekulákra. A kationcserélők legtöbbször karboxilcsoportokat tartalmaznak. Az anioncserélők általában kvaterner ammóniumcsoportokat (pl.  $-\text{NH}_4^+\text{Cl}^-$ ) hordoznak [BOROSS et al., 2008].

Az ioncserélő gyantáknak nagy a kötőkapacitásuk és erős kötések kialakulását teszik lehetővé. Előnyük a nagy mechanikai szilárdság, a jó ülepedés és oszlopok készítésénél a nagy átfolyási sebesség, valamint a hordozó regenerálhatósága, hátrányuk viszont a rendszerben lévő különböző ionok lehetséges zavaró hatása. A cellulóz alapú ioncserélők kötőkapacitása általában lényegesen kisebb, mint az ioncserélő gyantáké (kb. egytizede) [BOROSS et al., 2008].

### *2.2.3.2 Polisztirol származékok, mint ioncserélők*

A polisztirol származékok, olyan stirol-divinil-benzol kopolimerek (2. ábra), amelyek általában ionos csoportokkal (szulfo-, karboxil- fenolos-hidroxil-, kvaterner ammónium) vannak ellátva. Képződésük gyökös- vagy ionos mechanizmussal mehet végbe, pórusméretük viszonylag kicsi,

valamint hidrofób sajátságúak. Gyöngypolimer formában kedvező mechanikai- és hidrodinamikai tulajdonságokkal rendelkeznek [BOROSS et al., 2008].



**2. ábra**

Forrás: [http://images.absoluteastronomy.com/images/encyclopediainages/p/po/polystyrene\\_formation.png](http://images.absoluteastronomy.com/images/encyclopediainages/p/po/polystyrene_formation.png)

#### **2.2.4 A rögzítés hatása az enzimek tulajdonságaira**

Az enzimek rögzítéskor rendszerint a katalitikus tulajdonságok és a stabilitás jellegzetes változásait figyelhetjük meg. A megváltozott tulajdonságok ismerete gyakorlati szempontból nélkülözhetetlen, azonban ezeknek elméleti értelmezésekor a jelenségek nagyfokú összetettsége miatt igen óatosan kell eljárni. A következőkben a teljesség igénye nélkül, a dolgozat és a gyakorlat szempontjából leglényegesebbnek tekintett hatásokat fogom bemutatni.

##### **2.2.4.1 A rögzítés hatása az enzimek katalitikus tulajdonságaira**

A rögzített enzimek kinetikai állandói általában eltérnek a natív, oldott forma kinetikai állandóitól. Ezt az alábbi tényezőkre lehet visszavezetni [BALLESTEROS et al., 1994]:

- Konformációs hatások, amelyek az enzim aktív centrumában elhelyezkedő aminosav-oldalláncok módosulását is jelenthetik,
- Térbeli hatások, mikor az enzim és a szubsztrát kölcsönhatását térbeli gátlások akadályozzák,
- Megoszlási hatások, amelyek megváltozott mikrokörnyezetet hozhatnak létre a kis molekulatömegű molekulafajták elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatásai révén,
- Anyagátviteli vagy diffúziós hatások, amelyek felléphetnek a szubsztrátnak a külső oldatból az aktív helyhez történő jutásával szemben, valamint a reakcióterméknek a külső oldatba történő diffúziójával szemben. Ezeket a diffúzióval szembeni ellenállásokat a következőképpen lehet osztályozni:

- a szemcséken belüli anyagátviteli hatások, amikor az enzim porózus közegben helyezkedik el (pl. porózus szerkezetű anioncserélő gyanta),
- külső- vagy részecskék közötti anyagátviteli hatások, amelyek a külső oldat és a rögzített enzimrészecske külső felülete között lépnek fel.

A rögzítésnek a katalitikus tulajdonságokra gyakorolt és megfigyelhető változásai a fent említett tényezők kölcsönhatásai eredményeként jönnek létre. Az egyes tényezőknek a változásokhoz való hozzájárulását nehéz meghatározni. A felsorolt hatások miatt különbséget kell tenni az enzimreakciók valódi, azaz a natív, oldott enzimre jellemző sebességi paraméterei, és a rögzített enzimekre diffúziós korlátok nélkül jellemző, és a diffúziós korlátok esetén megfigyelhető, effektív sebességi paraméterek között [ENGASSER & HORVÁTH, 1976].

Irodalmi adatok szerint adszorpcióval történő rögzítés esetében nem kell konformáció változással számolni, és ezért nagyban vagy teljes egészében megőrizhető az enzim aktivitása, bár ez elméleti szempontból a felületi denaturáció lehetősége miatt vitatható. Porózus hordozók esetén a diffúzió okozhat problémát [HARTMEIER, 1988]. Ionos rögzítéskor hasonló a helyzet, de az ionos mikrokörnyezet és az erősebb kölcsönhatások aktivitás csökkenéshez vezethetnek.

A rögzítési eljárások hatást gyakorolhatnak az enzimek konformáció változásán túlmenően az ionizációs állapotra, disszociáció erősségére és várhatóan megváltozik a pH-nak a katalitikus aktivitásra kifejtett hatása is. Hozzájárul ehhez az is, ha a hordozó töltésekkel bír. Ez önmagában is az enzim kinetikus tulajdonságainak a megváltozásához vezethet még akkor is, ha nincsenek anyagátviteli korlátok [BALLESTEROS et al., 1994]. Ionos hordozóba zárt vagy ionos hordozóhoz kötött enzimek esetében a rögzített enzim mikrokörnyezetében eltérő a  $H^+$  ion koncentrációja a külső oldatban, az ún. makrokörnyezetben mért  $H^+$  ion koncentrációhoz képest. Polianionos környezetben a  $H^+$  ion koncentráció nagyobb, polikationos mikrokörnyezetben pedig kisebb a külső oldathoz képest. Ennek megfelelően, lúgos vagy savas irányú eltolódás észlelhető a katalitikus aktivitás pH optimumában [GOLDSTEIN & KATCHALSKI-KATZIR, 1976].

Az enzimek által katalizált reakciók hőmérséklet függése is összetett jelenség. Egyrészt a hőmérséklet emelése megnöveli a reakciósebességet, másrészt az enzimmolekulák katalitikusan aktív konformációja a fokozott hőmozgás hatására megbomlik, a rendezett „gombolyag” rendezetlenné válik. A rögzítés hatására megváltozhat a katalitikus reakció aktiválási energiája és az enzim hőstabilitása. E két tényező eredőjeként változhat a látszólagos hőmérséklet-függés. Magasabb lehet az optimális hőmérséklet a hordozóba bezárt és a porózus hordozón rögzített enzimek esetében is, mert a diffúziós hatások védik az enzimet a hődenaturációval szemben [BALLESTEROS et al., 1994]. Megnövekedett hőtűrést lehet észlelni az ionos vagy kovalens kötéséken keresztüli rögzítésnél is. Ebben az esetben a

konformációváltozások és a térbeli gátlások játszanak fontos szerepet a hőmérséklet emelésével szembeni megnövekedett tűrőképességben [MARSH, 1973].

A szilárd fázisú hordozón történt rögzítés általában nem befolyásolja mélyrehatóan a szubsztrátspecifitást, kisebb eltérések –elsősorban térbeli okok miatt– azonban kimutathatók. Adszorbeált, illetve ionosan kötött enzimek esetében kismértékű változást észleltek a szubsztrát- és az inhibitorspecifitásban [ZABORSKY, 1974]. A rögzítés továbbá befolyásolhatja az enzimeknek a makromolekuláris szubsztrátokkal szembeni viselkedését is, mivel megváltozik a szubsztrát hozzáférhetősége a rögzített enzim molekulákhoz [BOROSS et al., 2008].

#### *2.2.4.2 A rögzítés hatása az enzimek stabilitására*

A biokatalizátorok gyakorlati alkalmazhatóságának egyik fontos kritériuma az alkalmazás körülményei közötti ellenálló képességük, azaz stabilitásuk. Gyakorlati szempontból a hőstabilitás, pH stabilitás, szerves oldószerekkel szembeni stabilitás, tárolási stabilitás és a működési stabilitás a legjelentősebb tulajdonsága a biokatalizátoroknak. A rögzített enzimek stabilitása függ az enzim szerkezetétől, a rögzítés módjától és az alkalmazás körülményeitől. A legtöbb irodalmi adat a rögzítés stabilitásnövelő hatásáról számol be, de ebben szerepet játszhat, hogy a negatív eredményeket általában nem publikálják.

Bár a rögzített enzimek hőstabilitása nyilvánvalóan függ az alkalmazott rögzítési eljárástól és magától az enzimtől, általában megállapítható, hogy a hidrofíl hordozók javítják, a hidrofób karakterű hordozók pedig rontják a hőstabilitást [GOLDSTEIN & KATCHALSKI-KATZIR, 1976; ZABORSKY, 1974]. Gélbezárt enzimeknél a bezáró közegtől függően a hőstabilitás általában nő vagy változatlan marad. Kedvező stabilitást mutatnak a mikrokapszulázott enzimek. Adszorpcióval vagy ioncserével rögzített enzimek hőstabilitása nőhet, csökkenhet vagy változatlan maradhat az oldott enzim hőstabilitásához viszonyítva. Kovalensen rögzített enzimek esetében nagyszámú adat ismeretes a megnövekedett hőstabilitásra vonatkozóan, de ismeretesek példák a csökkenő ellenállóképességre is [GOLDSTEIN & KATCHALSKI-KATZIR, 1976].

A pH stabilitás alatt a hőinaktiválódás pH függését értjük. A pH jelentősen hat az inaktiválódásra. Mivel a pH befolyásolja a fehérjék másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezetét, az enzimek inaktiválódásának sebessége a legtöbb esetben nagyban függ az oldat pH értékétől [DIXON & WEBB, 1979]. A rögzítésnek a katalitikus aktivitásra kifejtett hatásaihoz hasonlóan, a pH stabilitásnál is számítani kell a mikrokörnyezeti hatásokra, így a külső közeg és a hordozó belseje



közötti egyenlőtlen ioneloszlásra. Általában az oldott enzim maximális stabilitását biztosító pH értékhez képest jelentős eltolódások figyelhetők meg savas vagy lúgos irányban [ZABORSKY, 1974].

A víz helyettesítése szerves oldószerekkel a katalitikus aktivitás drasztikus csökkenéséhez és a szubsztrátspecifitás elvesztéséhez vezethet. Ennek egyik oka az enzim molekulák aggregációja lehet. A másik ok az aktív konformáció elvesztése. A konformációváltozás megakadályozható az enzim molekula rögzítésével, amely merevebbé teszi a szerkezetet. Történhet a rögzítés olyan hordozón is, amely részlegesen kizárja a szerves oldószert. Ha az enzim több ponton kötődik a hordozóhoz, ez megvédi a szerves oldószerek által okozott inaktíválódástól [KLIBANOV, 1979].

A rögzítés általában kedvezően befolyásolja egy enzim tárolási stabilitását, amelynek mértéke függ az alkalmazott rögzítési módszertől és a tárolás körülményeitől. A rögzített enzimeket általában 0-4 °C hőmérsékleten tárolják, szobahőmérsékleten a tárolási stabilitás jelentősen csökken. Adszorpcióval vagy ionos kötésekkel rögzített enzimek stabilitása kedvezőtlenebb, mint más módon rögzített enzimeké. Kovalens kötésekkel rögzítés általában javítja a tárolási stabilitást. Ugyancsak kedvező tárolási stabilitást mutatnak a keresztkötéssel rögzített enzimek [BOROSS et al., 2008].

A rögzített enzimek működési stabilitása meghatározó jelentőségű a gyakorlati alkalmazás szempontjából. A szilárd fázisú biokatalizátorok működési stabilitását lehetetlen megbecsülni a hőstabilitásra és a tárolási stabilitásra vonatkozó adatok alapján. Ennek oka, hogy mind a szubsztrátnak, illetve a koenzimnek (amennyiben szükséges), mind pedig a terméknek lehet stabilizáló hatása biokatalizátorra. Általánosságban elmondható, hogy a rögzítési eljárásnak pozitív hatása van az enzim működési stabilitására [BOROSS et al., 2008; SIMON et al., 1986; SIMON et al., 1992], azonban ettől eltérő eredményeket is megfigyeltek már [CABRAL et al., 1981; MAEDA et al., 1973].

### **2.2.5 A $\beta$ -glükózidáz rögzítése**

A korábban bemutatott legfontosabb rögzítési eljárásokat már mind alkalmazták  $\beta$ -glükózidáz esetében, így az irodalomban sok példa található mind adszorpció (szilikáton, kaolinon, kitozánon, stb.), mind keresztkötéssel (glutáraldehid, stb.) mind pedig kovalens kötéssel kialakított rögzítési módszerre, illetve ezek kombinációjára [BROUN et al., 1973; RAVET et al., 1993]. A  $\beta$ -glükózidáz rögzítésének irodalmából a teljesség igénye nélkül, a dolgozat szempontjából is jelentőséggel bíró, néhány ipari és borászati felhasználásra létrehozott rögzített enzimkészítmény, valamint a legfontosabb eljárásokkal előállított készítményekből kerül néhány bemutatásra.

A cellulóz enzimatiskus hidrolízisekor, a  $\beta$ -glükózidáz által katalizált folyamat gazdasági paramétereinek javítása céljából, adszorpcióval kaolinon és szilikagélen végeztek immobilizálási kísérleteket. A kaolinhordozó azonban olcsóbbnak és technológiai szempontból előnyösebbnek bizonyult. A kezdetben felvitt  $\beta$ -glükózidáz 95 %-a rögzült kaolinon és nem tapasztaltak jelentős aktivitás veszteséget, viszont lényeges deszorpció következhet be az ipari folyamatokban, amit az oldott enzimpreparátum előzetes acetilezésével csökkentettek sikeresen 75 %-ról, 25 %-os deszorpciós arányt érve el [KARAGULYAN et al., 2008]. Gargouri és munkatársai szintén az adszorpciós rögzítés lehetőségét vizsgálták különböző hordozók felhasználásával: Amberlite (IRA 67, XAD 4, XAD 7), Duolite (A 7 és A 58), Celite 545 és DEAE-sepharose, olyan  $\beta$ -glükózidáz enzim esetében, amelyet *Sclerotinia sclerotiorum* törzsből izoláltak. A szerzők hidrolitikus folyamatokban az enzim stabilitásának növekedését tapasztalták azokban az esetekben, amikor az enzim az Amberlite ioncserélő gyantákhoz lett rögzítve. A legnagyobb rögzített enzimaktivitás viszont a DEAE-sepharose alkalmazása esetén volt megfigyelhető [GARGOURI et al., 2004]. A szerzők azonban nem vizsgálták a készítmények működési stabilitását, pedig ez a tulajdonság az adszorpciós rögzítés esetén különösen nagy jelentőséggel bír.

Egy továbbfejlesztett adszorpciós eljárással enzim-szilikát gél alakítottak ki. A tetra- és trialkoxi alkil-szilánok megfelelő szol-gél prekursorokként szolgálhatnak. Az enzimoldatot részlegesen hidrolizált szol-gél prekursorokkal való összekeverése hatékony rögzítési eljárásához vezethet. A mechanikailag stabil, üvegszerű gél nagy megőrzött enzimaktivitást képes magába zárni. Az így előállított készítmény kapcsán a szerzők több olyan előnyös tulajdonságot is azonosítottak, amelyek az általánosan alkalmazott rögzítési eljárással nem érhetők el, valamint nagymértékben csökkenthető a diffúzió és a kiszivárgás okozta enzimveszteség. A bemutatott technikával előállított enzimműködési hőinaktiválódási sebességében akár két nagyságrendnyi csökkenés is megfigyelhető [HEICHAL-SEGAL et al., 1995].

Különböző termelő szervezetekből (*Pseudomonas picketti*, *Aspergillus niger*) származó mikrobiális  $\beta$ -glükózidáz enzimeket rögzítettek sikeresen kalcium-alginát gélbe való bezárási technikával [BUSTO et al., 1994]. Az így előállított rögzített enzimműködési készítmények alkalmasnak bizonyultak a cellobióz hidrolízisére való felhasználásban, azonban ilyen esetben számolni kell a kiszivárgás okozta enzimveszteséggel [WOODWARD & CLARKE, 1991]. Ennek a technikának a továbbfejlesztési lehetőségeként az enzimet először rövid ideig glutáraldehiddel kezelték, hogy a megfelelő méretű aggregátumok létrehozása révén megakadályozzák vagy csökkentsék a gélből való kiszivárgás lehetőségét. 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  $\beta$ -glükózidázt még glutáraldehiddel kezelték, s így a biokatalizátort a sol-gél mátrixban tartották a folyamatos reakció közben [O'NEIL et al., 2002]. Ennek a technikának egy másik lehetséges változata mikor a gélbezárás (kálcium-alginát) során keresztkötő ágensként nem az általánosan alkalmazott glutáraldehidet, hanem genipint alkalmaztak [FUJIKAWA et al., 1988]. A szerzők úgy találták, hogy a genipin alkalmazása esetén magasabb rögzített enzimaktivitás érhető el, mint egyéb keresztkötő reagensek (glutáraldehid, EDC) esetén, és a készítmény aktivitás értékében 12 felhasználási cikluson keresztül nem volt csökkenés tapasztalható.

Gallifuoco és munkatársai – több lépéses folyamatban – kitozánon rögzítettek  $\beta$ -glükózidázt glutáraldehydes keresztkötések kialakításával. Optimális működési feltételeket biztosítva vizsgálták a rögzítés hatásfokát, a stabilitást, aktivitást és a glükóz, valamint az alkohol gátló hatását. A szerzők sikerrel alkalmazták a rögzített enzimet a borkészítés során a bor aroma értékének javítására [GALLIFUOCO et al., 1998].

Gueguen és munkatársai borok aromaprofiljának javítására használtak fel a Duolit A-568 gyantára adszorpcióval rögzített  $\beta$ -glükózidázt, amely aktivitásának jelentős részét megtartotta. Laboratóriumi reaktorkísérletek során nem tapasztaltak jelentős enzimleoldódást és a készítmény a kezelés végéig megtartotta az aktivitását [GUEGUEN et al., 1997]. Ez ellentétben áll más kutatók [GÜNATA et al., 1990; COLAGRANDE et al., 1994] eredményeivel, miszerint a borok aromaanyagainak felszabadítását katalizáló enzimeknek nem kedvez a bor mátrixának összetétele és az ipari felhasználás körülményei.

Spagna és munkatársai a  $\beta$ -glükózidázt egy enzimkomplex részeként kitozán hordozóhoz rögzítették, glutáraldehydes keresztkötések segítségével a bor-, és gyümölcsle iparban történő lehetséges felhasználás érdekében. Zselatin és szilikagél hozzáadását követően jelentős mértékben javult a fizikai, mechanikai tulajdonsága az enzimműködésnek, emellett nőtt az alkalmazáskor mért stabilitás, valamint a ténylegesen rögzült enzimmennyiség, így csökkent az enzim kioldódása a preparátumból [SPAGNA et al., 2002]. Hasonló eljárást alkalmaztak Chang és Juang, mikor  $\beta$ -glükózidázt rögzítettek kitozánhoz és agyag elegyből álló kompozithoz glutáraldehydes keresztkötések segítségével. Az agyagot is tartalmazó hordozó esetében itt is a készítmény fizikai és mechanikai tulajdonságainak, továbbá a működési stabilitásának javulását tapasztalták, valamint megállapították, hogy az így előállított készítmény szélesebb hőmérséklet és pH tartományban mutat magasabb aktivitást, mint a hagyományosan csak kitozán alkalmazásával létrehozott készítmény [CHANG & JUANG, 2007].

A korábbi Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Kémia és Biokémia Tanszékén, két elnyert OTKA pályázat keretén belül, részben Dr. Kosáry Judit vezetésével már az 1990-es évek elejétől kezdve részletes tanulmányokat végeztek az aminoaciláz enzim rögzítésével kapcsolatban. A kutatás során a Reanal cég által korábban előállított Akrilex C-100 hordozót alkalmazták. Az Akrilex C-100 hordozó előállítása során a poliakrilamidban savamid csoportok egy része hidrolizálásra kerül. A karboxil csoportjainak köszönhetően ez a hordozó messzemenőleg alkalmas az enzimek karbodiimides módszerrel való kovalens rögzítésére [SZAJÁNI et al., 1980a]. Az Alkalmazott Kémia Tanszéken ezt a módszert az irodalomban elsőként alkalmazták többek között mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -glükózidáz rögzítésére [KOSÁRY et al., 1998]. Később ezt a rögzítési technikát tökéletesítették [BALOGH et al., 2004], majd preparatív alkalmazását kiszélesítették [BALOGH & KOSÁRY, 2005].

A Surface layer vagy másnéven S-layer (felületi réteg) olyan kétdimenziós, kristályos vagy szemikristályos szerkezetű, fehérjék vagy glikoproteinek által felépülő egyrétegű képződmény, amelyet egyes baktériumok a sejtfalhoz kötött formában szintetizálnak [SLEYTR, 1986]. Ahhoz, hogy képesek legyenek más enzimekkel vagy fehérjékkel kötéseket kialakítani, a felületi rétegben elhelyezkedő aminosav oldalláncok szabad amino- és karboxilcsoportjait aktiválni szükséges.

Az irodalomban főként csak olyan kutatási eredmények találhatók, ahol lipidekben gazdag molekulákat kapcsoltak a felületi réteghez [WEYGAND et al., 2000], vagy funkcionizált lipidmembránok stabilizációjához hordozónak használták az S-layert, azonban enzimek rögzítésére való felhasználással kapcsolatban igen kevés adat található.

Az Alkalmazott Kémia Tanszéken korábban vizsgálatokat végeztek a *Bacillus stearothermophilus* PV72 törzsből izolált, csak fehérjéből felépülő felületi rétegre történő rögzítéssel kapcsolatban. A térhálósított felületi réteghez korábban karbodiimides módszer segítségével rögzítettek fehérjéket [WEBER et al., 2001]. A tanszéken alkalmazott karbodiimides rögzítési módszer helyett egy új, szokatlanul egyszerűnek tűnő, a koimmobilizáláshoz hasonló metodikával, eljárást dolgoztak ki a  $\beta$ -glükózidáz felületi rétegre történő rögzítéséhez. Borászati felhasználás céljából a készítményt alginát gélbe zárták [BALOGH et al., 2005].

## 2.3 Enzimmészítmények alkalmazása az élelmiszeriparban

Az élelmiszertechnológiában az enzimek fontos szerepet töltenek be. Egyrészt hatékonyságukat régóta felhasználjuk sok élelmiszer (kenyér, sör, ecet, szalámi, sajt stb.) előállításához, másrészt meg

kell akadályoznunk a működésük következtében fellépő romlási folyamatokat (gyümölcsök és zöldségek barnulása, zsírok avasodása, húsok rothadása stb.) [GASZTONYI & LASZTITY, 1992].

Elsőként alkalmazott ipari enzimek az amilázok (keményítőt hidrolizáló enzimek), valamint a szintén szénhidrátbontó invertáz enzim és a fehérjebontó proteázok voltak. Ipari szempontból a legjelentősebbek a proteázok, a detergens-, a mosószer-, illetve a tejiparban alkalmazzák őket [AUNSTRUP, 1979]. Emellett ipari szempontból nagy jelentőséggel bírnak még az amilázok és az amiloglikozidázok, mivel a felhasználásukkal történő keményítő-hidrolízis nagyon jelentős ipari felhasználást jelent. Napjainkban egyre nagyobb jelentőséggel bír az izocukor előállítása során alkalmazott glükóz-izomeráz enzim, amelyet általában a keményítőből egyensúlyi reakcióban előállított D-glükóz, D-fruktózzá való részleges izomerizációjára használnak. Az eljárás előnye, hogy a fruktóz édesebb, mint a glükóz és egészségügyi szempontból is előnyösebb.

Az élelmiszeriparban egyre több technológiai folyamatban alkalmaznak rögzített enzimeket, ezek között számos hidroláz található. Mint más iparágak is, az élelmiszeripar is felhasználja a szilárd fázisú biokatalizátorokat, mint egyes technológiák részét, a minőségjavítás, illetve a kihozatal növelésének eszközt. Ipari felhasználás esetén is a rögzített enzimek alkalmazásának számos előnye lehet az oldott enzimekkel szemben: az ismételt felhasználhatóság révén kisebb költség, az esetek jelentős részében az enzim megnövekedett stabilitásával lehet számolni, megfelelően megtervezett és jól ellenőrizhetően működő bioreaktorban való alkalmazhatóság, különböző katalitikus hatású enzimek meghatározott sorrendben való alkalmazhatósága többlépéses folyamatokban, az enzim a reakció végén nem szerepel a reakcióelegy szennyezői között. Ezért többek közt a gyümölcslégyártásban és borászatban is előnyös lehet a rögzített enzimek alkalmazása, mert ezáltal elkerülhető az idegen fehérjék bevitel [MARTINO et al., 1995]. A szilárd fázisú biokatalizátorok ipari alkalmazhatósága szempontjából az alábbi tényezők a legfontosabbak [CHIBATA et al., 1987]: a rögzítéshez alkalmazott hordozó és reagensek ára, a rögzített biokatalizátor aktivitása, a rögzített biokatalizátor működési stabilitása és az elhasznált biokatalizátor regenerálhatósága.

### ***2.3.1 Hidrolázok alkalmazása az élelmiszeriparban***

Az élelmiszeriparban az alkalmazott enzimek jelentős részét a hidrolázok teszik ki. A hidrolázokat széleskörűen alkalmazzák más iparágakban is, legelterjedtebben: a mezőgazdaságban (pl. mezőgazdasági nyersanyagok biokonverziója), a gyógyszeriparban (pl. különböző szteroid transzformációk) és a szerves vegyiparban (pl. szennyvízkezelés, bioszenzorok, stb.) [CRUEGER & CRUEGER, 1987]. A hidroláz enzimek élelmiszeripari felhasználásának, és az ezekhez kapcsolódó

rögzítési eljárásainak számos példája ismert, ezért a következőkben csak a dolgozat szempontjából lényeges, és néhány fontosabb alkalmazás kerül bemutatásra.

A hidrolázok egyik lehetséges felhasználása lehet a már kész élelmiszerek, illetve alapanyagok minőségjavítása is, például a  $\beta$ -glükózidáz használata a borászatban előnyös lehet az aromaanyagok felszabadítása kapcsán [GUEGUEN et al., 1997]. A  $\beta$ -glükózidáz enzim ilyen irányú felhasználhatóságával és rögzítésének lehetőségeivel a 2.3.2.2 fejezetben fogok foglalkozni. Különböző célokra az üdítőital-iparban pektináz enzimkészítményeket használnak. Ezek általában legalább hat féle pektinázt tartalmaznak, amelyek a pektin molekula hidrolízisében vesznek részt, annak különböző helyein való bontásával. A pektinbontó enzimek rögzítését már a 80-as években többen leírták, többek közt PIFFERI és munkatársai (1989), de a tapasztalatok szerint ezen készítmények kihasználhatóságát több tényező is megakadályozza. Enzimek segítségével továbbá befolyásolható a termények íz-, szín-, állomány, illetve beltartalmi érték változása is [CRUEGER & CRUEGER, 1987].

Hidrolitikus úton, amilázok segítségével gyártható az izocukor a keményítőből. A keményítőbontás során szerepet játszó enzimek:  $\alpha$ -amiláz,  $\beta$ -amiláz, glükoamiláz, pullulanáz, mindegyikére létezik több kidolgozott rögzítési eljárás [DEY et al., 2003; BRENA et al., 1993; D'SOUZA & KUBAL, 2002], azonban ezen enzimek koimmobilizálására is találhatunk irodalmi adatokat [PATIL & PATIL, 2000; PARK et al., 2005]. A glükózt, amelyből fermentációval nyerik az alkoholt a bioüzemanyagok előállításához, a cellulóz, cellulázzal (pl. *Trichoderma* eredetű) és általában *Aspergillus*  $\beta$ -glükózidázzal végrehajtott lebontásával állítják elő [CRUEGER & CRUEGER, 1987]. Ebben az esetben, csak úgymint a söriparban, az alkohol fermentációjához használt – általában – *Saccharomyces cerevisiae* sejtek rögzítésének van ipari jelentősége, amelyre számos példa található az irodalomban [DE BARI et al., 2004; TAHERZADEH et al., 2001; NAVRATIL et al., 2000].

### **2.3.2 A glükózidázok élelmiszeripari felhasználása**

A munkám szempontjából elsősorban a  $\beta$ -glükózidáznak volt jelentősége, így a továbbiakban ennek az élelmiszeripari felhasználási lehetőségeit fogom bemutatni, azonban nem szabad elfelejteni, hogy az élelmiszeriparban a glükózidázok közül kétségtelenül az amilázok és a glükoamilázok segítségével történő keményítő-hidrolízis, valamint a cellulózból cellulázzal végrehajtott glükóz-előállítás a legfontosabb.

### 2.3.2.1 A $\beta$ -glükózidáz enzimkészítmények hidrolitikus alkalmazása az élelmiszeriparban

Általánosan elmondható, hogy a különböző eredetű  $\beta$ -glükózidázok élelmiszeripari felhasználása (a borászati alkalmazástól eltekintve) kiegészítő jellegű. A cellulóz hidrolízisére alkalmazott mikrobiális rendszerek ugyanis, általában magas endo- és exocelluláz aktivitásúak, viszont számottevő  $\beta$ -glükózidáz aktivitással nem rendelkeznek. Ezért a  $\beta$ -glükózidázt célszerűen rögzített állapotban, kívülről kell a rendszerbe juttatni cellobióz hatékony lebontása érdekében [BUSTO et al., 1994]. Amennyiben viszont a cél a biofuel előállítása, akkor a glükóz fermentációjára szolgáló élesztőt és a  $\beta$ -glükózidáz enzimet együtt rögzítve folyamatos rendszerben használják [LEE et al., 1983].

A glükóz alifás alkoholokkal képzett *O*-glikozidjai a nem ionos, felületaktív anyagok egyik nagyon fontos csoportját képezik, amelyek ráadásul nem is toxikusak és biológiailag lebonthatók. Mivel közülük néhányat nemcsak a gyógyszeriparban, hanem az élelmiszeriparban is sikeresen alkalmaznak detergensként, ezért szintézisük glükózidázok katalizálta reverz hidrolitikus folyamatokkal, azaz szerves oldószeres közegben végrehajtott kapcsolási reakcióval élelmiszeripari jellegűnek is tekinthető [BALOGH et al., 2004]. Az Alkalmazott Kémia Tanszéken a rögzített  $\beta$ -glükózidázt szerves oldószeres közegben, az élelmiszeriparban is felhasználható felületaktív anyagok, *O*-glikozidok előállítására is használták kapcsolási reakcióban (reverz hidrolízissel) [BALOGH & KOSÁRY, 2005]. Eredményeik különös jelentőséggel bírtak, ugyanis nem az alkohol volt az elsődleges oldószer, ezért olyan glikozidok is előállíthatók voltak, amelyek hidroxil vegyülete nem használható oldószerként (pl. fenol). Ezzel az eljárással preparatív léptékben állítottak elő glikozidokat.

### 2.3.2.2 A $\beta$ -glükózidáz enzimkészítmények hidrolitikus alkalmazása borászatban

A hidrolitikus (enzimes) eljárások egyre nagyobb szerepet kapnak az általánosan alkalmazott kémiai kezelések mellett, a borokban az aromaanyagok koncentrációjának növelésében, azaz aromaprofiljának javításában. A  $\beta$ -glükózidáz enzim hidrolitikus aktivitásának meghatározó jelentősége van az aromaanyagok felszabadítása kapcsán, ugyanis a borokban az aromaanyagok többsége alkoholos hidroxilcsoportot tartalmaz, de túlnyomó részben nem illékony formában, hanem  $\beta$ -glikozidos kötésben. Mivel a borok természetes  $\beta$ -glükózidáz aktivitása jelentéktelen, ezért kívülről bevitt  $\beta$ -glükózidáz alkalmazása szükséges. Végeztek már kísérletet, amelyben az aromaanyagok felszabadítását savas hidrolízissel kívánták végrehajtani, azonban az enzimet alkalmazó módszerrel ellentétben az eljárás nagymértékben megváltoztatta a termék természetes aromaprofilját [GUEGUEN et

al., 1997]. A kívülről bevitt  $\beta$ -glükózidáz enzim alkalmazásának előnye, hogy csak specifikusan az aromaprofílt képző és kialakító hidroxil vegyületeket szabadítja fel [GÜNATA et al., 1985].

A mustban jelenlevő terpénalkoholok túlnyomó többségben inaktívak (az aromakarakter szempontjából), ugyanis glükózidos kötésben vannak. A szőlő aromapotenciál, must és a bor vizsgálatai során azt is megállapították [GÜNATA et al., 1985], hogy eredetileg az aromaprofílt meghatározó vegyületek jelentős része glikozid formájában van jelen a szőlőbogyó héjában. A kipréselt must 1 % arányban tartalmaz csak szabad illatkomponenseket [CORDONNIER et al., 1986]. Az aromaprofílt a szabad (illékony) és kötött (nem illékony) aromavegyületek összessége alakítja ki [WILLIAMS et al., 1983]. A zöld szövetek az aromaanyagok forrásai, ahol glikozidok formájában keletkeznek, és transzportálódnak a gyümölcsbe vagy a virágba. Első lépésként az  $\alpha$ -arabinofuranozidáz és  $\alpha$ -ramnozidáz aktiválódik, amelynek hatására elérhetővé válnak azok a glükózidok, amelyek szubsztátumként szolgálnak a  $\beta$ -glükózidáz enzim számára. Ennek hatására a  $\beta$ -glükózidáz enzim aktiválódik és felszabadítja az aglikont a cukor-aromavegyület közötti glikózidos kötések hidrolizálása által [WILLIAMS et al., 1983; SHOSEYOV et al., 1990].

Amennyiben az erjesztést számottevő  $\beta$ -glükózidáz aktivitással rendelkező élesztővel végzik, vagy ha az erjedésben lévő vagy már kierjedt borhoz  $\beta$ -glükózidáz enzimmészítményt adagolnak, akkor az aromaanyagok felszabadítása nagymértékben meggyorsítható. Ezért több olyan kísérletet is végeztek már, ahol hozzáadott  $\beta$ -glükózidáz enzimet alkalmaztak a muskotályos borok aromaprofíljának a javítása érdekében [SHOSEYOV et al., 1990; CABAROGLU et al., 2003]. A borok utólagos aromaprofíljának módosítása tehát csak közvetlen módon bevitt  $\beta$ -glükózidáz enzimmel lehetséges. Amint már korábban is említettem a natív enzim alkalmazása nem kívánatosan megnöveli a kezelt bor fehérje tartalmát, ezért az enzimet szinte kizárólag csak rögzített formában alkalmazták [GALLIFUOCO et al., 1998]. Ipari eljárást is kidolgoztak már, amelynek során azt találták, hogy a rögzített enzimek használata gazdaságosabb lehet, a könnyebb eltávolíthatósága és újrafelhasználhatósága kapcsán [GALLIFUOCO et al., 1999].

Mint korábban említettem már Gallifuoco és munkatársai kitozánon rögzítettek  $\beta$ -glükózidázt glutáraldehides térhálósítás segítségével. Ennek során vizsgálták a rögzítés hatásfokát, a stabilitást, aktivitást és a glükóz, valamint az alkohol gátló hatását, az általuk optimálisnak választott körülmények között. A borkészítés és a bor aroma értékének javításában hatékonynak bizonyult az előállított rögzített enzimmészítmény [GALLIFUOCO et al., 1998].



GUEGUEN és munkatársai *Candida molischima* 35M5N élesztőből származó  $\beta$ -glükózidáz enzimet rögzítettek ioncserélő Duolit A-568 hordozón, muskotályos bor aromaminőségének a javítás érdekében. Töltött ágyas és fluidágyas reaktorokkal végzett kísérletekben is igazolták, hogy mind a költségek csökkentése, mind pedig a bor minőségének javítása szempontjából kedvező lehet a rögzített enzim alkalmazása a borászatban [GUEGUEN et al., 1996]. A szerzők a rögzített enzimmel végrehajtott kezelés idejének a hatását is vizsgálták (1-9 óra között). Az általános elvárások szerint a leghosszabb kezelési idő esetében tapasztalták a legjobb eredményt. Azt, hogy az enzim aktivitása alkohol jelenlétében fokozódott és az aktivitásának a pH optimuma 3,5 volt, az enzim gomba eredetének tulajdonították [GUEGUEN et al., 1997].

A magas glükóz koncentráció gátolhatja az enzim működését (katabolit represszió), ezért az enzimes kezelést a bor aromaprofiljának a javítása érdekében, mindenképpen csak a fermentáció utolsó szakaszában vagy utána érdemes elvégezni, mert ekkor a glükózkoncentráció már kellően alacsony. Az etanol szintén gyakorolhat aktivitáscsökkentő hatást az enzimre [GALLIFUOCO et al., 1998]. A magasabb etanol tartalom kétféle módon képes csökkenteni a  $\beta$ -glükózidáz aktivitását. Egyfelől direkt módon képes inaktiválni az enzimet, másrészt pedig a rögzített enzimmészítményt károsíthatja a szilárd hordozó szerkezetének a módosításán keresztül [PEMBERTON et al., 1980]. Ennek ellenére a kísérletek azt igazolták, hogy a *Trichoderma reseei* eredetű  $\beta$ -glükózidáz aktivitását 8 %(m/V) alkoholtartalom kis mértékben növelni tudta [PEMBERTON et al., 1980]. Abban az esetben is vizsgálták az etanol koncentráció hatását [3-12 %(V/V)] az enzimaktivitásra, amikor mikrobiális eredetű  $\beta$ -glükózidáz enzimet rögzítettek kitozánra, és nem tapasztaltak csökkenést a rögzített enzim aktivitásában [GALLIFUOCO et al., 1999].

Jenadet és munkatársai a rezveratrol koncentráció változásának a tükrében vizsgálták az  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükózidázos kezelés hatását vörösborokban. A vártak megfelelően azt tapasztalták, hogy az  $\alpha$ -glükózidáz nem befolyásolta a rezveratrol koncentrációját, azonban a  $\beta$ -glükózidáz hozzáadását követő 24 órában a rezveratrol koncentráció számottevően megemelkedett [JENADET et al., 1994]. Arra vonatkozóan is végeztek kísérleteket, hogy a  $\beta$ -glükózidáz enzim nagy mennyiségben (aktivitással) való alkalmazása, hogyan befolyásolja az antocianin színanyagokat [BLOM, 1983]. A szerző azt tapasztalta, hogy az enzim ilyen módon való alkalmazása károsítani képes a színanyagokat, azonban ennek okát nem magyarázta. Feltételezhetően az enzim a polifenolos színanyagok glükozidjait is részben hidrolizálta.

Az Alkalmazott Kémia Tanszéken a 2.2.5 fejezetben bemutatott, felületi réteghez rögzített, majd alginát gélbe zárt  $\beta$ -glükózidáz készítményt eredményesen használták egyes borok néhány aromaanyagának felszabadítására. A kezeletlen és kezelt borok aromaminőségének vizsgálatát gázkromatográfiás módszerrel végezték el. Teljes aromaprofil vizsgálatot nem végeztek, de az egyes aromaanyagok mennyiségének növekedését két jellemző aromakomponens (geraniol és linalool) koncentrációjának szignifikáns változásával jellemezték. Ezeknek az ígéretes eredményeknek azonban egyelőre inkább csak elvi jelentősége van a készítmények korlátozott előállíthatósági lehetőségei és magas előállítási költségei miatt [BALOGH, 2004; BALOGH et al., 2005].

### *2.3.2.3 A $\beta$ -glükózidáz hidrolitikus alkalmazásának lehetősége a gabona eredetű élelmiszeripari alapanyagok $\beta$ -glükán tartalmának lebontásában*

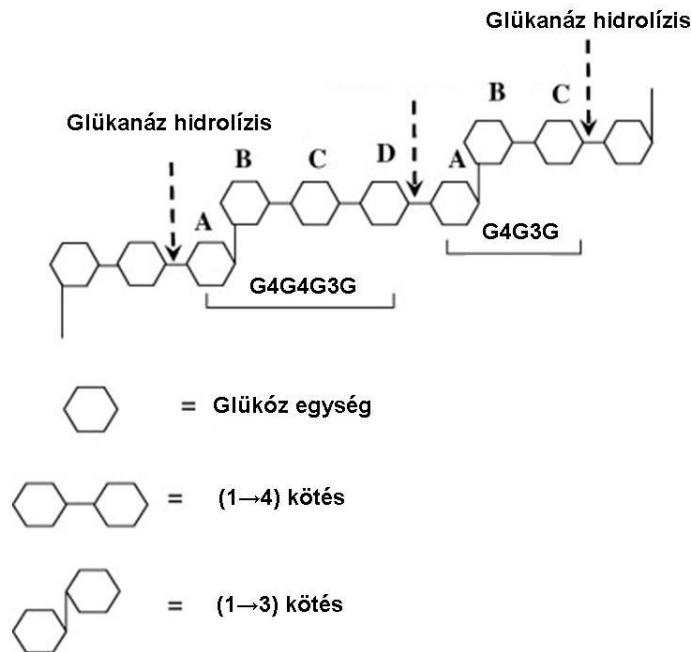
A gabonaféléket világszerte fontos kereskedelmi árucikkekként tartják számon. Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap a gabonafélék egyik szénhidrát összetevője, az (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glükán, rövidebb nevén  $\beta$ -glükán. A különböző gabonaszemek  $\beta$ -glükán tartalmában eltérések tapasztalhatók, ugyanis amíg a búzafélék 1 % körüli tartalommal rendelkeznek, addig a zabfélék esetében 3-7 % és az árpafélék esetében pedig 5-11 % közötti ez az értékek [SKENDI et al., 2003]. Tehát az árpafélék, ebből a szempontból a  $\beta$ -glükán elsődleges forrásának tekinthetők. Jelenleg az árpa legfőbb felhasználási területei az állattakarmányozás (durva liszt formájában) és a szeszipar, azon belül is a sör és viszki előállításával foglalkozó iparágak. Azonban a mai élelmiszeripari gyakorlatban még mindig kevésbé alkalmazott alapanyagként számít (általában csak állományjavítóként van jelen az élelmiszerekben), figyelembe véve felhasználásának lehetőségét a feldolgozott élelmiszerek összetevőjeként. Az elmúlt időszakban ugyanis egyre több kutatás foglalkozik az árpából és egyéb gabonafélékből származó  $\beta$ -glükánok, funkcionális élelmiszerek összetevőjeként való felhasználási lehetőségeivel [MALKKI, 2004; TREPEL, 2004]. A gabonafélék vízzoldható rostösszetevői, amelyek magas  $\beta$ -glükán tartalommal rendelkeznek, bizonyítottan jótékony szerepet töltenek be a vércukorszint szabályozásában és a szérum koleszterinszint csökkentésében, ezáltal a szívroham esélyének kockázatát is csökkenteni képesek [FROST et al., 1999; GERMAN et al., 1996]. A továbbiakban a dolgozat szempontjából is lényeges árpa  $\beta$ -glükánnal fogok részletesebben foglalkozni.

A  $\beta$ -glükán az árpa endospermiumát körülvevő sejtfal fő összetevője, ugyanis a sejtfal csaknem 75 %-át alkotja különböző fehérjékkel és arabinoxilánnal együtt. Az endospermium sejtfalát felépítő  $\beta$ -glükán olyan lineáris glükóz polimer, amely megközelítőleg 30 % arányban tartalmaz (1 $\rightarrow$ 3) és 70 % arányban (1 $\rightarrow$ 4),  $\beta$ -térállású kötések [BACIC & STONE, 1981]. A lineáris  $\beta$ -glükán láncban az (1 $\rightarrow$ 4) kötések egymás után rendeződve helyezkednek el, amíg az (1 $\rightarrow$ 3) kötések mindig egyedülállóan vannak jelen [SKENDI et al., 2003]. Általában 2 vagy 3, (1 $\rightarrow$ 4) kötés után található egy (1 $\rightarrow$ 3) kötés, de ritkábban előfordulhat, hogy 4 vagy annál több egymás mellé rendeződött (1 $\rightarrow$ 4) kötés után következik az (1 $\rightarrow$ 3) kötés [CUI & WOOD, 2000]. Az elmondottak értelmében a  $\beta$ -glükán olyan polimernek tekinthető, amely többnyire (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -cellotrióz és cellotetróz egységekből épül fel [WOOD, 2001]. A  $\beta$ -glükánok a már említett kedvező élettani hatásaiakon túl, egyes élelmiszeripari folyamatokban nem kívánatos anyagként vannak jelen. Ilyen a söripar, ahol a technológia során túl nagy mennyiségben jelen levő és visszamaradt  $\beta$ -glükán csökkentheti az extrakciós, szűrési folyamatok hatékonyságát, továbbá nem kívánatos üledékképződést eredményezhet

a kész sörben, amely folyamatok háttérében a  $\beta$ -glükán duzzadó és gélképző tulajdonságai állnak. Ezen tulajdonságoknak szintén a negatív hatásai érvényesülnek olyan élelmiszeripari folyamatokban is, ahol szintén extrakciós és/vagy szűrési technológiai lépések szükségesek, mint például a gyümölcsfeldolgozásban és a borászatban. Ezek értelmében, sok esetben az élelmiszeripari technológiák megkívánják a  $\beta$ -glükán degradációját, amelynek legáltalánosabb és legelterjedtebb módja az enzimes hidrolízis. Ezentúl a  $\beta$ -glükán teljes hidrolízise olyan élelmiszeripari területek felé is utat nyithat, amelyek a glükózból való etanol előállításával foglalkoznak.

A növényekben a  $\beta$ -glükán lebontása a csírázási folyamat egy korai lépése, amelyet első lépésben különböző specifikitású endogén enzimek katalizálnak: az  $(1\rightarrow4)$ - $\beta$ -D-glükán 4-glükán hidroláz (EC 3.2.1.4), az  $(1\rightarrow3)$ - $\beta$ -D-glükán 4-glükán hidroláz (EC 3.2.1.39) és az  $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - $\beta$ -D-glükán-4-glükán hidroláz (továbbiakban glukanáz) (E.C. 3.2.1.73). A lebontási folyamat utolsó lépésében, amely során glükóz molekulák szabadulnak fel,  $\beta$ -glükózidáz és egyéb  $\beta$ -glükán exo-hidroláz enzimek vesznek részt [STONE & CLARKE, 1992]. A felsorolt endogén enzimek közül a glukanáz rendelkezik a legnagyobb aktivitással, így a  $\beta$ -glükán depolimerizációjának első lépésében is ennek van a legnagyobb jelentősége. Nem csak növények hanem számos baktérium és gomba faj is termeli a glukanáz enzimet. Iparilag a *Bacillus* törzsekből izolált glukanázoknak van nagy jelentősége, amelyek molekulatömege 25-30 kDa, izoelektromos pontjuk pI 7,5-7,9, katalitikus aktivitásuk pH optimuma pH 6-7,5, katalitikus aktivitásuk hőmérséklet optimuma 45-55 °C és a katalitikus aktivitásuk pedig 1200-4500  $\mu\text{mol perc}^{-1}$  enzim  $\text{mg}^{-1}$  (a  $\beta$ -glükánból felszabaduló redukáló cukor mennyisége alapján, glükóz ekvivalensben kifejezve) között változik [TABERNERO et al., 1994; OLSEN et al., 1991]. A glukanáz enzim nagyon szigorú szubsztrátspecifikitást mutat, ugyanis csak azokat az  $(1\rightarrow4)$  kötéseket hidrolizálja, amelyek egy  $(1\rightarrow3)$  kötés mellett helyezkednek el. Az említett folyamat végtermékei főként tri- és tetraszacharid egységek (általában a keletkezett végtermékek 90 % arányban tartalmazzák ezeket), névlegesen a 3-O- $\beta$ -cellobiozil-D-glükopiranóz (G4G3G) és a 3-O- $\beta$ -cellotriozil-D-glükopiranóz (G4G4G3G) (3. ábra), azonban lényegesen kisebb mennyiségben, hasonló felépítésű és magasabb polimerizáltsági fokkal rendelkező egységek is szabaddá válnak [WOOD et al., 1991]. Az ilyen irányú enzimes bontási folyamat végeredményeként keletkező oligoszacharidok minősége és mennyisége, mintegy ujjlenyomatként jellemző a különböző eredetű  $\beta$ -glükánokra, tehát ezek detektálása és mennyiségüknek a meghatározása lehetőséget ad a  $\beta$ -glükánok eredettől függő megkülönböztetésére. A különböző fajtájú árpákból izolált  $\beta$ -glükánok esetében például a G4G3G és G4G4G3G aránya általában 1,62–2,15 között változik [JIANG & VASANTHAN, 2000]. Napjainkban az említett oligoszacharidok meghatározásának, a nagyhatékonyságú anioncserélő kromatográfia, pulzáló amperometrikus detektálással (HPAEC-PAD) a legelterjedtebb eszköze,

azonban a méréshez kidolgozott mennyiségi meghatározási eljárás még rejthet magában hibalehetőségeket [WOOD et al., 1994].



### 3. ábra

### A glükánáz hidrolízis mechanizmusa és főbb termékei.

A növényekben a csírázási folyamat során, a  $\beta$ -glükán lebontás utolsó lépéseként az előbb bemutatott oligoszacharidok lebontására kerül sor, amelyet a  $\beta$ -glükozidáz és egyéb  $\beta$ -glükán exo-hidroláz enzimek katalizálnak. Mivel a  $\beta$ -glükozidáz olyan exohidroláz enzim amely a  $\beta$ -térállású hidroxil kötést tartalmazó molekulákat hidrolizálja, ezért válhat a glükánáz által hidrolizált  $\beta$ -glükán két fő összetevője a G4G3G és G4G4G3G az enzim szubsztrátjává. Mivel az enzim a nem redukáló láncvégről képes glükóz molekulákat lehasítani, ezért működése hatásaként a G4G4G3G szubsztrátból G4G3G és egy szabad glükóz molekula, a G4G3G szubsztrátból laminaribióz (G3G) és egy újabb glükóz molekula, a G3G szubsztrátból pedig két szabad glükóz molekula keletkezik. A  $\beta$ -glükán és enzim lebontásának a fentiekben ismertetett élelmiszeripari jelentőségei miatt, az enzim működési mechanizmusának és kinetikai paramétereinek ismerete elengedhetetlen fontosságú, annak hatékony és gazdaságos felhasználása érdekében. Korábban már folytak kutatások, amelyek során az enzim kinetikai paramétereit határozták meg árpából előállított  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid szubsztrátokon [HRMOVA & FINCHER, 1998; HRMOVA et al., 1998]. Ezekben a kísérletekben a kinetikai paramétereket mindig egy adott tiszta szubsztrát esetében határozták meg hagyományos biokémiai módszerekkel, a felszabaduló glükóz vagy redukáló láncvégek mennyisége alapján. Megállapították, hogy a katalitikus

aktivitás mértékét leginkább a hidrolizált kötés fajtája és a szubsztrát polimerizációs foka befolyásolja, ugyanis a szubsztrát polimerizációs fokának növekedésével az enzim katalitikus aktivitása nagymértékben csökken. Azonban meg kell jegyezni, hogy a felszabaduló glükóz vagy redukáló láncvégek mennyiségének nyomon követésével nem minden esetben kapunk pontos képet a szubsztrát mennyiségének alakulásáról a reakció során. Ez egyes kinetikai paraméterek meghatározása során hibákhoz vezethet, továbbá ez az eljárás nem alkalmazható olyan rendszerekben ahol egyszerre több  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid szubsztrát van jelen.

## **2.4 A hidroláz enzimek preparatív célú alkalmazása**

Szerves preparatív célokra több évtizede alkalmazzák az élő szervezetekben végbemenő szerves kémiai folyamatok biokatalizátorait, az enzimeket. Értelmszerűen a korábban bemutatott hidrolázok felhasználási lehetőségei is széleskörűek a különböző vegyületek szintézisében. A hidrolázok alkalmazásával a savamidok karbonsavakká és aminosavakká, az észterek karbonsavakká és alkoholokká, amíg a glükozidok cukrokká és hidroxil vegyületekké hidrolizálhatók [BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999]. A lipázok, mint észterázok felhasználásával zsírsavakat, a proteázok alkalmazásával aminosavakat, amíg a glikozidázok részvételével pedig cukrokat állítanak elő.

Vizes oldatban a hidrolázok által katalizált folyamatok, olyan egyensúlyi reakciók, amelyek gyakorlatilag teljes mértékben a hasítás felé tolódnak el. Amennyiben a víztartalom lecsökken, például szerves oldószer jelenléte miatt, akkor lehetőség nyílik arra, hogy a szintézis irányába katalizálja az enzim a reakciót. Jakubke az ilyen jellegű reakciókat reverz hidrolitikus folyamatoknak nevezte el [JAKUBKE, 1991]. A reverz hidrolitikus reakciók során, a rendszerben mindig szükséges annyi víz jelenléte, ami az enzim aktív konformációját még biztosítani képes [ADLERCREUTZ, 1993].

### **2.4.1 A glükozidázok preparatív alkalmazása, *O*-glükozidok szintézise**

Preparatív megfontolású hidrolitikus céllal a glikozidázokat, valamint a munkám szempontjából kiemelkedő fontosságú  $\beta$ -glükozidáz enzimet, csak nagyon ritkán, speciális aglikonok felszabadítására alkalmazzák. Az *O*-glükozidok előállítására transzglikozilezési és a reverz hidrolitikus folyamatokban azonban széleskörűen használják őket. Elsősorban a glükóznak (és egyéb egyszerű cukroknak) alifás alkoholokkal alkotott *O*-glükozidjai a nem ionos, felületaktív anyagok egyik jelentős csoportját képezik és antimikróbás tulajdonságaik mellett, biológiailag lebonthatók [PAINTRARUX et al., 1995]. Ezek közül, elsődlegesen az *O*-oktil- $\beta$ -D-glükózt nemcsak az élelmiszer- és a gyógyszeripar alkalmazza sikeresen [HUGHES & LEW, 1970], hanem megfelelő detergensnek bizonyult az állati szövetek membránjai számára [LIN et al., 1979].

Mivel az oligoszacharidok is az *O*-glikozidok közé tartoznak, ezért az *O*-glikozidok enzimes előállításának az irodalma kifejezetten terjedelmes. Ezekben a folyamatokban két enzimosztály enzimei is alkalmazhatók, így a glikoziltranszferázok, amelyek csak transzglikozilezési reakcióban használhatók és a glikozidázok (gliko-hidrolázok), amelyek az *O*-glikozidok szintézisére reverz hidrolízissel is képesek. A glikozidázok alkalmazása azért is előnyösebb lehet, mert az *O*-glikozidok szintézisére transzglikozilezési és reverz hidrolitikus reakciókban is eredményesen felhasználhatók [VAN RANTWIJK et al., 1999]. Amíg a transzglikozilezési folyamat nehézkesnek és drágának nevezhető a reakcióhoz szükséges aktivált cukor-származék miatt, addig ez a reverz hidrolitikus reakciókról nem mondható el, így alkalmasabb módszernek látszik az *O*-glikozidok előállítására.

#### **2.4.1.1 A *O*-glikozidok előállítása transzglikozilezéssel**

A transzglikozilezési folyamatban a kötést kialakító aktivált glikozil donor (mint például a kereskedelmi forgalomban kapható *O*-fenil- vagy *O*-4-nitro-fenil-glikozid), és glikozil transzferáz enzim alkalmazása szükséges [MITSUO et al., 1984]. Az aktivált donor előállítása bonyolultabbá teheti a szintézist és növeli a költségeket, ugyanis ez kémiai szintézist, vagy egy megelőző enzimes reakciót igényel. A transzglikozilezési reakciókban továbbá nehezen eltávolítható melléktermék is keletkezhet a glikozil donorok összekapcsolódása során. Az *O*-glikozidok felhalmozódása, a felbomlás és a képződés között kialakult érzékeny egyensúlytól függ a transzglikozilezési reakcióban [RAVET et al., 1993]. Az irodalomban a nagyon elterjedten használt  $\beta$ -glükozidázon és  $\beta$ -galaktozidázon kívül különböző glikozidázokat is alkalmaztak már transzglikozilezési reakciókban, több esetben rögzítve. Andersson és

Adlrcreutz *O*-4-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükózból állítottak elő *O*-hexil- $\beta$ -D-glükózt, alacsony víztartalmú hexanolos reakcióelegyben, Celitre rögzített  $\beta$ -glükozidáz enzimkészítmény felhasználásával [ANDERSSON & ADLRCREUTZ, 2001].

#### 2.4.1.2 A *O*-glikozidok előállítása reverz hidrolízissel

A reverz hidrolízishez szükséges egyensúly eltolására több gyakorlati megoldás is létezik. Egyik megoldás lehet, hogy a reakcióelegyhez adagolt vízzel elegyedő oldószer, a termodinamikus vízaktivitás lecsökkentése révén segíti elő a kapcsolási reakciót. A bemutatott esetben egyfázisúnak tekinthető a reakcióelegy. A propanol, mint reakcióközeg esetén a mandulából izolált  $\beta$ -glükozidáz enzim legalább 0,4-0,5 vízaktivitás [VIC & CROUT, 1995], amíg acetonitril [VIC et al., 1995], 1-oktanol [LJUNGER et al., 1994] és tercier-butil alkohol alkalmazása mellett, pedig 0,8 vízaktivitás szükséges [VIC & CROUT, 1994].

Vízzel nem elegyedő oldószerek adagolásával kétfázisú reakcióelegyek alakíthatók ki az egyensúly eltolása érdekében. Ilyen rendszerekben a hidrofób termék koncentrációja a vizes közegben állandóan alacsony, mivel az a szerves fázisban halmozódik fel, így újabb és újabb termék szintézisére van lehetőség [LJUNGER et al., 1994]. Az *O*-alkil-glükozidok szintetizálására hatékonyan alkalmaztak kétfázisú rendszereket, ahol a hidrofób alkoholok egyszerre voltak jelen szubsztrátként és oldószerként [VULFSON et al., 1990; PAINTRARUX et al., 1995; KOBAYASHI et al., 2000]. Az *O*-glükozid szintéziseket (glükozidáz enzimek, elsősorban az  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükozidáz, valamint glükoamiláz által katalizálva) Laroute és Willemot vizsgálta abból a szempontból, hogy a kapcsolási reakció hozamát a víztartalom, a vízaktivitás és a szerves közeg tulajdonságai hogyan befolyásolják [LAROUTE & WILLEMOT, 1992]. Vizsgálataik alapján megállapították, hogy a  $\beta$ -glükozidáz sokkal hatékonyabban alkalmazható, mint a glükoamiláz.

Olyan példát is találhatunk az irodalomban, ahol vizes közegben végeztek reverz hidrolízist. Trehalóz és szacharóz származékok szintézisét úgy hajtották végre glikozidok katalizálta reakcióban, hogy nagyon magas cukorkoncentrációt és viszonylag nagy, 55 °C hőmérsékletet alkalmaztak. Mivel a reverz hidrolitikus reakciók jellegükből adódóan több napig is tarthatnak, ezért az alkalmazott szerves közeg enzimek stabilitására, oldhatóságára és aktivitására kifejtett hatását a reakció alatt is vizsgálták az egyfázisú és a kétfázisú reakcióelegyekben is. Általában csökkent stabilitást, oldhatóságot és aktivitást tapasztaltak, mind  $\beta$ -glükozidáz, mind pedig más hidrolázok esetében [CANTARELLA et al., 1991; GUPTA, 1992]. Mások vizsgálataik során azt találták, hogy a  $\beta$ -glükozidáz enzimre stabilizálón



hat a szerves oldószeres közegben a szubsztrát jelenléte, a feltételezhetően kialakuló enzim-szubsztrát komplex miatt [PAINTRARUX et al., 1996]. Vic és munkatársai azonban azt tapasztalták, hogy 10 % vizet tartalmazó acetonitriles közegben a mandula  $\beta$ -glükózidáz enzim napokig képes volt megőrizni az aktivitását (40 °C hőmérséklet mellett) [VIC et al., 1995], illetve tercier-butil alkoholban (50 °C hőmérséklet mellett) [VIC & CROUT, 1994]. A reverz hidrolitikus reakciókban egyre szélesebb körben alkalmaznak rögzített enzimeket, mivel a korábban leírtak miatt, az enzimek rögzítése általában stabilizálni képes az enzim konformációját, és ezáltal a katalitikus aktivitása nagyobb mértékben megőrizhető [KLIBANOV, 1983].

Az Alkalmazott Kémia Tanszéken a 2.2.5 fejezetben bemutatott, felületi réteghez rögzített  $\beta$ -glükózidáz készítményt eredményesen használták *O*-alkil-glükózidok reverz hidrolitikus szintézisére. Célkitűzéseik között szerepelt hígítószerke bevezetése és az *O*-alkil-glükózidok preparatív léptékű előállítása, továbbá egy új, eddig még ismeretlen felületaktív *O*-alkil-glükózid csoport, az *O*-alkoxi-alkil-glükózidok szintézise is. Ennek érdekében a tanszéken korábban is vizsgált alkoholok körét (*n*-butanol, *n*-pentanol, *n*-hexanol, ciklohexanol) két alkoxi-alkohollal és egy ariloxi-alkohollal bővítették (2-metoxi-etanol, 2-butoxi-etanol, illetve 2-fenoxi-etanol). A korábbi tapasztalatok alapján a reakció hőmérsékletét szobahőmérsékletnek, időtartamát 6 napnak, illetve az elegy víztartalmát 5-15 % értékűnek és glükóz tartalmát 10 mM koncentrációjának választották. A korábban leírtak alapján a jelen levő glükóz nemcsak szubsztrát, hanem az enzimet stabilizáló szer is volt. Úgy találták, hogy a vizsgált hígítószerke közül az 1,2-diacetoxi-etán (DAE) és a triacetin (TRA) bizonyult alkalmasnak az *O*-alkil-glükózidok új, preparatív léptékű az Akrilex C-100 hordozóra rögzített  $\beta$ -glükózidáz katalizálta reverz hidrolitikus szintézisére a megfelelő alkoholokkal képzett 9:1 arányú elegyben, ahol az elegy víztartalma 10 % volt, továbbá az *O*-alkoxi-alkil-glükózidok szintézisére tett kísérleteik is sikeresnek bizonyultak [BALOGH et al., 2004; BALOGH, 2004; BALOGH et al., 2005; BALOGH & KOSÁRY, 2005].

## **2.5 A HPAEC-PAD, nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfiás módszer alkalmazása a szénhidrát analitikában**

A nagyhatékonyságú anioncserélő kromatográfia (HPAEC), pulzáló amperometrikus detektálással (PAD), a huszadik évszázad végének egyik forradalmi előrelépése a szénhidráttudományban. A HPAEC-PAD rendszerről és a hozzá tartozó két lényegi technikai újításról, amelyek megkülönböztetik a korábban a szénhidrát analitikában alkalmazott anioncserélő kromatográfiától, ROCKLIN és POHL (1983) számolt be elsőször. Az egyik, hogy az erősen bázikus jellegű és pellikuláris szerkezetű anioncserélő gyanta drasztikus mértékben képes volt növelni az oszlop hatékonyságát. Lúgos oldatokban a cukrok hidroxil csoportjai oxianionokká ionizálódnak, így a gyanta erősen bázikus jellege lehetővé teszi a cukrok és az álló fázis között a közvetlen kötődés kialakulását. Ezen túlmenőleg, a gyanta pellikuláris szerkezetéből adódó nagy hatékonyság biztosítja az elválasztáshoz szükséges idő oly mértékben való lecsökkentését, amellyel a cukrok fragmentációjának és epimerizációjának a mértéke minimálisra csökkenthető [LEE, 1990]. A másik technikai újítás a PAD tandem alkalmazása. Ez egy olyan arany elektróddal ellátott detektor, amely lúgos körülmények között lehetővé teszi a cukrok pikomol nagyságrendű kimutatását, előzetes származékképzési lépések nélkül. A HPAEC-PAD rendszer használatának elsődleges előnyei a szénhidrát analitika területén, annak nagymértékű hatékonyságában, érzékenységében és a biológiai, természetes és szintetikus mintákban levő mono-, oligo- és poliszacharid összetevők egyszerű mintakezelésében és előkészítésében mutatkoztak meg [TOWNSEND et al., 1988; KOIZUMI et al., 1988]. Ezért a mérési technika az újdonsága és kezdeti sikerei után, széles körben is elterjedt és vált elfogadottá, mint a szénhidráttudomány általános analitikai eszköze. Az ismertetett HPAEC-PAD mérőrendszert az a norvég kutatócsoport is széleskörűen alkalmazza különböző szénhidrátok minőségi és mennyiségi meghatározására [BALLANCE et al., 2005], akikkel doktori munkám egy részét közösen végeztem el.

### **2.5.1 A HPAEC-PAD rendszer működésének feltételei és főbb elemei**

A töltéssel nem rendelkező szénhidrátok nagyhatékonyságú kromatográfiás elválasztásának alapfeltétele, hogy a vizsgálni kívánt szénhidrátok hidroxil csoportjai oxianionokká legyenek ionizálva. Mivel a semleges szénhidrátok általában 12 feletti  $pK_a$  értékkel rendelkeznek [RENDELMAN, 1973], ezért az erősen lúgos kémhatású eluensek használata elkerülhetetlen, amely kémhatásra nem csak az elválasztás során, de a PAD detektáláshoz is szükséges van. Az erősen lúgos oldószerek használata, mind a rendszer szerkezeti felépítése és kialakítása, mind pedig a működés tekintetében szigorú követelményeket támaszt. Az egyik, egy olyan HPLC rendszer, amely képes elviselni a magas pH érték melletti, hosszú időn át tartó üzemelést [ROCKLIN & POHL, 1983]. Ezentúl olyan eluens tároló és szállító rendszerre is szükség van, amely nem csak a beoldódott szén-dioxid eltávolítására, de a légkörből való további beoldódás megakadályozására is képes, ugyanis a beoldódott szén-dioxid a retenciós idők csúszását és az alapvonali zaj fokozódását eredményezheti [LEE, 1990]. A rendszer a magas pH érték melletti üzemelésből adódóan, speciális eluens készítési és előkészítési, valamint oszlopregenerálási folyamatokat is igényel [HARDY & TOWNSEND, 1988]. Az eddigi gyakorlatban a HPAEC mérések kivitelezéséhez szinte kizárólag a Dionex vállalat által kifejlesztett és előállított HPLC rendszereket alkalmazták, amelyeket speciálisan úgy terveztek, hogy a fent említett feltételeknek egyidejűleg eleget tegyenek. Más rendszeren kivitelezett HPAEC mérésre csak néhány említés található. A HPAEC rendszer kialakításából adódó megnövekedett hatékonyság biztosítja többek közt az elválasztáshoz szükséges idő csökkenését, ezáltal az epimerizáció és a lebomlás veszélyének nagymértékű csökkenését. Olyan meghatározandó minták esetében, amelyek lúgos közegben érzékeny redukáló végekkel rendelkező szénhidrátokat tartalmaznak, ezeket a folyamatokat nem lehet figyelmen kívül hagyni [LEE, 1996]. Ennek elkerülése érdekében sok kutató alkalmazza azt az eljárást, amely során az oligoszacharidokat alditolokká redukálják [BROWN et al., 1995].

A szénhidrát analitikában, a HPAEC rendszerekben a legelterjedtebben használt oszlopok a Dionex által megtervezett és előállított CarboPac sorozat tagjai, ezen belül is a PA-1, PA-10, PA100, MA-1 és az AminoTrap és BorateTrap jelölésű oszlopok. A legszélesebb körben a PA-1 oszlop használata terjedt el, és a munkám szempontjából is ennek van jelentősége. A kolonna töltetét 10  $\mu\text{m}$  átmérőjű, 2 % divinil-benzollal keresztkötött polisztirol hordozók alkotják, amelyek teljes felületén 500 nm átmérőjű, kvaterner amin funkciós csoportokkal rendelkező latex mikrogöngyök helyezkednek el. A PA-1 oszlop a sokoldalúsága és robosztussága miatt, az említett felhasználási területen nagyon sokféle, különböző irányú vizsgálat elvégzésére alkalmas. Emellett elmondható, hogy nagyon sok PA-1 oszlop több mint tíz év után is kifogástalanul működik. Mivel a kolonna képes ellenállni az olyan

extrém körülményeknek, mint amit egy 1 M koncentrációjú NaOH vagy HCl oldat előidéz, ezért az oszlopot ért szennyezések is könnyen eltávolíthatók az említett oldatokkal való mosással. Nagy hátránya viszont, hogy a szerves oldószerek káros hatást gyakorolnak az oszlop szerkezetére [Dionex Technical Note 20]. Ilyen esetekben a már említett PA-10 és PA-100 oszlopok használata kívánatosabb lehet.

A vizsgálati körülmények és vizsgálni kívánt szénhidrátok sajátosságai több eluens rendszer kidolgozását is megkívánták, mint az NaOH / NaOAc, nitrát, alkáli-földfém és oxalát eluens rendszerek. Ezek közül, a HPAEC-PAD mérésekben a legelterjedtebben az NaOH / NaOAc eluens rendszert alkalmazzák, és egyben a dolgozat szempontjából is ez bír jelentőséggel. Az oszlophoz gyengén kötődő komponensek (mint például a monoszacharidok) esetében, különböző koncentrációjú híg NaOH eluensek egyedüli használata is elegendő lehet a megfelelő elválasztás biztosításához. Azonban olyan oligo-, poliszacharidok vagy savas jellegű szacharidok esetében, amelyek erősebb kötődésre képesek, az OH<sup>-</sup> anion elúciós képessége elégtelen lehet, ezért ilyen esetekben egy erősebb eluáló szer használata is szükségessé válik. Az anionok egy erősen bázikus ioncserélő gyantához való affinitása meghatározott hierarchiát követ: fluorid < hidroxid < acetát < formát < klorid < bromid < kromát stb. [MIKES, 1975]. Ennek értelmében az OAc<sup>-</sup> anion is mérsékelt elúciós képességgel rendelkezik mivel az affinitás tekintetében közvetlenül követi a OH<sup>-</sup> aniont. Sok eljárás során a kisebb elúciós képességgel bíró oldószerek alkalmazása előnyösebb lehet, mivel lehetővé teszik az elúciós körülmények finom beállítását, ezzel biztosítva mind a gyengébben és mind pedig az erősebben kötött komponensek megfelelő mértékű elválasztását. Az OH<sup>-</sup> és OAc<sup>-</sup> anionok hasonló, oszlophoz való affinitásának köszönhetően az oszlop regenerálása gyorsan és hatékonyan kivitelezhető [LANDBERG, 1998].

A HPAEC mérésekhez általánosan használt detektorok a pulzáló amperometrikus detektálás (PAD), a radioaktivitás mérésen alapuló detektálás (RD) és a fluoreszcens (FD) vagy UV detektálás (UVD). Ezek közül a PAD technika a legelterjedtebb és leghatékonyabb detektálási módszer. A kimutatás elve, hogy a szénhidrátok magas pH érték és pozitív elektromos feszültség mellett, egy adott arany elektród felületén elektrokatalitikusan oxidálódnak. Az oxidációs folyamat által létrejövő áram erőssége arányos a szénhidrát koncentrációjával, így válnak a szénhidrátok kimutathatóvá és mennyiségileg meghatározhatóvá. Amennyiben állandó potenciál kerül alkalmazásra, a keletkező oxidációs termékek fokozatosan beszennyezhetik az elektród felületét, ami a detektálandó anyag által kiváltott jel elvesztéséhez vezethet. Ennek elkerülése érdekében a detektáláshoz szükséges potenciál alkalmazása után az elektród felületét tisztítják, amelyhez meghatározott időintervallumokra létrehozott különböző elektromos feszültségek sorozatát használják. Az idő függvényében ábrázolva a

potenciálértékeket egy „hullám” formára emlékeztető mintázatot kapunk [ROCKLIN et al., 1998]. Az ilyen jellegű mérések során alkalmazandó körülmények és a meghatározandó anyagok minősége többféle „hullám” mintázat kidolgozását is megkövetelte, amelynek helyes kiválasztása a körülmények pontos ismeretét és gondos előkészítési munkát igényel.

### ***2.5.2 A HPAEC-PAD rendszer felhasználása $\beta$ -glükánok és glükánáz által hidrolizált $\beta$ -glükánok meghatározására***

A HPAEC-PAD rendszert a már említett nagyfokú érzékenysége, szelektivitása és nem utolsósorban megbízhatósága széles körben keresett és alkalmas eszközévé teszi, olyan tudományterületeken előforduló minták vizsgálatára, mint a biotechnológia, orvostudomány, mezőgazdaság, élelmiszeripar és környezetvédelem. A rendszerrel a gyakorlati tapasztalat szerint a következő szénhidrát vegyületsoportok határozhatók meg megbízhatóan: monoszacharidok, *N*-glikánok, *O*-glikánok, tej vagy glikolipid oligoszacharid származékok, savas jellegű szénhidrátok, poliszacharidok, oligoszacharidok és glükánok [CATALDI et al., 2000]. A felsoroltak közül, a HPAEC rendszerrel napjaink egyik leginkább vizsgált szénhidrátvegyületei a glükánok csoportja, mind a már említett élelmiszeripari, mind pedig gyógyászati jelentősége miatt.

Általánosságban elmondható, hogy egy molekula affinitása egy anioncserélő oszlophoz, arányban áll a molekulán található tényleges töltések mennyiségével [MIKES, 1975]. Lúgos körülmények között a szénhidrátok affinitása a CarboPac oszlopokhoz, a következő sorrendet követi: poliszacharidok > oligoszacharidok > monoszacharidok, amely szabályszerűség megfelel a vártnak, a lúgos eluens által a szénhidrát molekulákon létrehozott oxianionok száma alapján. Ennek értelmében a  $\beta$ -glükánok és a glükánáz által hidrolizált  $\beta$ -glükánok is elsődlegesen a méretük alapján választhatók szét, vagyis a retenciós idők a polimerizáltság fokának (DP) emelkedésével növekednek [ROCKLIN & POHL, 1983]. Amennyiben azonos DP értékkel rendelkező glükánok kerülnek szétválasztásra, a kötődés mértékét az adott glükánban jelen levő kötések minősége és aránya határozza meg, ugyanis a leggyengébb kötődés kialakulását az (1→6), majd az (1→2), (1→4) és a legerősebbet pedig az (1→3) kötések jelenléte eredményezi [KOIZUMI et al., 1989]. Ezáltal a glükánáz hidrolizátumban legnagyobb arányban jelen levő G4G3G (DP3) és a G4G4G3G (DP4) hatékonyan szétválasztható a megfelelő NaOH / NaOAc gradiens elúciós program megválasztásával [JOHANSSON et al., 2005; YOO et al., 2007; JIANG & VASANTHAN, 2000].

A  $\beta$ -glükánok és a glükánáz által hidrolizált  $\beta$ -glükánok meghatározásának másik lényeges eleme a detektálás, amellyel kapcsolatban az általános gyakorlat szerint elmondható, hogy a PAD

detektor érzékenysége nagymértékben csökken a DP2 értékről, DP6 értékre való növekedés során, azonban DP7-DP17 között az érzékenység csökkenésének mértéke minimális [TIMMERMANS et al., 1994]. A glükánáz által hidrolizált  $\beta$ -glükánok és a magasabb DP értékkel rendelkező  $\beta$ -glükánok kvantifikálásához általánosan malto-oligoszacharidokat használnak, mivel ezen  $\beta$ -glükánok elegendő mennyiségben való előállítása hosszadalmas és drága, valamint kereskedelemben csak az elmúlt egy-két évben vált elérhetővé. Korábban többen is úgy találták, hogy a többféle kötést is tartalmazó  $\beta$ -glükán oligoszacharidok viselkedése a detektorral szemben hasonló, mint az azonos DP értékkel rendelkező malto-oligoszacharidoké, ezért ezek a szerzők a megfelelő DP értékkel rendelkező malto-oligoszacharidokat használták a mennyiségi meghatározás alapjául [JIANG & VASANTHAN, 2000, KOIZUMI et al., 1989, VAN RIEL & OLIEMAN, 1991]. Azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni a strukturális különbséget a  $\beta$ -glükánok és a malto-oligoszacharidok között, mivel a malto-oligoszacharidok olyan lineáris glükóz láncok, amelyekben kizárólag  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) kötések fordulnak elő. Ezáltal a jelen levő malto-oligoszacharidok mennyiségének változásával, a detektorban kiváltott jel mértékének változása eltérő lehet. Ezért olyan mérések során, mint például egy enzimaktivitás meghatározás, ahol a jelen levő szubsztrátok és termékek mennyiségének pontos ismerete szükséges, egy az irodalmi gyakorlattól eltérő mennyiségi meghatározási módszer kidolgozás válik szükségessé, a tényleges standardok használatával.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során egy olyan rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimmészítmény előállítását tűztem ki célul, amely alkalmas lehet különböző élelmiszeripari folyamatokban való felhasználásra. Ennek megvalósításához olyan, az enzimmegkötéshez használt hordozó kiválasztását terveztem, amely megfelelő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, valamint olcsó és könnyen beszerezhető. Emellett egy olyan, eddig a  $\beta$ -glükózidáz enzimre az irodalomban nem ismertetett immobilizálási eljárást szerettem volna kidolgozni, amely technológiai szempontból egyszerűen kivitelezhető és gazdaságos. Ezek értelmében munkám kezdetekor a következő célokat fogalmaztam meg:

1. A  $\beta$ -glükózidáz enzim aktivitásmérésére a legmegfelelőbbnek tűnő módszer kiválasztása.
2. Az immobilizálási eljáráshoz olyan hordozó kiválasztása, amely olcsó, könnyen beszerezhető, valamint megfelelő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, továbbá olyan rögzítési technika kidolgozása, amely egyszerűen kivitelezhető és gazdaságos.
3. Olyan vizsgálati módszer kidolgozása, amely lehetővé teszi a rögzítési eljárás paramétereinek, a rögzített enzimmészítmény tulajdonságaira gyakorolt hatásainak a vizsgálatát, ezáltal a rögzítési eljárás kedvező paramétereinek a meghatározását.
4. Elméleti megfontolások alapján kiválasztani azokat a paramétereket, amelyek a rögzítési eljárásra leginkább hatással lehetnek, és ezek kedvező értékeinek kísérleti úton történő meghatározása.
5. A kidolgozott immobilizálási eljárás vizsgálata és a rögzített enzimmészítmény általános jellemzése.
6. A rögzített enzimmészítmény élelmiszeripari folyamatokban való felhasználhatóságának vizsgálatai, valamint tudományos és gyakorlati megfontolások alapján kiválasztani egy felhasználási lehetőséget és azon részletes vizsgálatokat végezni. A tervezett élelmiszeripari alkalmazások: cellobióz hidrolitikus bontása, borászati körülmények között való felhasználás, O-glikozidok reverz hidrolitikus előállítása és az árpa  $\beta$ -glükán tartalmának lebontása.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Kísérletek helye, alkalmazott műszerek és berendezések

A dolgozat kísérleti része a Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszékén történt. A natív és rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimkészítmények, árpa  $\beta$ -glükán lebontásában való felhasználhatósági vizsgálatait a norvégiai Nofima Mat (The Norwegian Institute of Food Research) kutatóintézetben végeztem. Méréseimet a következő műszerek felhasználásával hajtottam végre:

#### Magyarországi műszerek és berendezések:

- Analitikai Mérleg (Precisa, 40SM-200A)
- Rázógép (Ika-Vibrax-Vxr-Nr.514336, Janke & Kungel GmbH)
- pH mérő (Hanna Instruments, pH209 pH Meter)
- Vezetőkéesség mérő (Horiba Ltd., Compact Conductivity Meter C-172)
- Spektrofotométer (Thermo Electron Corporation, Nicolet Evolution 300 BB)
- Vízfürdő (Memmert, WNB7-45)

#### Norvégiai műszerek és berendezések:

- Vízfürdők (GFL, 1003, 1004 és 1086)
- pH mérő (Beckman, 032pH)
- Rázógép (Biosan, Multi PSU-20)
- Spektrofotométer (Shimadzu, UV MINI-1240)
- Termosztálható rázó gép (New Brunswick Scientific, INNOVA 40R)
- Centrifuga (Heraeus, MULTIFUGE 4 KR)
- Analitikai mérleg (Mettler Toledo, (A/S) (CER 2008016))
- HPAEC-PAD berendezés
  - Oszlop (Dionex, CarboPac PA1, 4 x 250 mm Analytical)
  - Előtét oszlop (Dionex, PA1 Guard (10-32))
  - Oszloptermostáló egység (Dionex, AS50)
  - Eluens generátor (Dionex, EG50)
  - Gradiens pumpa (Dionex, GP50-2)
  - Automata mintaadagoló (Dionex, AS50)
  - Elektrokémiai detektor (PAD) (Dionex, ED50A)
  - Szoftver (Chromeleon 6.80 SR7)



## 4.2 Felhasznált anyagok

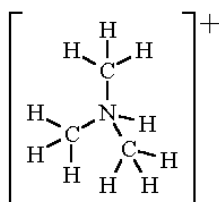
### 4.2.1 Enzimb készítmények

Munkám során, a rögzítési eljárás és az enzimb készítmények élelmiszeripari felhasználhatósági vizsgálataihoz, Sigma és Fluka, mandulából izolált  $\beta$ -glükózidáz (EC 3.2.1.21) enzimb készítményeket ( $M_r \sim 135000$ ) használtam. A Sigma termék aktivitása a katalógus szerint szalicin szubsztrátra 37 °C hőmérsékleten, pH 5,0 értéken 3,4  $\mu\text{mol}$  glükóz  $\text{perc}^{-1}$  enzim  $\text{mg}^{-1}$  volt. A Fluka készítmény aktivitása katalógus szerint szalicin szubsztrátra, 35 °C hőmérsékleten, pH 5,0 értéken 8,06  $\mu\text{mol}$  glükóz  $\text{perc}^{-1}$  enzim  $\text{mg}^{-1}$  volt.

Az árpa  $\beta$ -glükán hidrolizátum előállításához, a Megazyme által forgalmazott, *Bacillus subtilis* törzsből izolált glükánáz enzimet (EC 3.2.1.73) használtam. Az enzimb készítmény aktivitása a katalógus szerint árpa  $\beta$ -glükán szubsztrátra 40 °C hőmérsékleten, pH 6,5 értéken 336  $\mu\text{mol}$  glükóz  $\text{perc}^{-1}$  enzim  $\text{mg}^{-1}$  volt.

### 4.2.2 Az enzimb rögzítési eljáráshoz használt hordozó

Az általam használt biokatalizátor ( $\beta$ -glükózidáz, Fluka) immobilizálásánál hordozóanyagként *Amberlite IRA 900 Cl* (Rohm & Haas) típusú makropórusos anioncserélő gyantát alkalmaztam. A gyanta anyaga sztírol-divinil-benzol kopolimer mátrix, mely 650-820  $\mu\text{m}$  átlagos átmérőjű, 40-75 nm átlagos pórusátmérőjű és 25  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  fajlagos felületű. Az anioncserélő gyanta funkciós csoportja trimetil-ammonium, amelyekhez az előállítás során  $\text{Cl}^-$  ionokat kapcsolnak és így hozzák őket kereskedelmi forgalomba [Amberlite IRA 900 Cl Product Data Sheet].



**4. ábra**

Az anioncserélő gyanta funkciós csoportjának (trimetil-ammonium) kémiai szerkezete.

### 4.2.3 Vegyszerek

Kísérleteim és az azokat kiegészítő munkáim során a következő p.a. minőségű vegyszereket használtam:

Vegyszer	Gyártó
Nátrium-karbonát	Reanal
Nátrium-hidrogén-karbonát	Reanal
Citromsav-monohidrát	Reanal
Dinátrium-hidrogén-foszfát	Merck
Nátrium-dihidrogén-foszfát	Merck
Nátrium-acetát	Merck
Ecetsav	Reanal
Nátrium-hidroxid (lemezes)	Reanal
Nátrium-hidroxid (oldat)	Fluka
D(+)-glükóz	Reanal
D(+)-cellobióz	Fluka
25 %-os glutáraldehid	Merck
96 %-os etanol	Reanal
4-nitrofenil- $\beta$ -D-glükopiranozid	Sigma
n-hexanol	Fluka
2-butoxi-etanol	Fluka
butanol	Fluka
1,2-diacetoxi-etán	Fluka
Krómkénsav	Reanal
Acetonitril	Merck
Hisztidin	Sigma
Imidazol	Sigma
$\omega$ -N-acetil hisztamin	Sigma

### 4.3 A kísérletek során általánosan alkalmazott műveletek

Kísérleteim során több olyan általánosan alkalmazott eljárás volt, amelyeket csak itt ismertetek, ezekre a későbbiekben külön nem fogok kitérni. Ezen általánosan alkalmazott műveletek a következők voltak:

- az enzimrögzítéshez használt hordozót a rögzítési vagy reakcióelegytől minden esetben zsugorított üvegszűrő (PO<sub>4</sub>) használatával különítettem el, amely folyamat elősegítéséhez szivattyúval vákuumot állítottam elő,
- az előbb említett művelethez használt zsugorított üvegszűrő tisztítását, minden esetben vízzel 1:1 arányban hígított krómkénsav felhasználásával hajtottam végre,
- kísérleteim során az alkalmazott pufferek és használt oldatok elkészítéséhez minden esetben a Millipore F7HN14663 A típusú gép által előállított kétszeresen ioncserélt vizet használtam,
- a spektrofotometriás vizsgálatokat minden esetben 1 cm fényúttal rendelkező kvarc küvettában végeztem.

### 4.4 Enzimrögzítési eljárás

#### 4.4.1 Hordozó előkészítése

Az enzimrögzítési eljáráshoz alkalmazott Amberlite IRA 900 OH gyantát a rögzítési kísérletek előtt az alábbi úton, úgynevezett regenerálási eljárásban állítottam elő a gyári, klorid ion fázisban lévő termékből. A katalógus a regeneráláshoz 50-100 g gyanta liter<sup>-1</sup> 2-4 % koncentrációjú nátrium-hidroxid arányt és minimum 30 perces kezelési időt határozott meg irányvonalakként. Ez alapján a rögzítési eljárás előtt a következőképpen végeztem el a kezelést: 2 g száraz gyantára 15 ml 4 % koncentrációjú nátrium-hidroxid oldatot mértem és 30 percen keresztül 150 rpm fordulatszámon rázattam. Ezután a hordozót szűrtem, és addig mostam vízzel, amíg a mosófolyadék vezetőképessége a víz vezetőképességével megegyező nem lett. A gyantát exszikkátorban, az állandó tömeg eléréséig szilárd nátrium-hidroxid felett szárítottam, és a továbbiakban ebben az állapotában került felhasználásra.

#### **4.4.2 Rögzítési eljárás**

Kísérleteimben a hordozót olyan kombinált rögzítési eljárásban alkalmaztam, amely két lépésből tevődött össze: Előbb a hordozó felületére történő adszorpciós rögzítéssel kapcsoltam az enzim molekulát, majd keresztkötések létrehozásával kívántam fokozni a biokatalizátor stabilitását, amihez glutáraldehid oldatot használtam.

Ennek megfelelően általában, az adszorpciós rögzítéshez, a hordozót és az enzimet adott arányban, vízben vagy különböző töménységű és hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben 24 órán keresztül rázattam (150 rpm). A glutáraldehydes kezeléshez az előbbi elegy felülúszóját dekantáltam és a nedves állapotú hordozót adott koncentrációjú glutáraldehid oldattal, adott ideig kezeltem. A rögzített enzimet kiszűrtem, az eredeti, száraz hordozó tömegére számított  $250\times$  mennyiségű 0,1 M töménységű és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) mostam, majd nedves állapotban, azonnali tömegmérés után használtam fel. Ez utóbbtól csak az 5.2.2.1 fejezetben tértem el, ahol a mosást vízzel vagy különböző töménységű nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) végeztem.

A fent ismertetett rögzítési eljárások pontos paramétereit az 5.2 fejezetben fogom ismertetni, mivel ezen körülményeket mindig a vizsgálni kívánt folyamat és/vagy hatás jellegétől függően választottam meg.

#### **4.5 A rögzítési eljárás és az enzimkészítmények általános jellemzése során alkalmazott mérési és vizsgálati módszerek**

##### **4.5.1 $\beta$ -glükózidáz enzimaktivitás meghatározása az általánosan alkalmazható szubsztrátok esetén**

Az aktivitásokat az irodalomnak megfelelően, standard egységben (U) azaz,  $\mu\text{mol perc}^{-1}$  mértékegységben adtam meg és ezt az enzimaktivitást minden esetben 1 mg oldott enzimre, 1 mg rögzített enzimre vagy 1 g száraz hordozóra vonatkoztattam. Az ettől eltérő számítási módszert a megfelelő kísérlet tárgyalásánál tüntetem fel.

##### **4.5.1.1 Enzimaktivitás meghatározás cellobióz szubsztrát esetén**

A mérési módszerhez szubsztrátként cellobiózt használtam és az enzimaktivitást a felszabaduló glükóz mennyiségének enzimatis úton történő meghatározásával állapítottam meg [Larner, 1960]. Ennek megfelelően a mérési és reakcióelegyet a következőképpen állítottam össze:

Reakcióelegy: a cellobióz szubsztrát hidrolizálásához 1900  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű különböző kémhatású és hőmérsékletű nátrium-acetát puffert használtam, amely cellobiózra nézve 150 mM töménységű volt. A reakciót 100  $\mu\text{l}$  4  $\text{mg ml}^{-1}$  koncentrációjú enzimoldattal (0,1 M töménységű, a reakcióelegy kémhatásával megegyező pH értékű és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) vagy 50 mg nedves állapotú rögzített enzimmel indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam.

Mérési elegy: a reakció során felszabadult glükóz mennyiségének meghatározásához a kereskedelembe kapható, Boehringer Mannheim által forgalmazott szacharóz/D-glükóz/D-fruktóz meghatározására alkalmas kitted használtam (Cat. Nr. 10 716 260 035).

A mérési elegy a következőket tartalmazta:

- 635  $\mu\text{l}$  víz
- 330  $\mu\text{l}$  glükóz analízáló oldat:  $\text{NADP}^{+}$ -t, ATP-t és magnézium-szulfátot tartalmazó trietanolamin puffer (pH 7,6)
- 30  $\mu\text{l}$  reakcióelegy, amelyet percenként vételeztem 4 percen keresztül
- 5  $\mu\text{l}$  glükóz analízáló enzimkeverék: amely tartalmazta a hexokinázt és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt

Az aktivitást az egy perc alatt keletkező  $\text{NADPH} + \text{H}^{+}$  okozta, 340 nm hullámhosszon mérhető abszorbancia változásból számoltam, amelyhez a  $\text{NADPH} + \text{H}^{+}$  abszorpciós koefficiensét használtam ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### *4.5.1.2 Enzimaktivitás meghatározás a mesterséges p-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozid (pNPG) szubsztrát esetén*

Ezen mérési módszerhez szubsztrátként p-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozidot (pNPG) használtam és az enzimaktivitást a felszabaduló p-nitro-fenol mennyiségének 410 nm hullámhosszon történő fotometráálásával állapítottam meg [STERNBERG et al., 1977]. Ennek megfelelően a mérési és reakcióelegyet a következőképpen állítottam össze:

Reakcióelegy: a pNPG szubsztrát hidrolizálásához 2980  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű pH 5,50 (az enzimkészítmények pH optimumának meghatározása során a pH 3,0 és 7,5 értékek között változott) kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert használtam, amely a pNPG szubsztrátra nézve

10 mM töménységű volt. A reakciót vagy 20  $\mu\text{l}$  4 mg  $\text{ml}^{-1}$  koncentrációjú enzimoldattal (0,1 M töménységű, a reakcióelegy kémhatásával megegyező pH értékű és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) vagy 20 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam.

Mérési elegy: a reakció során felszabadult *p*-nitro-fenol mennyiségének meghatározásához a következő mérési elegyet használtam:

- 980  $\mu\text{l}$  0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát puffer
- 20  $\mu\text{l}$  reakcióelegy, amelyet percenként vételeztem 4 percen keresztül.

Amennyiben a reakció vagy mérési elegy összetételében és/vagy paramétereiben a fent említettektől eltértem, azt a megfelelő kísérlet tárgyalásánál tüntetem fel. Az aktivitást az egy perc alatt keletkező *p*-nitro-fenol okozta abszorbancia változásból számoltam, amelyhez a *p*-nitro-fenol abszorpciós koefficiensét használtam ( $\epsilon_{410} = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **4.5.2 A hordozóhoz adszorpciósan kötött fehérje mennyiségének meghatározása**

##### *4.5.2.1 Meghatározás a rögzítési elegy felülúszójának aktivitása alapján*

A hordozóhoz adszorpciósan kötődött fehérje ( $\beta$ -glükózidáz) mennyiségét a rögzítés végeztével, a rögzítési felülúszó maradék enzimaktivitásából közvetett módon kívántam meghatározni, amelyhez a már ismertetett, pNPG szubsztrátot alkalmazó aktivitásmérési módszert használtam. A számításhoz kontrollként, a rögzítéshez használttal megegyező koncentrációjú enzimoldatot tettem fel rázatni, a rögzítés idejével megegyező időre. Ennek az oldatnak és a rögzítési felülúszónak az enzimaktivitásai alapján a rögzült fehérje mennyisége következtethető volt. A fent említettek alapján a reakció és mérési elegyet a következőképpen állítottam össze a rögzítési felülúszó enzimaktivitásának meghatározására:

Reakcióelegy: 800  $\mu\text{l}$  0,1 M koncentrációjú, 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert (pH 5,50) használtam, amely a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM töménységű volt. A reakciót a rögzítési elegy felülúszójának 200  $\mu\text{l}$  mennyiségével indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam.

#### Mérési elegy:

- 950  $\mu\text{l}$  0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát puffer
- 50  $\mu\text{l}$  reakcióelegy, amelyet percenként vételeztem 4 percen keresztül

#### *4.5.2.2 Meghatározás spektrofotometriás módszerrel*

Az 5.2.2.4 fejezetben fogom ismertetni, az irodalomban is alkalmazott fehérje meghatározási módszer módosított változatát, amelyben pontosan 278 nm hullámhosszon határoztam meg az általam használt oldott  $\beta$ -glükózidáz enzimfehérje koncentrációját. Ezt az eljárást használtam fel az adszorpciósan rögzült  $\beta$ -glükózidáz mennyiségének indirekt meghatározására.

#### **4.5.3 Kinetikus-leoldódási vizsgálat**

A rögzített enzimkészítmények jellemzésére, egy ún. kinetikus-leoldódási vizsgálatot dolgoztam ki, amelynek elvi hátterét és felhasználási lehetőségeit az 5.2.1 fejezetben ismertettem. A vizsgálatot minden esetben az alábbiak szerint végeztem el:

1. az adott rögzítési vagy enzimaktivitás mérési eljárás végén a hordozót kiszűrtem és az eredeti, száraz hordozó tömegére számított  $250\times$  mennyiségű 0,1 M töménységű 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) mostam,
2. a szűrés után adott mennyiségű nedves állapotú hordozót (10-30 mg) 3000  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferből előállított reakcióelegybe helyeztem, amely a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM töménységű volt, és 4 percig végeztem az enzimaktivitás mérést, a kezelést további 6 percig folytattam, de már aktivitásmérés nélkül. Az enzimaktivitás mérés során a mérési elegy, 20  $\mu\text{l}$  reakcióelegyből és 980  $\mu\text{l}$  0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből állt. A felszabaduló *p*-nitro-fenol okozta abszorbancia változást 410 nm hullámhosszon követtem nyomon.

Ezen vizsgálati módszer esetében az 1. és 2. pontban leírt műveleteket tekintettem egy ciklusnak, amelyet a vizsgálatától függően többször megismételtem. A vizsgálat során a hordozó aktivitásának meghatározása után, a kezelés (4 perc enzimaktivitás mérés, majd 6 perc további rázatás) hatására leoldódott enzim aktivitását is meghatároztam a reakcióelegyből a ciklus végén kivett minta

segítségével. Ehhez adott mennyiségű felülúszóból (20-100  $\mu$ l) és annyi 0,1 M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű, pNPG szubsztrátra nézve 10 mM töménységű nátrium-acetát pufferből képeztem reakcióelegyet, hogy a térfogata pontosan 1000  $\mu$ l kellett legyen, és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam. A mérési elegyet és a mérést a fent említett módon állítottam össze és végeztem el.

#### ***4.5.4 Az enzimkészítmények kinetikai paramétereinek meghatározása***

A natív és rögzített enzimkészítmények kinetikai paramétereinek meghatározását pNPG szubsztráton, az általánosan alkalmazott gyakorlat alapján hajtottam végre. Eszerint az enzimkészítmények aktivitását, a szubsztrátra nézve különböző koncentrációjú reakcióelegyekben, a felszabaduló termék mennyisége alapján számítottam, majd a Michaelis-Menten egyenlet alapján, a kettős reciprok ábrázolással határoztam meg a kinetikai paramétereket.

A natív, oldott enzimkészítmény esetében a mérést a következőképpen hajtottam végre: a reakcióelegy minden esetben 1950  $\mu$ l 0,1 M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffer volt, amely koncentrációja a pNPG szubsztrátra nézve 0,1-10 mM között változott, és a reakciót minden esetben 50  $\mu$ l 2 mg ml<sup>-1</sup> (0,1M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium acetát pufferben oldva) koncentrációjú enzimoldattal indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam. A mérési elegyet 900-980  $\mu$ l 0,2 M töménységű és 25 °C hőmérsékletű pH 10,2 kémhatású karbonát pufferből és 100-20  $\mu$ l reakcióelegyből állítottam össze úgy, hogy a végtérfogat minden esetben 1000  $\mu$ l volt. A felszabaduló *p*-nitro-fenol okozta abszorbancia változást 410 nm hullámhosszon követtem nyomon.

A rögzített enzimkészítmény esetében a mérést a következőképpen hajtottam végre: a reakcióelegy minden esetben 2000  $\mu$ l 0,1 M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffer volt, amely koncentrációja a pNPG szubsztrátra nézve 10-0,1 mM között változott, és a reakciót minden esetben 10 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam. A mérési elegyet 970-950  $\mu$ l 0,2 M töménységű és 25 °C hőmérsékletű pH 10,2 karbonát pufferből és 30-50  $\mu$ l reakcióelegyből állítottam össze úgy, hogy a végtérfogat minden esetben 1000  $\mu$ l volt.



#### ***4.5.5 Az enzimkészítmények pH optimumának meghatározása***

A natív és rögzített enzimkészítmények katalitikus aktivitásának a pH függését pNPG szubsztrát alkalmazása mellett határoztam meg. A reakcióelegyek minden esetben 0,1 M töménységű és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferből álltak, amelyek a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjúak voltak. A reakcióelegyek kémhatása pH 3,0-7,5 között változott fél pH egységenként és térfogata a natív enzim esetében 3000 µl volt, amíg a rögzített enzimkészítmény vizsgálata során 2000 µl. A reakciót 20 µl 2 mg ml<sup>-1</sup> (0,1 M töménységű, a reakcióelegy kémhatásával megegyező, 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) koncentrációjú enzimoldattal vagy 15 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam. A mérési elegyet mind a két esetben 980 µl, 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 20 µl reakcióelegyből állítottam össze.

#### ***4.5.6 Az enzimkészítmények hőmérséklet optimumának meghatározása***

A natív és rögzített enzimkészítmények katalitikus aktivitásának hőmérsékletfüggését függését pNPG szubsztrát alkalmazása mellett határoztam meg. A reakcióelegyek minden esetben 0,1 M töménységű és pH 5,50 kémhatású nátrium-acetát pufferből álltak, amelyek a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjúak voltak. A reakcióelegyek hőmérsékletét vízfürdő alkalmazásával 24 °C hőmérsékletéről közel lineáris mértékben emeltem 75 °C hőmérsékletre úgy, hogy a natív enzim esetében tíz, a rögzített enzimkészítmény esetében pedig tizenegy mérési ponthoz jutottam. A reakcióelegy térfogata mind a natív, mind pedig a rögzített enzimkészítmény vizsgálata során 5000 µl volt. A szubsztrátot is tartalmazó puffer oldatot, az enzimkészítmények hozzáadása előtt, a meghatározott állandó hőmérséklet eléréséig termosztáltam, amelyet a reakció során állandó értéken tartottam. A reakciót 30 µl 2 mg ml<sup>-1</sup> (0,1M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) koncentrációjú enzimoldattal vagy 15 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam és a reakcióelegyet mágneses keverővel kevertettem. A mérési elegyet mind a két esetben 970 µl, 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 30 µl reakcióelegyből állítottam össze.

## **4.6 A megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény felhasználhatóságának vizsgálati módszerei élelmiszeripari folyamatokban**

A végrehajtott felhasználhatósági vizsgálatokhoz a megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítményt minden esetben azonos módon állítottam elő: 20 mg száraz hordozóra 1 ml 2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) kialakított enzimoldatot mértem, és az elegyet 24 órán keresztül 25 °C hőmérsékleten rázattam (150 rpm). A ráztatás végén a felülúszót dekantáltam és a nedves hordozóhoz 2 ml 0,1 M koncentrációjú nátrium-acetát puffert adtam, ami minden esetben 0,25 %(m/V) koncentrációjú volt a glutáraldehidre nézve. Ezt az elegyet 30 percig rázattam (150 rpm), majd a rögzített enzimet kiszűrtem, az eredeti, száraz hordozó tömegére számított 250× mennyiségű 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) mostam. Amennyiben a rögzített enzimkészítményre nagyobb mennyiségben volt szükségem, az alkalmazott hordozó tömegét, valamint az enzimoldat és az elegyek térfogatait arányosan növeltem.

### **4.6.1 Felhasználhatósági vizsgálat a cellobióz hidrolitikus bontásában**

A cellobióz hidrolitikus bontásának vizsgálataihoz 2 ml térfogatú reakcióelegyeket alkalmaztam, amelyek olyan 0,1 M koncentrációjú nátrium-acetát puffer oldatok voltak (pH 5,50 és pH 4,00), amelyek 250 mM koncentrációban tartalmaztak cellobiózt. A reakciót 0,4 mg oldott enzimmel (0,1 M töménységű, a reakcióelegy kémhatásával megegyező pH értékű és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) vagy megközelítőleg 50 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam (ezzel érve el, hogy a rendszerbe bevitt, pNPG szubsztráton meghatározható enzimaktivitás mind a natív, mind pedig a rögzített enzimkészítmény esetében azonos volt). Az elegyeket 30 °C hőmérsékleten 70 órán keresztül rázattam (150 rpm), és nyomon követtem a reakció során felszabadult glükóz mennyiségét. A rendszer glükóz tartalmának meghatározása során a már bemutatott Boehringer Mannheim által forgalmazott szacharóz/D-glükóz/D-fruktóz meghatározására alkalmas kittet használtam. A kittel való glükóz tartalom meghatározást a korábban leírtakkal (4.5.1.1) teljes mértékben megegyező módon hajtottam végre. A 70 órás reakció végeztével az enzimkészítmények maradék aktivitását meghatároztam, amelyhez ebben az esetben is a pNPG szubsztrátot alkalmazó módszert használtam. A natív enzim esetében a maradék aktivitás meghatározásához a reakcióelegy 960 µl 0,1 M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferből állt, amely a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt, a reakciót pedig 40 µl a cellobióz bontási kísérlethez használt reakcióeleggyel indítottam és a reakcióelegyet

150 rpm fordulatszámon rázattam. A rögzített enzim esetében a reakcióelegy összetétele megegyezett az előzővel, amelynek a térfogata ez esetben 4000 µl volt, a reakciót pedig a cellobióz bontási kísérlethez használt, a reakcióelegytől elválasztott rögzített enzimkészítmény teljes mennyiségével indítottam. A mérési elegyet mind a két esetben 960 µl, 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 40 µl reakcióelegyből állítottam össze.

#### **4.6.2 Felhasználhatósági vizsgálat borászati körülmények között**

##### *4.6.2.1 A pH és etanoltartalom hatása az enzimkészítmények katalitikus aktivitására*

A pH és etanoltartalom katalitikus aktivitásra gyakorolt hatását mind a natív, mind pedig a rögzített enzimkészítmény esetében, pNPG szubsztrát alkalmazása mellett bormintában (Pajzos-Megyer pincészet, 2007 évjáratú félédese Tokaji furmint), valamint négy különböző paraméterekkel rendelkező reakcióelegyben vizsgáltam, amelyek a következők voltak:

- 0,1 M, pH 5,50, 25 °C nátrium-acetát puffer oldat, amely a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt
- 0,1 M, pH 5,50, 25 °C nátrium-acetát puffer oldat, amely a pNPG szubsztrátra 10 mM és etanolra nézve pedig 10 %(V/V) koncentrációjú volt
- 0,1 M, pH 4,00, 25 °C nátrium-acetát puffer oldat, amely a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt
- 0,1 M, pH 4,00, 25 °C nátrium-acetát puffer oldat, amely a pNPG szubsztrátra 10 mM és etanolra nézve pedig 10 %(V/V) koncentrációjú volt

A reakcióelegy végtérfogata a natív enzim esetében 3000 µl, a rögzített enzim esetében pedig 2000 µl volt. A reakciót vagy 20 µl 2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldattal (0,1 M töménységű, a reakcióelegy kémhatásával megegyező pH értékű és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) vagy 20 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam. A mérési elegyet mind a két esetben 980 µl, 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 20 µl reakcióelegyből állítottam össze.

#### 4.6.2.2 A rögzített enzimkészítmény felhasználási stabilitásának vizsgálata

A rögzített enzimkészítmény felhasználási stabilitását, elméleti és gyakorlati megfontolások alapján cellobióz szubsztrát alkalmazása mellett, három, különböző paraméterekkel rendelkező felhasználási reakcióelegyben vizsgáltam, amelyek a következők voltak:

- 0,1 M, pH 5,50, 25 °C nátrium-acetát puffer oldat, amely cellobióz szubsztrátra nézve 20 mM koncentrációjú volt
- 0,1 M, pH 4,00, 25 °C nátrium-acetát puffer oldat, amely cellobióz szubsztrátra 20 mM és etanolra nézve pedig 10 %(V/V) koncentrációjú volt
- 25 °C borminta (Pajzos-Megyer pincészet, 2007 évjáratú félédes Tokaji furmint), amely cellobióz szubsztrátra nézve 20 mM koncentrációjú volt

A felhasználási körülményeket modellező reakcióelegyek térfogata 4000  $\mu$ l volt, a reakciót pedig mindhárom esetben 25 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam és a reakcióelegyeket 150 rpm fordulatszámon, az első két mintavétel előtt 1 órán, majd ezt követően 2 órán keresztül rázattam. A kezelések után a rögzített enzimkészítményeket kiszűrtem és az eredeti, száraz hordozó tömegére számított 250 $\times$  mennyiségű 0,1 M töménységű 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) mostam. A mosott készítmények aktivitását pedig pNPG szubsztráton határoztam meg, ahol a 2000  $\mu$ l térfogatú aktivitásmérési reakcióelegyek 0,1 M töménységű és pH 5,50 kémhatású nátrium-acetát pufferből álltak, amelyek a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjúak voltak. A reakciót minden esetben a kiszűrt és mosott rögzített enzimkészítmények teljes mennyiségével indítottam. A mérési elegyet mindhárom esetben 980  $\mu$ l, 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 20  $\mu$ l aktivitásmérési reakcióelegyből állítottam össze. Az aktivitásmérési eljárás végén a készítményeket az előbb leírt módon szűrtem és mostam. A fent bemutatott felhasználási reakcióelegyben való kezelést és az azt követő aktivitásmérést tekintettem egy ciklusnak. Ezt a ciklust ötször ismételtam meg, így összesen, a rögzített készítmények felhasználhatósági stabilitását 8 órán keresztül vizsgáltam.

#### 4.6.3 Felhasználhatósági vizsgálat O-glikozidok reverz hidrolitikus módon történő előállításában

A glükóz alifás alkoholokkal képzett O-glükozidjainak előállításához az 1 ml térfogatú reakcióelegyek 1:9 arányban különböző alkoholokból (n-hexanol, 2-butoxi-etanol, butanol), és

1,2-diacetoxi-etánból (DAE) tevődtek össze, valamint egy esetben csak butanol volt az összetevő. A reakcióelegyek minden esetben 10 % vizet tartalmaztak és glükózra nézve 10 mM koncentrációjúak voltak. A felsorolt reakcióelegyek mindegyikéből 5 darabot készítettem, hogy nyomon tudjam követni az enzimkészítmények maradék aktivitását a reakció során. A reakciót 0,4 mg, vízben oldott enzimmel vagy 50 mg nedves rögzített enzimkészítménnyel indítottam (ezzel érve el, hogy a rendszerbe bevitt, pNPG szubsztráton meghatározható enzimaktivitás mind a natív, mind pedig a rögzített enzimkészítmény esetében azonos volt). Kontrollként az összes felsorolt reakcióelegyből előállítottam még egyet, amelyek azonban az enzimet nem tartalmazták (mindig ezek alapján határoztam meg a hozamértékeket), továbbá még egy olyan kontroll oldatot is alkalmaztam, amely csak a DAE szerves oldószerből állt és ugyanúgy 10 % vizet tartalmazott és glükózra nézve 10mM koncentrációjú volt (ezzel a cellobióz keletkezésének lehetőségét vizsgáltam). Az így előállított elegyeket 25°C hőmérsékleten 3 napon keresztül rázattam (150 rpm), és nyomon követtem a rendszerben szabadon jelen levő glükóz mennyiségét, valamint a biokatalizátorok maradék aktivitását. A rendszerben jelen levő glükóz mennyiségét a vizsgálat során mindig ugyanabból a reakcióelegyből, amíg az enzimkészítmények maradék aktivitását a feltett 5 darab reakcióelegy egyikéből határoztam meg, így összesen 5 mérési ponthoz jutottam. A 0 napos mérési pont az enzimkészítmények azonnali inaktiválódását jelentette (valamint a reakció hozamát tekintve értelemszerűen 0 % érték tartozott hozzá), amely során az enzimkészítményeket az adott reakcióelegybe helyeztem majd 1 perc rázatás után az aktivitásukat azonnal meghatároztam (ezekben az esetekben az aktivitásmérés csak 2 perc volt az általánosan alkalmazott 4 perces vizsgálatokkal ellentétben). Az enzimkészítmények maradék aktivitásának meghatározásához a mesterséges pNPG szubsztrátot alkalmazó módszert alkalmaztam. A natív enzim esetében a maradék aktivitás meghatározásához a reakcióelegy 960 µl 0,1 M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferből állt, amely a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt, a reakciót pedig 40 µl a reverz hidrolitikus kísérlethez használt reakcióeleggyel indítottam és a reakcióelegyet 150 rpm fordulatszámon rázattam. A rögzített enzim esetében a reakcióelegy összetétele megegyezett az előzővel, amelynek a térfogata ez esetben 4000 µl volt, a reakciót pedig a reverz hidrolitikus kísérlethez használt, a reakcióelegytől elválasztott rögzített enzimkészítmény teljes mennyiségével indítottam. A mérési elegyet mind a két esetben 960 µl, 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 40 µl reakcióelegyből állítottam össze. A reverz hidrolitikus reakcióelegyek glükóz tartalmának meghatározására során a már bemutatott Boehringer Mannheim által forgalmazott szacharóz/D-glükóz/D-fruktóz meghatározására alkalmas kittet használtam. A kittel való glükóz tartalom meghatározást a korábban leírt (4.5.1.1) általános módszerrel teljes mértékben megegyező módon hajtottam végre.

#### 4.6.4 Felhasználhatósági vizsgálat az árpa $\beta$ -glükán tartalmának lebontásában

##### 4.6.4.1 A natív enzim inaktiválási lehetőségeinek vizsgálata

A hőinaktiválási kísérletek során, az enzimaktivitás mérésekhez általánosan alkalmazott 4 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldatot (0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) készítettem. Ebből 1-1 ml mennyiségeket üveg kémcsövekbe mértem és 5, 10, 20 és 30 másodpercre forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem. További egy perc alatt hideg vízfürdőben hűtöttem le őket. Az így kezelt enzimoldatok aktivitását a korábban bemutatott (4.5.1.2) általános módszer alapján határoztam meg, pNPG szubsztrát alkalmazása mellett.

Az inaktiválási kísérletekhez szerves oldószerként acetonitrilt használtam és a következő eljárási módokban alkalmaztam:

- Eljárás 1 : először 20  $\mu$ l 4 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldatot és 200  $\mu$ l acetonitrilt mértem össze és ezt az elegyet (ami ekkor acetonitrilre nézve 91 %(V/V) koncentrációjú volt) 30 másodpercig rázattam. A reakciót 1780  $\mu$ l 0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferrel indítottam, ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt (a reakció során az elegy acetonitrilre nézve 10 %(V/V) koncentrációjú volt).
- Eljárás 2 : először 1780  $\mu$ l 0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert (ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt) és 200  $\mu$ l acetonitrilt mértem össze, majd a reakciót 20  $\mu$ l 4 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldattal indítottam (a reakció során az elegy acetonitrilre nézve 10 %(V/V) koncentrációjú volt).
- Eljárás 3 : először 20  $\mu$ l 4 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldatot és 1000  $\mu$ l acetonitrilt mértem össze és ezt az elegyet (ami ekkor acetonitrilre nézve 98 %(V/V) koncentrációjú volt) 30 másodpercig rázattam. A reakciót 980  $\mu$ l 0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferrel indítottam, ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt (a reakció során az elegy acetonitrilre nézve 50 %(V/V) koncentrációjú volt).
- Eljárás 4 : először 980  $\mu$ l 0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert (ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjú volt) és 1000  $\mu$ l acetonitrilt mértem össze, majd a reakciót 20  $\mu$ l 4 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldattal indítottam (a reakció során az elegy acetonitrilre nézve 50 %(V/V) koncentrációjú volt). A

mérési elegyet mind a négy eljárás esetén 980  $\mu\text{l}$ , 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 20  $\mu\text{l}$  reakcióelegyből állítottam össze.

Az inaktiválási kísérletek során enzim inhibitorként hisztidint, imidazolt és  $\omega$ -N-acetil hisztamint alkalmaztam. A reakcióelegyek minden esetben 3000  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferből álltak, amelyek a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM koncentrációjúak voltak. A hisztidin koncentrációja 10-200 mM között, az imidazol koncentrációja 5-50 mM között és az  $\omega$ -N-acetil hisztamin koncentrációja pedig 0,1-5 mM között változott a reakció elegyekben. A reakciót minden esetben 20  $\mu\text{l}$  4 mg  $\text{ml}^{-1}$  (0,1 M töménységű pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát pufferben oldva) koncentrációjú enzimoldattal indítottam és a mérési elegyet pedig 980  $\mu\text{l}$ , 0,2 M, 25 °C, pH 10,2 karbonát pufferből és 20  $\mu\text{l}$  reakcióelegyből állítottam össze.

Az acetonitril és enziminhibitor együttes alkalmazásának vizsgálatai során az imidazolt és az  $\omega$ -N-acetil hisztamint alkalmaztam. Az aktivitásmérés menete és a mérési elegyek az előbb leírtakkal teljes mértékben megegyeztek, a reakcióelegyek pedig a következőképpen tevődtek össze:

- Reakcióelegy 1 : 2680  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert (ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM, az imidazolra nézve pedig 25 mM koncentrációjú volt) és 300  $\mu\text{l}$  acetonitrilt mértem össze.
- Reakcióelegy 2 : 1480  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert (ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM, az imidazolra nézve pedig 50 mM koncentrációjú volt) és 1500  $\mu\text{l}$  acetonitrilt mértem össze.
- Reakcióelegy 3 : 2680  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert (ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM, az  $\omega$ -N-acetil hisztaminra nézve pedig 20 mM koncentrációjú volt) és 300  $\mu\text{l}$  acetonitrilt mértem össze.
- Reakcióelegy 4 : 1480  $\mu\text{l}$  0,1 M töménységű, pH 5,50 kémhatású és 25 °C hőmérsékletű nátrium-acetát puffert (ami a pNPG szubsztrátra nézve 10 mM, az  $\omega$ -N-acetil hisztaminra nézve pedig 20 mM koncentrációjú volt) és 1500  $\mu\text{l}$  acetonitrilt mértem össze. A reakciót minden esetben 20  $\mu\text{l}$  4 mg  $\text{ml}^{-1}$  koncentrációjú enzimoldattal indítottam.

#### 4.6.4.2 A HPAEC-PAD nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfiás mérési módszer

A kromatográfiás berendezés egy Dionex BioLC rendszerből (Sunnyvale, CA, USA) és a hozzá kapcsolt Dionex AS50 automata mintaadagolóból állt. A HPLC rendszer 20  $\mu\text{l}$  térfogatú

mintaadagoló hurokkal, CarboPac PA-1 (4mm x 250 mm) anioncserélő oszloppal és a hozzá kapcsolt CarboPac PA-1 (4 x 50 mm) előtétoszloppal volt ellátva. A kromatográfiát minden esetben szobahőmérsékleten és 1 ml perc<sup>-1</sup> térfogatáram alkalmazása mellett hajtottam végre. Az A jelű mozgófázis 100 mM koncentrációjú nátrium-hidroxid oldat, amíg a B jelű mozgófázis 100 mM koncentrációjú nátrium-hidroxid (nátrium-acetátra nézve 500 mM koncentrációjú) oldat volt. A mozgófázisokat folyamatosan nitrogén gáznyomás alatt tartottam. A B jelű mozgófázis koncentrációjának 0-25 % értékre való emelésével (25 perc alatt) lineáris acetát gradienst hoztam létre a mérések során. Az oszlophoz egy Au mérő- és egy Ag/AgCl referencia elektróddal ellátott pulzáló amperometriás detektor volt kapcsolva. A detektorban a mérés során alkalmazott potenciálértékek programja a Dionex technikai leírása alapján (Dionex Technical Note 21) a „waveform A” szerint lett beállítva. A mennyiségi meghatározáshoz a belső standardként szolgáló melibiózból ( $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc) 0,025 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú törzsoldatot készítettem. Az árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidokat [laminaribióz (G3G), 3-O- $\beta$ -cellobiozil-D-glükopiranóz (G4G3G) és 3-O- $\beta$ -cellotriozil-D-glükopiranóz (G4G4G3G)] ebben a törzsoldatban oldottam fel úgy, hogy koncentrációjuk 0,001 és 0,1 mg ml<sup>-1</sup> között változott, így hét különböző koncentrációjú standard oldathoz jutottam. A bemért szénhidrátokat a tömegmérés előtt P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fölött, vákuum alkalmazása mellett tíz napig szárítottam. Az adatgyűjtést, feldolgozást és kiértékelést Chromeleon [6.8 (Dionex)] szoftverrel végeztem. Az összes kalibrációs görbe másodfokú függvényekkel leírható volt ( $R^2 = 0.98-0.99$ ).

#### 4.6.4.3 Az enzimoldat membránszűrése

Mivel az alkalmazott  $\beta$ -glükozidáz enzimkészítmény kis mennyiségben glükózt és szacharózt tartalmazott, a továbbiakban elvégzett vizsgálatok előtt a használni kívánt enzimoldattól ezeket el kellett választanom. Az elválasztáshoz egy centrifugális membránszűrő egységet használtam (Millipore, Amicon Ultra-4, 10K). Az enzimből 5 ml 8,2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú vizes oldatot készítettem, amit a membránszűrő egységbe helyeztem, majd 4000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltam. A szűrés után a retentátumot, a későbbiekben is alkalmazott 0,02 M töménységű és pH 5,50 kémhatású nátrium-acetát pufferrel hígítottam vissza a kiindulási koncentrációra (a permeátum tömegmérése alapján). A bemutatott szűrési műveletet még egyszer megismételtem, hogy a HPAEC-PAD rendszerrel való mérés alapján glükóz és szacharóz mentes 8,2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldatot kapjak a további vizsgálatok számára.



#### 4.6.4.4 Az enzimkészítmények működésének vizsgálata a tiszta árpa $\beta$ -glükán oligo- és diszacharid szubsztrátokon

Natív enzim esetén: A kinetikai paraméterek meghatározásához használt reakcióelegyek olyan 5 ml térfogatú 0,02 M töménységű és pH 5,50 kémhatású nátrium-acetát puffer oldatok voltak, amelyek G3G szubsztrátra 2,5 mg ml<sup>-1</sup>, G4G3G szubsztrátra 1,5 mg ml<sup>-1</sup> és G4G4G3G szubsztrátra nézve pedig 0,6 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjúak voltak. A reakciókat 0,015, 0,3 és 0,36 ml 8,2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú membránszűrt enzimoldattal indítottam és 23 °C hőmérsékleten 150 rpm fordulatszámon rázattam őket. A reakcióelegyeket és az enzimoldatot is egy adagoló fecskendőhöz kapcsolt szűrőn (0,22  $\mu$ m) való átpréseléssel sterilizáltam a felhasználás előtt. A G3G és G4G3G szubsztrátokat tartalmazó reakcióelegyekből 0,05 ml mintát vételeztem a következő időpontokban: 1, 10, 20, 30, 60, 120 és a 210. percben, amíg a G4G4G3G szubsztrát esetén szintén 0,05 ml minták kerültek kivételre a: 1, 60, 120, 240, 300, 390, 480 és az 580. percben. A kivett mintákat olyan mérési elegyekbe helyeztem, amelyek 0,5 ml acetonitrilt (ami 4 % alá tudta csökkenteni az enzimaktivitást), 0,05 ml 0,5 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú melibióz oldatot és 0,4 ml vizet tartalmaztak. A mérési elegyeket ezután 2 percig forraltam, hogy teljes mértékben inaktiváljam az enzimet, majd újboli szűrést (0,22  $\mu$ m) követően 20  $\mu$ l térfogatot injektáltam a HPAEC-PAD rendszerbe.

Rögzített enzim esetén: A kinetikai paraméterek meghatározásához használt reakcióelegyek a G3G és a G4G3G szubsztrátok esetén olyan 3,5 ml, amíg a G4G4G3G szubsztrát esetén 3 ml térfogatú 0,02 M töménységű és pH 5,50 kémhatású nátrium-acetát puffer oldatok voltak, amelyek G3G szubsztrátra 1,5 mg ml<sup>-1</sup>, G4G3G szubsztrátra 1 mg ml<sup>-1</sup> és G4G4G3G szubsztrátra nézve pedig 0,5 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjúak voltak. A reakciókat 130, 335 és 387 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam és 23 °C hőmérsékleten 150 rpm fordulatszámon rázattam őket. A reakcióelegyeket itt is szűréssel (0,22  $\mu$ m) sterilizáltam a felhasználás előtt. A G3G és G4G3G szubsztrátokat tartalmazó reakcióelegyekből 0,05 ml mintát vételeztem a következő időpontokban: 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 150 és a 240. percben, amíg a G4G4G3G szubsztrát esetén szintén 0,05 ml minták kerültek kivételre a: 1, 60, 120, 180, 270, 390, 540 és az 720. percben. A kivett mintákat olyan mérési elegyekbe helyeztem, amelyek 0,5 ml acetonitrilt (ami 4 % alá tudta csökkenteni az enzimaktivitást), 0,05 ml 0,5 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú melibióz oldatot és 0,4 ml vizet tartalmaztak. A mérési elegyeket ezután 2 percig forraltam, hogy teljes mértékben inaktiváljam az enzimet, majd a már bemutott szűrési (0,22  $\mu$ m) eljárást követően 20  $\mu$ l térfogatot injektáltam a HPAEC-PAD rendszerbe.

#### 4.6.4.5 Az *Endo-(1→3),(1→4)-β-D-glükán-4-glükánhidroláz* (glükánáz) által hidrolizált árpa β-glükán előállítása

A működési és kinetikai vizsgálatokhoz szubsztrátként szolgáló glükánáz (Megazyme, Lot 41001) hidrolizált árpa β-glükán előállításához a Megazyme által forgalmazott magas viszkozitású, tisztított árpa β-glükánt használtam. Ebből a vízoldható β-glükánból 200 mg mennyiséget 100 ml szobahőmérsékletű vízben elkevertem, amit aztán 95 °C hőmérsékleten kevertettem a β-glükán teljes oldódásának eléréséig. Ezután az oldatot keverés közben 50 °C hőmérsékletre hűtöttem és 10 ml nátrium-foszfát puffert (20 mM, pH 6,50) adtam hozzá, majd 5 ml 0,15 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú glükánáz enzimoldatot (250 U) mértem bele. Ezt az oldatot az enzimkezelés 3 órás ideje alatt 50 °C hőmérsékleten kevertettem. Az így kapott β-glükán hidrolizátumot 5 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem, hogy inaktiváljam az enzimet. A hidrolizátumot szobahőmérsékletre hűtöttem és 3000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltam. A felülúszóhoz 28 ml nátrium-acetát puffert (0,1 M, pH 5,40) adtam, így olyan nátrium-acetát pufferoldathoz (0,02 M, pH 5,50) jutottam, amely a β-glükózidáz enzim számára optimális pH érték biztosítása mellett (pH 5,50) tartalmazta a szubsztrátként szolgáló β-glükán hidrolizátumot.

#### 4.6.4.6 Az enzimkészítmények működésének vizsgálata a glükánáz által hidrolizált árpa β-glükánon

Natív enzim esetén: A kinetikai paraméterek meghatározásához használt reakcióelegy az előbb bemutatott 15 ml β-glükán hidrolizátumból állt. A reakciót 0,6 ml 8,2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú membránszűrt enzimoldattal indítottam. A reakcióelegyet 360 percig rázattam (150 rpm) 23 °C hőmérsékleten. A reakcióelegyet és az enzimoldatot is ugyancsak szűréssel (0,22 μm) sterilizáltam a felhasználás előtt. A reakcióelegyből 0,1 ml mintát vételeztem a következő időpontokban: 0, 4, 10, 20, 30, 60, 120, 240 és a 360. percben. A kivett mintákat olyan mérési elegyekbe helyeztem, amelyek 0,5 ml acetonitrilt, 0,05 ml 0,5 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú melibióz oldatot és 0,35 ml vizet tartalmaztak. A további lépések az előzőekben (4.6.4.4) leírtakkal megegyezők voltak.

Rögzített enzim esetén: A kinetikai paraméterek meghatározásához használt reakcióelegy az előbb bemutatott 7 ml β-glükán hidrolizátumból állt. A reakciót 676 mg nedves állapotú rögzített enzimkészítménnyel indítottam. Az elegyet 780 percig rázattam (150 rpm) 23 °C hőmérsékleten. A reakcióelegyeket ugyancsak szűréssel (0,22 μm) sterilizáltam a felhasználás előtt. A reakcióelegyekből 0,05 ml minta lett eltávolítva a következő időpontokban: 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 127, 170, 250,

330, 450, 600, 690 és a 780. percben. A kivett mintákat olyan mérési elegyekbe helyeztem, amelyek 0,5 ml acetonitrilt, 0,05 ml 0,5 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú melibióz oldatot és 0,4 ml vizet tartalmaztak. A további lépések az előzőekben (4.6.4.4) leírtakkal megegyezők voltak.

#### **4.7 Mérési eredményeim reprodukálhatósága**

Bemutatott mérési eredményeimet – a nagyszámú vizsgálat miatt – két parallel mérés átlagából határoztam meg, ahol minden esetben a két eredmény közötti eltérés 5 % értéken belül volt.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

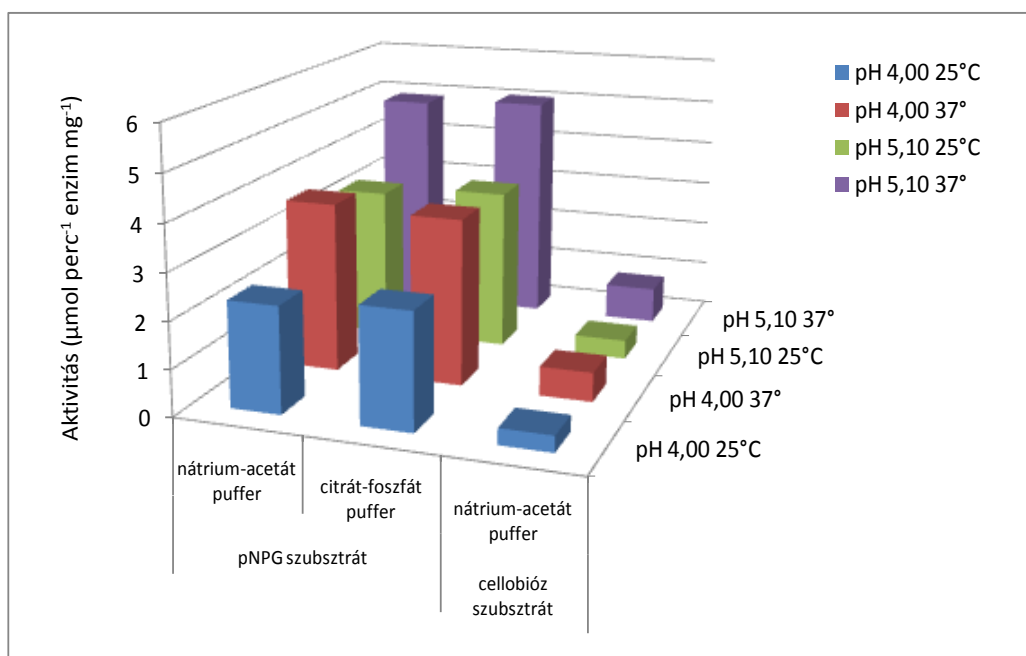
### 5.1 A $\beta$ -glükózidáz enzim aktivitásmérési módszerének kiválasztása és az aktivitásmérés paramétereinek meghatározása

A  $\beta$ -glükózidáz aktivitásának mérésére több módszer áll rendelkezésre, természetes vagy mesterséges  $\beta$ -*O*-glükózidok hidrolízisével. Kísérleti munkám első lépéseként az enzimaktivitás meghatározására szolgáló irodalmi módszerek közül, ki kellett választanom azt a mérési módszert, amely az enzimrögzítési eljárás vizsgálata és kidolgozása során a leggyorsabban, megbízhatóan és a legkisebb költségfordítással, számomra megfelelő pontosságú eredményt szolgáltat. Ezek alapján a 2.1.3 fejezetben ismertetett két mérési módszert találtam alkalmasnak arra, hogy kísérleti munkám során használjam őket. Az egyik esetben a cellobióz szubsztrátból a reakció során felszabaduló glükóz mennyiségét határoztam meg közvetett módon, amíg a másik esetben *p*-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozidot (pNPG) használtam szubsztrátként és a felszabaduló *p*-nitro-fenolt közvetlenül fotometráltam.

A két mérési módszer összehasonlításához a 4.2.1 pontban bemutatott Sigma enzimmészítményt használtam és az enzimaktivitás méréseket pedig a 4.5.1 fejezetben leírtak alapján végeztem el. Az összehasonlító vizsgálatokhoz a mérés körülményeit a következő megfontolások alapján választottam meg:

- puffer oldat: a kísérleteket kétféle anyagi minőségű puffer oldatban végeztem el, egyrészt a tanszéki tapasztalat alapján a  $\beta$ -glükózidáz aktivitásmérésére legalkalmasabbnak talált nátrium-acetát, másrészt pedig az irodalomban említett citrát-foszfát puffert alkalmaztam [GUEGUEN et al., 1997].
- pH érték: a méréseket két különböző pH értéken végeztem el. Mivel a vizsgálat előtt a használt enzimmészítmények pH optimumainak meghatározását még nem hajtottam végre, ezért tanszéki tapasztalat alapján, a cellobióz szubsztrát használata esetén optimálisnak talált pH 5,10 értéket választottam optimális pH értéként. A méréseket elvégeztem pH 4,00 értéken is, mivel ezzel kívántam modellezni többek között a borokban is tapasztalható savas körülményeket.
- hőmérséklet: a vizsgálatokat szobahőmérsékleten (25 °C) és a használt enzimmészítményre nézve optimálisnak tekintett 37 °C hőmérsékleten is elvégeztem.

Az eredményeket a 5. ábra mutatja be.

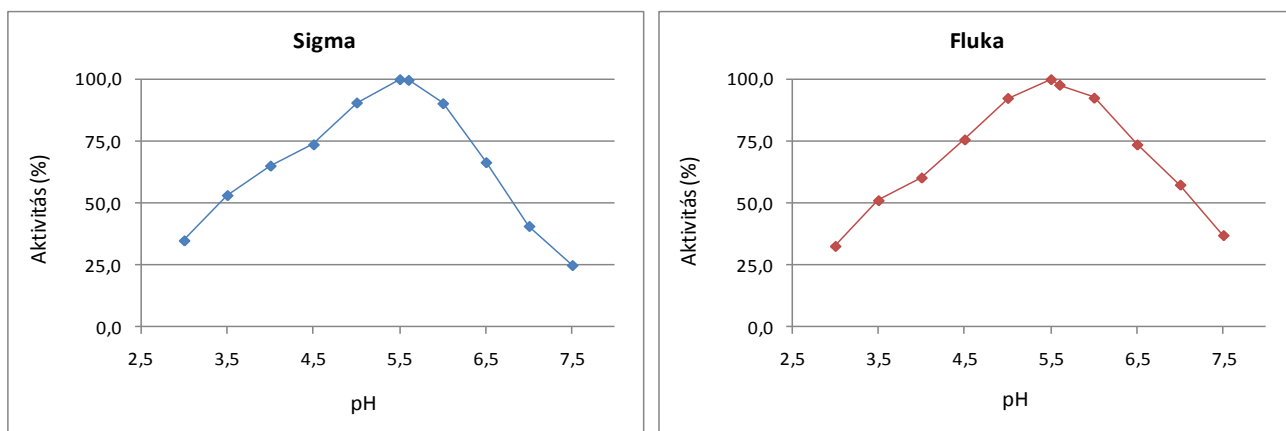


**5. ábra**

A különböző mérési módszerek összehasonlítása.

A kísérletek során szerzett tapasztalataim alapján kijelenthető, hogy mind költségfordítás szempontjából, mind pedig a mérés időigényét tekintve a pNPG szubsztrátot alkalmazó módszer számomra előnyösebb volt. A mérési eredményekből kitűnik, hogy a használt puffer anyagi minősége sem a pH érték, sem pedig a hőmérséklet tekintetében jelentős eltérést nem okozott az enzimaktivitások értékeiben. Ezért a további enzimaktivitás méréseim során minden esetben a pNPG szubsztrátot használtam, 0,1 M töménységű nátrium-acetát puffer alkalmazása mellett. Amennyiben az előbb ismertetett paramétereket megváltoztattam, arra az adott fejezetben külön kitérek.

Meg kellett még határoznom, hogy a használt enzimmészítmények (Sigma és Fluka termékek), a pNPG szubsztrát alkalmazása esetén milyen pH értéken rendelkeznek maximális aktivitással. A méréseket a 4.5.5 fejezetben leírtak alapján végeztem el 25 °C hőmérsékleten. Az egyes enzimmészítmények aktivitásainak pH függését az 6. ábra mutatja be.



**6. ábra**

Az alkalmazott enzimmészítmények aktivitásainak pH függése.

Mind a két használt enzimmészítmény esetében azt tapasztaltam, hogy az alkalmazott szubsztrát mellett pH 5,50 értéken rendelkeztek maximális aktivitással, ezért a továbbiakban minden aktivitásmérést az oldott enzimre nézve optimálisnak tekinthető pH 5,50 értéken végeztem, valamint minden kísérlet során a Fluka által forgalmazott enzimmészítményt használtam.

A fentiek során kiválasztott mérési módszer és meghatározott paraméterek mellett (0,1 M nátrium-acetát puffer pH 5,50 pNPG-re nézve 10 mM töménységű, 25 °C hőmérsékleten), a Fluka által előállított  $\beta$ -glükózidáz enzim aktivitása  $10,54 \mu\text{mol perc}^{-1} \text{ enzim mg}^{-1}$ , amíg a Sigma termék aktivitása  $3,64 \mu\text{mol perc}^{-1} \text{ enzim mg}^{-1}$  értéknek adódott.

## 5.2 Rögzítési eljárás vizsgálata

Az enzimirögzítési eljáráshoz alkalmazott és a 4.2.2 pontban bemutatott hordozó kiválasztásánál, gyakorlati, technológiai és tudományos szempontokat is figyelembe vettem:

- a hordozó kiválasztása során, biztos kiindulási pontot jelentett, hogy korábban már alkalmazták hordozóanyagként szénhidrátok hidrolizálására szolgáló enzimkeverék rögzítéséhez [CSANÁDI, 2008].
- a hordozóként használt anioncserélő gyanta előnyei a jó mechanikai tulajdonság, az egyszerű regenerálhatóság, emellett nem elhanyagolható szempont egyéb, kifejezetten enzimirögzítésre kifejlesztett hordozókkal szemben az alacsony ára és, hogy itthon is könnyen hozzáférhető.

- tudományos szempontból az említett hordozó használatának jelentősége, hogy korábban még a  $\beta$ -glükózidáz enzim rögzítéséhez való felhasználására nem került sor.

Rögzítési kísérleteim során egy olyan kombinált rögzítési eljárást alkalmaztam, ahol első lépésként az enzimet adszorbeáltattam a hordozó pórusszerkezetéhez, amely során Van der Waals kötések, ionos kötések és hidrogénhidak alakulhatnak ki a hordozó és az enzimmolekula között. Ezek a kötések – különösen a magas ion és szubsztrát koncentráció esetén – nem elég stabilak, ezért a rögzítési eljárás második lépésében glutáraldehydes kezelést alkalmaztam, ami egy stabilabb fehérje-struktúra kialakulását eredményezi, a hordozón levő fehérjemolekulák összekapcsolása révén. Ez a szerkezet a leoldódási veszély csökkenéséhez vezet [D’SOUZA & KUBAL, 2002; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005]. Az utóbbi lépésben tehát a glutáraldehyd, mint kötőágens segítségével, a felülethez adszorpciósan kötődő fehérjemolekulák között kovalens kötések alakítottam ki Schiff-bázis képzési reakció alapján, egyfajta „enzimhálót” hozva létre ezzel a hordozóanyag felületén. Ennek a „hálónak” és így a biokatalizátornak a stabilitása annál nagyobb, minél több a kötések száma, amelyek a glutáraldehyd koncentrációjának és a kezelés idejének emelésével növelhetők. Ugyanakkor a túlzottan magas glutáraldehyd koncentráció kedvezőtlen hatásokkal is járhat, mivel esetlegesen az enzim aktív centrumában vagy annak közelében kötődve a biokatalizátor inaktiválódását okozhatja.

Az immobilizálási eljárás kidolgozása során az említett két rögzítési lépés kedvező paramétereinek megállapítását külön-külön végeztem el, és ezek alapján határoztam meg a kombinált rögzítési eljárás számára előnyös feltételeket.

### ***5.2.1 A rögzítési vizsgálatok során alkalmazott kinetikus-leoldódási vizsgálat elve***

Az irodalomban jól ismert és a gyakorlatban is alkalmazott módszer, hogy a rögzítési eljárás után a rögzített enzimmérsítményt addig mossák meghatározott módon, amíg a mosófolyadékban enzim már nem mutatható ki [GARGOURI et al., 2004]. Általában, az így előállított készítmény aktivitásának és stabilitásának meghatározását az előbb említett eljárás után végzik el. A módszer alkalmazása esetén azonban nem kapunk információt a kialakult kötőerő tulajdonságairól, valamint gyengébb kötések esetén további leoldódással lehet számolni az enzimpkészítmény, szubsztrátot tartalmazó közegbe való helyezésekor. Az irodalomban az enzim stabilitásán, általánosságban a katalitikus aktivitás stabilitását értik. A továbbiakban stabilitás alatt az enzim, hordozóhoz való kötődésének erősségét és ennek a kapcsolat meglétének tartósságát fogom érteni.

A rögzített enzimek működési stabilitásának vizsgálatára korábban olyan irodalmi módszert alkalmaztak [ESAWY & COMBET-BLANC, 2006; KAPOOR & KUHAD, 2007], amelynek lényege, hogy a

rögzített enzimet az ipari alkalmazás körülményei között több ciklusban használják fel, és aktivitását a ciklusok végén meghatározzák. Ebben az esetben, a technológiától függően az egyes ciklusok túl sok időt vesznek igénybe (órákat, napokat) ahhoz, hogy a rögzült enzimfehérje leoldódásának és/vagy inaktiválódásának kinetikája nyomon követhető, ezáltal a kialakult kötődési erő jellemezhető legyen. Ezért egy speciális módszer kidolgozása volt szükséges az általam alkalmazni kívánt kétlépéses, kombinált rögzítési technika vizsgálatához. Az előbb bemutatott működési stabilitás vizsgálat átdolgozásával megalkottam a számomra megfelelő ún. kinetikus-leoldódási vizsgálatot [RADVA et al., 2011], amellyel egyszerre határozható meg az immobilizált enzimkészítmény aktivitása és a „rögzült enzimaktivitás leoldódása” alapján annak stabilitása. Az eljárás lényege, hogy a jellemezni kívánt preparátumot közvetlenül a rögzítési eljárás után, több aktivitásmérési cikluson keresztül vizsgáljuk, a 4.5.3 fejezetben ismertetett módon. A ciklusok során, a rögzített enzimkészítmény aktivitás értékeinek változása alapján lehet következtetni a hordozó és az enzimmolekula között kialakult kötőerő tulajdonságaira. Az egyes aktivitásmérési elegyekben a kezelés hatására „leoldódott enzimaktivitás” is meghatározásra került, amely alapján következtetni lehetett, hogy a rögzített készítmény esetleges aktivitáscsökkenésének hátterében az enzimfehérje hordozón történő inaktiválódása, vagy pedig a felületről való leoldódása állt.

Ez a módszer különösen jól alkalmazható volt az általam használt rögzítési eljárás vizsgálatára (az első lépésben gyengébb adszorpciós kötések alakítottam ki a hordozó és az enzimmolekula között, majd az így rögzített enzim stabilitását glutáraldehydes kezeléssel növeltem), mivel a két eltérő kémiai kötés kialakításához szükséges paraméterek, elkülönítve voltak vizsgálhatók. A módszer tehát lehetővé tette, hogy nyomon kövessem az immobilizálási eljárás egyes lépéseinek és a környezet paramétereinek hatását a rögzített enzimkészítmény aktivitására és stabilitására.

### ***5.2.2 Adszorpciós rögzítési eljárás vizsgálata***

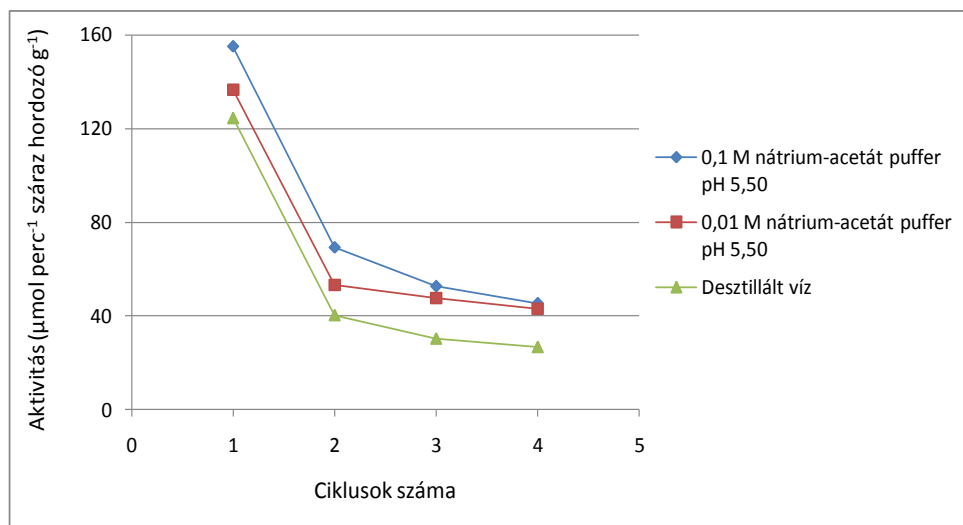
A kombinált rögzítési eljárás vizsgálatának első lépéseként, az adszorpciós kötődés kialakulását befolyásoló paraméterek vizsgálatát végeztem el, amelynek során a pH, só koncentráció, hőmérséklet és a szubsztrát jelenlétének hatását vizsgáltam. Ebben a fejezetben fogom továbbá bemutatni a kinetikus-leoldódási vizsgálat gyakorlati alkalmazását és az enzim-hordozó között kialakuló adszorpciós kötésekre jellemző leoldódási kinetikát is.



### 5.2.2.1 A pH és a só koncentráció hatása az adszorpciós kötődés kialakulására

Általánosan elmondható, hogy a gyenge kötőerők miatt, az adszorpciós kötések kialakulását és stabilitását mind a közeg só koncentrációja, mind pedig kémhatása nagyban befolyásolja [BALLESTEROS et al., 1994]. Ezért az adszorpciós rögzítési eljárások során az alacsonyabb töménységű puffer oldatok használata ajánlatos [WOODWARD, 1985]. Ezen megfontolások alapján szerettem volna megállapítani, hogy az általam használt hordozó és enzim esetében hogyan befolyásolja a közeg kémhatása és só koncentrációja a rögzítés hatásfokát.

A rögzítési eljárást a 4.4.2 fejezet alapján végeztem el, amely során mindig 20 mg száraz állapotú hordozót mértem ki és ezekre külön-külön 1 ml vizet, 0,01 M és 0,1 M töménységű nátrium-acetát puffert (pH 5,50) mértem, amelyek mindegyike 2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú volt az enzimre nézve. A ráztatás végén a rögzített enzimet szűrtem, mostam (minden esetben a rögzítéshez használt közeggel), majd a 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam. Az eredményeket a 7. ábra mutatja be.



**7. ábra**

A közeg kémhatásának és só koncentrációjának hatása az adszorpciós rögzítésre.

A rögzítési eljárás után, a mosófolyadékok enzimaktivitása alapján megállapítható volt, hogy a mosási eljárás nem okozott enzim leoldódást (vagy csak inaktiválódott enzimek oldódtak le). Minden esetben addig végeztem a vizsgálatokat, amíg a rögzített enzim aktivitása az előző ciklusban mért

aktivitással közel megegyező nem volt (ez általában négy enzimaktivitás mérési ciklus végrehajtását jelentette). Itt szeretném bemutatni a kinetikus-leoldódási vizsgálat során tapasztalható, az adszorpciós kötődésre általánosan jellemző „aktivitás leoldódás” kinetikáját, a használt aktivitásmérési kémhatás mellett (pH 5,50). A rögzítési eljárás után, minden esetben az első aktivitásmérési ciklusban tapasztalható a legnagyobb aktivitás, amely aktivitás a következő ciklusok során egy fordított telítési görbéhez hasonló módon csökken. Ennek hátterében többek közt az adszorpciós kötődésben résztvevő különböző erősségű kötések állhatnak. A vizsgálatok során minden esetben a ciklusok végén, az aktivitásmérési elegyek felülúszóinak aktivitását is meghatároztam, amelyekből szintén az enzimleoldódás mértékére lehetett következtetni, és eredményei igazolták a leoldódás mértékének csökkenő kinetikáját. Az adszorpciós kötődés vizsgálatai során, a leoldódási kinetikán túl, számomra az első ciklusban mérhető aktivitás volt a legfontosabb, mivel tulajdonképpen ezt a felvitt aktivitást stabilizáltam a rögzítési eljárás második lépésében a glutáraldehides kezeléssel.

Az eredmények alapján nem várt módon a töményebb (0,1 M) nátrium-acetát puffer alkalmazása esetén mértem a legnagyobb aktivitás értéket az első ciklusban. Ennek hátterében a só koncentráció pH befolyásoló hatása állhatott. Megfigyeltem, hogy a magasabb só koncentráció, magasabb pH értéket eredményezett a rögzítési eljárás végére az elegyben, amelynek oka egy részleges hidroxid-actát anion csere lehetett a hordozó és a közeg között. A pH 5,50 és 0,1 M koncentrációjú nátrium-acetát puffer esetén az elegy pH értéke a rögzítési eljárás végén 8,2, a 0,01 M koncentrációjú (pH 5,50) esetén 7,5, amíg a víz esetében a pH érték változatlan (7,0) volt. A  $\beta$ -glükózidáz enzim izoelektromos pontja pH 5,5, ezért az előlött elhelyezkedő pH értékek mellett az enzim negatív töltéssel rendelkezik. Mivel a só koncentrációjának emelése a közeg pH értékét is emelte, ezért az enzim felületén is nagyobb negatív töltés keletkezhetett, amely elősegíthette az enzim kötődésének mértékét az anioncserélő felületéhez.

GÓMEZ és munkatársai (2009)  $\beta$ -glükózidáz enzim SBA-15 szilikagélre való adszorpciós rögzítése során szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a rögzítési elegy pH értékének helyes megválasztása az elsődleges szempont. Esetükben a legjobb eredmény a rögzítési elegy pH 3,5 értéke mellett volt elérhető, ahol a hordozó negatív, amíg az enzim pozitív töltéssel rendelkezett.

A továbbiakban tehát rögzítési közegként minden esetben 0,1 M nátrium-acetát puffert (pH 5,50) használtam.

#### 5.2.2.2 A hőmérséklet hatása az adszorpciós kötődés kialakulására

Mivel az adszorpciós kötések kialakulására és stabilitására nem csak az előbb vizsgált só koncentráció és kémhatás, hanem a rögzítés során fenntartott hőmérséklet is hatással lehet [BALLESTEROS et al., 1994], ezért megvizsgáltam, hogy a különböző hőmérsékleten végzett rögzítési eljárások hogyan befolyásolják a hordozóra felvihető aktivitásértékeket. A rögzítési eljárást a 4.4.2 fejezet alapján végeztem el, amely során 20 mg száraz állapotú hordozót mértem ki és ehhez 1 ml 2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldatot adtam. A 24 órás rázatást (150 rpm) 25 °C és 10 °C hőmérsékleten végeztem el, ami után a rögzített enzimet szűrtem, mostam, majd a 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam.

Az eredmények alapján, a rögzítés során alkalmazott hőmérséklet sem a felvihető aktivitásban, sem pedig a leoldódás kinetikájában számottevő eltérést nem okozott. Feltételezésem szerint a hőmérséklet csak az adszorpciós kötések kialakulásának sebességére lehetett hatással.

GÓMEZ és munkatársai (2009)  $\beta$ -glükózidáz enzimet rögzítettek adszorpciósan SBA-15 szilikagélre, és azt tapasztalták, hogy szobahőmérsékleten adott hordozóra a maximálisan rögzíthető fehérjemennyiség eléréséhez 7 óra volt szükséges. Ezért az adszorpciós rögzítés sebességére vonatkozó vizsgálatokat nem folytattam, mivel az adszorpciós enzimrögzítési lépéshez minden esetben 24 órás kezelési időt alkalmaztam.

Az eredmények ismeretében, a rögzítési eljárást a továbbiakban szobahőmérsékleten végeztem el.

#### 5.2.2.3 Szubsztrát jelenlétének hatása az adszorpciós kötődés kialakulására

A rögzítési eljárás során az enzim aktív konformációját stabilizálni képes szubsztrát jelenléte előnyös lehet, amelyet az Alkalmazott Kémia Tanszéken folytatott korábbi munkák már igazoltak [BALOGH et al., 2004], ezért meg kívántam határozni, hogy az általam alkalmazott adszorpciós rögzítésre milyen hatást gyakorol a szubsztrát jelenléte. A rögzítési eljárást a 4.4.2 fejezet alapján végeztem el, amely során 20 mg száraz állapotú hordozót mértem ki és erre 1 ml 2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú enzimoldatot mértem. A 24 órás rázatást szubsztrát jelenléte nélkül és szubsztrát jelenlétében is elvégeztem. Mivel az enzimaktivitás mérések során alkalmazott pNPG szubsztrát jelenlétében az enzimaktivitás magasabb, mint a cellobióz szubsztrát mellett és a mesterséges szubsztrát használata költségesebb is, ezért a rögzítési eljáráshoz cellobiózt használtam szubsztrátként,

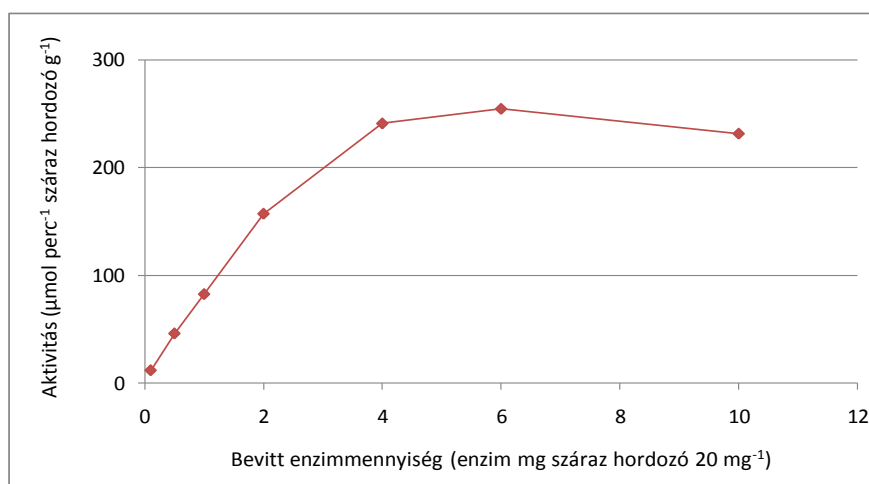
amellyel a rögzítési elegyet képző enzimoldatot 25 °C hőmérsékleten telítettem. A rögzített enzimet a folyamat végén szűrtem, mostam, majd a 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam.

Mivel a kezelés során jelen levő szubsztrát sem a rögzült aktivitás értékére, sem pedig a leoldódás kinetikájára nem gyakorolt hatást, ezért a további rögzítési kísérleteim során az adszorpciós kötések kialakításához szubsztrátot nem alkalmaztam.

#### *5.2.2.4 A hordozóhoz adszorpciósan rögzíthető aktivitás és enzimfehérje mennyiség meghatározása*

A hordozó maximális enzimerhelése azt a legnagyobb elérhető enzimaktivitást jeleníti, amelyet adott mennyiségű hordozón rögzíteni lehet. Fontos a nagy enzimerhelés elérése, mert ezzel csökkenteni lehet a szükséges bioreaktor-térfogatot, azonban egyes esetekben a nagy enzimerhelés elérése aránytalanul nagymértékben növelheti a rögzített enzimmennyiség előállításának költségét. Hogy a hordozó mennyire terhelhető fehérjével, az egyrészt a hordozón elhelyezkedő, hozzáférhető aktív csoportok számától, másrészt a hordozó fajlagos felületétől és a fehérjemolekula méretétől függ.

Ebben a vizsgálatban, az előbbieken meghatározott kedvező paraméterek alkalmazása mellett, a rögzítési elegy anyag- és aktivitásviszonyainak változtatásával a kedvező enzim-hordozó arányt, valamint a hordozóra maximálisan felvihető aktivitást kívántam megállapítani. Az adszorpciós rögzítési eljárást a 4.4.2 pontban ismertetett módon végeztem el, amely során minden esetben 20 mg száraz állapotú hordozóhoz, 1 ml 0,1 M nátrium-acetát (pH 5,50) pufferrel kialakított enzimoldatot adtam. Az így bevitt enzimmennyiségek 0,1–10 mg értékek között változtak. A rögzítési eljárás után, meghatároztam az első ciklusban mérhető enzimaktivitásokat, valamint ezek alapján a rögzítés hozamát és az egyes rögzítési elegyek felülúszójának a rögzítés végén tapasztalható aktivitását. Az első ciklusban mért enzimaktivitásokat a 8. ábra mutatja be.



**8. ábra**

A hordozóra adszorpciósan felvihető enzimaktivitások.

**1. táblázat:** Az adszorpciós kötődés esetén tapasztalható rögzítési hozamok és a rögzítési elegyek, rögzítés végén tapasztalható aktivitás értékei.

Bevitt enzim mennyiség (enzim mg száraz hordozó 20 mg <sup>-1</sup> )	0,1	0,5	1	2	4	6	10
Rögzítés hozama (%)	22,5	20,7	18,6	17,7	13,6	9,6	5,22
Rögzítési elegyek, rögzítés végén mérhető aktivitása (μmol perc <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	0,03	0,24	1,65	2,96	8,38	21,17	40,17

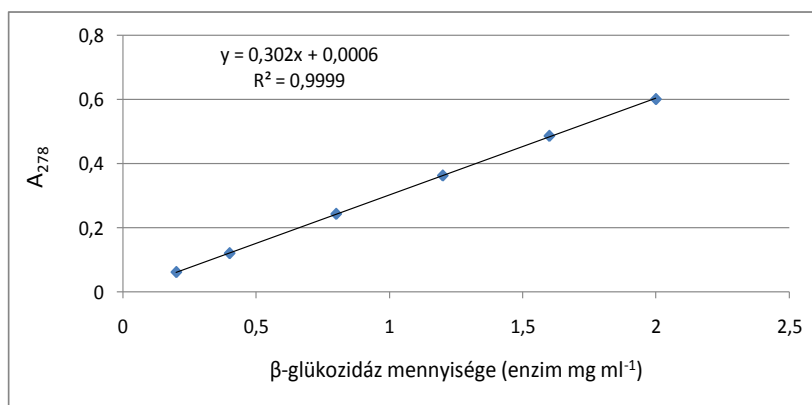
Adott mennyiségű hordozó esetében tehát azt vizsgáltam, hogy a bevitt enzim mennyiség növelésével hogyan változik a rögzült aktivitás. Kezdetben ez az összefüggés megközelítőleg lineáris növekedést mutatott, majd nagyobb enzim mennyiségek esetében az aktivitások növekedésének mértéke csökkent, amíg egy maximális érték elérése után a rögzített enzimaktivitás csökkenő tendenciát mutatott. Ez a csökkenés azáltal is bekövetkezhetett, hogy a fehérjemolekulák összetorlódása a hordozó felületén csökkentette a szubsztrát hozzáférhetőségét az enzimmolekulák számára [ENGASSER & HORVÁTH, 1976]. Ennek másik oka a hordozó pórusszerkezetéből adódó diffúziós problémák, vagy a két említett hatás együttes eredménye is lehetett. A vártak megfelelően az enzimbevitel növelésével a rögzítési elegyek, rögzítés végén tapasztalható aktivitás értékei növekedtek.

A rögzítési eljárás hozamát direkt módon a rögzített aktivitások értékeiből határoztam meg, amiről elmondható, hogy a bevitt enzim mennyiség növelésével csökkent és az így elérhető maximális

hozam 22,5 % volt (1. táblázat). Adott 20 mg száraz hordozó esetében a legnagyobb elérhető aktivitást (a 8. ábra szerint  $254,72 \mu\text{mol perc}^{-1}$  száraz hordozó  $\text{g}^{-1}$ ) 6 mg enzim bevitelével értem el, ahol a rögzítés hozama mindössze 9,6 % volt. Gazdaságossági szempontból azonban a lineárisnak tekinthető szakasz végén elhelyezkedő 2 mg enzim bevitele ajánlott adszorpciós rögzítés esetén, mivel magas aktivitás elérése mellett (a 8. ábra szerint  $157,28 \mu\text{mol perc}^{-1}$  száraz hordozó  $\text{g}^{-1}$ ) a hozam 17,7 %, ezért a további vizsgálataim során is ezt az enzim-hordozó arányt alkalmaztam.

GARGOURI és munkatársai (2004) szintén az adszorpciós rögzítés lehetőségét vizsgálták különböző Amberlite hordozók felhasználásával: Amberlite (IRA 67, XAD 4, XAD 7), olyan  $\beta$ -glükózidáz enzim esetében, amelyet *Sclerotinia sclerotiorum* törzsből izoláltak. A rögzítés hozamai rendre 6,5 %, 1,33 % és 1,6 % voltak, amelyek többnyire gyengébbnek tekinthetők az általam elért hozamoknál (5,22 % - 22,5 %). Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a szerzők sem a rögzítési elegy paramétereinek, sem pedig az enzim-hordozó arányának hatását nem vizsgálták, hanem állandó enzim-hordozó arány [0,1 ml enzimoldat (32 U/ml) - 500 mg hordozó] és rögzítési paraméterek (1 óra kevertetés  $4^\circ\text{C}$  hőmérsékleten) mellett dolgoztak.

Az elvégzett kísérlet során, két különböző mérési módszer segítségével állapítottam meg a hordozóhoz adszorpciósan rögzíthető enzimfehérje mennyiségét. Az egyik esetben a 4.5.2.1 fejezetben leírt módon, a rögzítési elegyek felülúszóinak aktivitása alapján, indirekt módon határoztam meg a rögzült fehérje mennyiségét. A másik, egy az irodalomban is alkalmazott spektrofotometriás módszer (GÓMEZ et al., 2009; WU et al., 2007), amelynek elvi alapja, hogy az aromás aminosavak 280 nm környékén elnyelési csúcsot mutatnak. A módszer gyors és egyszerű, azonban csak ugyanazon fehérjék különböző oldatainak összehasonlítására alkalmas. Az általam használt oldott  $\beta$ -glükózidáz 277 nm és 279 nm között mutatott elnyelési maximumot, ezért az irodalmi gyakorlattól eltérő módon, 280 nm helyett 278 nm hullámhosszon határoztam meg a különböző oldatok abszorbanciája alapján a  $\beta$ -glükózidáz koncentrációját. A módszerhez tartozó kalibrációt a 9. ábra mutatja be.



**9. ábra**

A β-glükózidáz koncentráció meghatározáshoz tartozó kalibrációs egyenes.

Nem csak az enzimaktivitáson alapuló meghatározáshoz, hanem a spektrofotometriás módszerhez is megfelelő kontroll oldatok alkalmazása volt szükséges. Így az aktivitásmérésen alapuló módszerrel megegyező módon, nem csak a rögzítéshez használttal azonos koncentrációjú enzimoldatokat tettem fel rázatni, a rögzítés idejével megegyező időre, hanem az alkalmazott puffer oldat-hordozó elegyét is. Ez utóbbit használtam vakpróbának a rögzítési elegy felülúszójának spektrofotometriás méréséhez.

**2. táblázat:** A két különböző mérési módszerrel meghatározott rögzült fehérje mennyiségek.

Bevitt enzimmennyiség (enzim mg száraz hordozó 20 mg <sup>-1</sup> )	0,1	0,5	1	2	4	6	10
A rögzült fehérje mennyisége a felülúszó aktivitása alapján (%)	97,3	95,5	86,0	84,3	82,2	74,7	66,8
A rögzült fehérje mennyisége spektrofotometriás meghatározás alapján (%)	n.a.	86,9	81,7	75,6	68,3	62,4	58,6

Az irodalom alapján általánosságban elmondható, hogy a különböző, fehérje mennyiség meghatározására szolgáló módszerek adott fehérje oldat esetén is adhatnak eltérő eredményeket. Én is ezt tapasztaltam a méréseim során (2. táblázat), azonban mind a két mérési módszer esetében megállapítható volt, hogy a várt módon a bevitt enzimfehérje mennyiségének növelésével a rögzült mennyiségek aránya csökkent. A spektrofotometriás módszer azonban kis fehérjekoncentráció esetében nem volt alkalmazható, mivel érzékenysége nem volt elegendő a felülúszó vizsgálatához. Habár mind a két mérési módszer esetén igyekeztem a megfelelő kontroll oldatokat alkalmazni, mégis

előfordulhatott, hogy a 24 órás rázatás során a hordozót is tartalmazó rögzítési elegyben az enzimek inaktiválódása nagyobb volt, mint a hordozót nem tartalmazó kontroll elegyben. Ez lehetett az oka annak, hogy a rögzítési elegy enzimaktivitása alapján, indirekt módon történő meghatározás során nagyobb rögzült fehérjemennyiséget állapítottam meg. Ezek értelmében a spektrofotometriás mérési módszer alkalmasabb lehet a rögzült fehérje mennyiségének meghatározására. A spektrofotometriás vizsgálat további nagy előnye, hogy a mérés gyors és gazdaságos.

### ***5.2.3 A glutáraldehydes kezelési eljárás vizsgálata***

A kombinált rögzítési technika tanulmányozásának második lépéseként annak a glutáraldehydes kezelésnek a vizsgálatát végeztem el, amellyel az adszorpciósan rögzített enzimek kötődését stabilizáltam a hordozóhoz. Mivel a hordozó kémiai szerkezete nem teszi lehetővé, hogy a glutáraldehyddel kovalens vagy más egyéb kémiai kötést alakítson ki, ezért az enzim és a hordozó között glutáraldehyddel kialakított kötés lehetőségét nem vizsgáltam. Feltételezésem szerint a hordozó felületén egymáshoz közel elhelyezkedő enzimek között voltak keresztkötések kialakíthatók. A kezelési idő, kémhatás, glutáraldehyd koncentráció és a szubsztrát jelenlétének hatását vizsgáltam a rögzítés hatásfokára nézve, valamint az enzim-hordozó között, a kombinált rögzítési eljárással kialakítható kötődésre jellemző leoldódási kinetikát is be fogom mutatni. Olyan rögzített enzimkészítmény előállítására törekedtem, amely az oldott enzim esetében optimálisnak tartott pH 5,50 értéken stabilnak tekinthető.

A továbbiakban az adszorpciós rögzítést mindig a következőképpen végeztem el: 20 mg száraz hordozóra 1 ml 2 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) kialakított enzimoldatot mértem, és az elegyet 24 órán keresztül 25 °C hőmérsékleten rázattam (150 rpm). A rögzítés végén a felülúszót dekantáltam és a 4.4.2 pontban leírt módon végeztem el a glutáraldehydes kezelést.

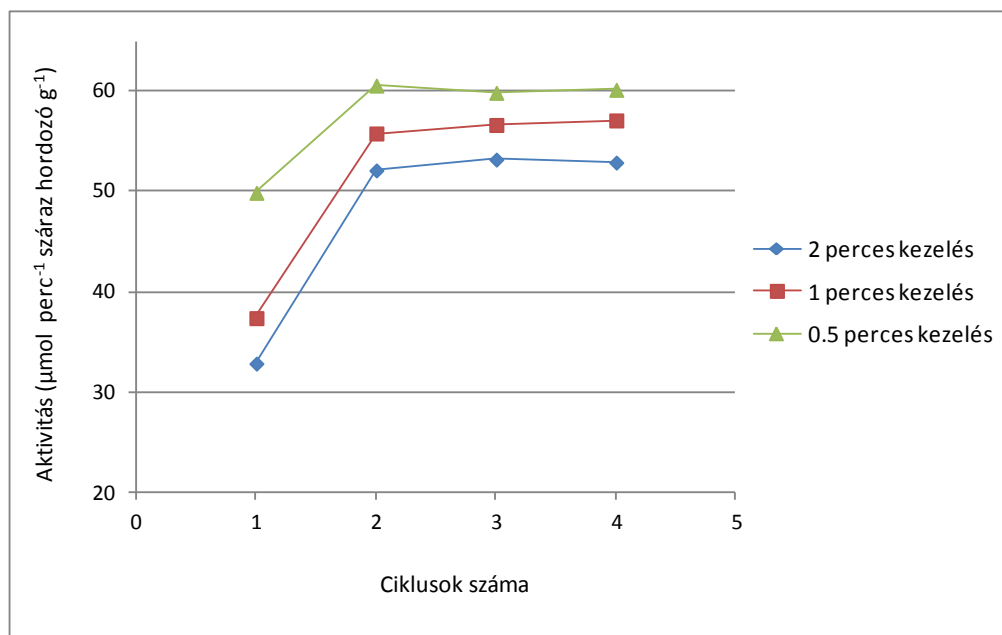
#### ***5.2.3.1 A glutáraldehydes kezelés idejének hatása a rögzítési eljárás hatásfokára***

Az enzimmolekulák közötti keresztkötések kialakításának időtartama fontos tényező, hiszen ennek helyes megállapítása döntően befolyásolja a kialakított enzim-hordozó struktúra stabilitását. Túl rövid ideig tartó kezelés esetében a biokatalizátor stabilitása nem lesz megfelelő, a túl hosszú kezeléskor viszont az enzim aktivitásának csökkenése következhet be. Szénhidrátok hidrolizálására szolgáló enzimkeverék, hasonló eljárással való rögzítése során azt tapasztalták, hogy a glutáraldehydes



kezelés esetében 0,25 % (m/V) koncentrációjú glutáraldehid oldat használata és 15 perces kezelési idő a legmegfelelőbb [CSANÁDI, 2008]. Kísérleteimet ezen adatok alapján kezdtem meg és azt vizsgáltam, hogy a kezelési idő milyen hatással van az elérhető aktivitásra és stabilitásra, adott glutáraldehid koncentráció mellett.

A glutáraldehides kezelést a 4.4.2 fejezetben leírtak szerint a következőképpen végeztem el: az adszorpciós rögzítés után a nedves hordozókhoz 2 ml 0,1 M nátrium-acetát puffert (pH 5,50) adtam, amely glutáraldehidre nézve 0,25 % (m/V) koncentrációjú volt. Az elegyeket adott ideig rázattam (150 rpm), majd a rögzített enzimet szűrtem, mostam és a 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam. Az előkísérletek során az irodalmi adatokkal megegyezően [HERZOG & FAHIMI, 1974] azt tapasztaltam, hogy a glutáraldehides kezelés nagymértékben csökkentette a rögzített enzimek aktivitását, az adszorpciós rögzítés során kapott aktivitásértékekhez képest. Azt is megállapítottam, hogy CSANÁDI (2008) által, hasonló rögzítés során alkalmazott 15 perces glutáraldehides kezelési idő, túlságosan nagymértékű aktivitáscsökkenést eredményezett az általam használt  $\beta$ -glükózidáz enzim esetében, ezért rövidebb kezelési időket alkalmaztam a vizsgálataim során. Az eredményeket az 10. ábra mutatja be.



**10. ábra**

A glutáraldehides kezelési idő hatása a rögzítési eljárás hatásfokára.

Minden esetben addig végeztem a vizsgálatokat, amíg a rögzített enzim aktivitása az előző ciklusban mért aktivitással közel megegyező nem volt (ez az adszorpciós rögzítéssel megegyezően négy enzimaktivitás mérési ciklus végrehajtását jelentette). Itt mutatom be a kinetikus-leoldódási

vizsgálat során tapasztalható, a kombinált rögzítési eljárással kialakítható kötődésre általánosan jellemző „aktivitás leoldódás” kinetikáját, a használt aktivitásmérési kémhatás mellett (pH 5,50). A rögzítést követő aktivitásmérési ciklusok során, kezdetben aktivitásnövekedés volt megfigyelhető, amely után az egymást követő ciklusokban az aktivitás értékek közel állandóak voltak, vagyis pH 5,50 értéken a rögzített enzim stabilnak tekinthető volt. Ez a növekedés feltehetően a glutáraldehiddel rögzített „enzimréteg” kedvező térszerkezeti módosulásának eredménye, amely minden bizonnyal a szubsztrát jelenlétének következménye. A vizsgálatok során minden esetben a ciklusok végén, az aktivitásmérési elegy felülúszójának aktivitását is meghatároztam, ebből az enzimleoldódás mértékére lehetett következtetni. Egyik felülúszó esetében sem volt kimutatható enzimaktivitás ( $<0,01 \mu\text{mol perc}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ), ez arra utal, hogy enzimleoldódás nem történt vagy pedig inaktiválódott enzim oldódott le.

Az eredmények alapján jól megfigyelhető volt a glutáraldehydes kezelés idejének hatása az elérhető enzimaktivitásokra, vagyis a kezelési idő csökkentésével az elérhető aktivitás értékek növekedtek. A kinetikus-leoldódási vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy mind a három alkalmazott kezelési idő mellett pH 5,50 értéken való felhasználáskor stabil enzimkészítményekhez jutottam. Az alkalmazott 0,5 perces kezelési idő viszont annyira rövid, hogy technológiai szempontból nehezen kézben tartható, ezért az 1 perces kezelési időt tekintem kedvezőnek és a további vizsgálataim során is ezt alkalmaztam.

#### *5.2.3.2 Különböző pH értékeken végzett glutáraldehydes kezelés hatása a rögzítési eljárás hatásfokára*

A hidrogénion-koncentráció a rögzítési reakcióelegyekben meghatározza az enzimek aminosav-oldalláncainak reaktivitását [BALLESTEROS et al., 1994], ami hatással lehet az általam alkalmazott glutáraldehydes keresztkötések kialakítására. Ezért meg kívántam határozni, hogy a glutáraldehydes kezeléshez alkalmazott közeg kémhatása hogyan befolyásolja a rögzítés hatásfokát.

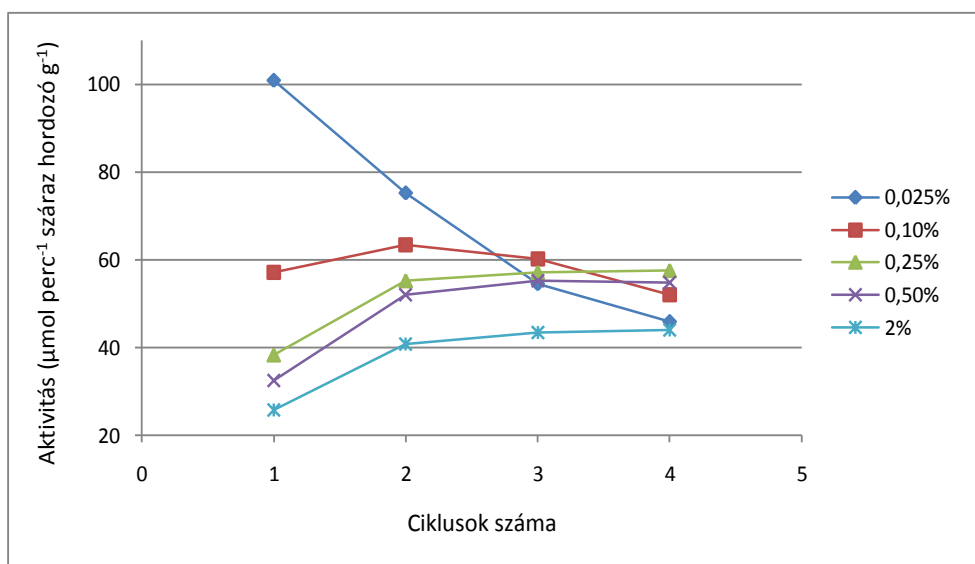
A glutáraldehydes kezelést a 4.4.2 fejezetben leírtak szerint a következőképpen végeztem el: az adszorpciós rögzítés után a nedves hordozókhöz külön-külön 2 ml 0,1 M nátrium-acetát puffert (pH 5,50 és pH 7,50) és 2 ml vizet (pH 7,00) adtam, amelyek mindegyike glutáraldehydre nézve 0,25 % (m/V) koncentrációjú volt. Az elegyeket 1 percig rázattam (150 rpm), majd a rögzített enzimet szűrtem, mostam és a 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam.

Mivel sem a kezeléshez alkalmazott közeg kémhatása sem a só jelenléte az elért aktivitás értékekben eltérést nem okozott, ezért a további rögzítési kísérleteim során a glutáraldehydes kezeléshez 0,1 M nátrium-acetát puffert (pH 5,50) alkalmaztam.

### 5.2.3.3 A glutáraldehid koncentráció hatása a rögzítési eljárás hatásfokára

A rögzítés másik fontos tényezője a keresztkötések kialakítására alkalmazott reagens, munkám esetében a glutáraldehid, megfelelő koncentrációjának megállapítása. Ennek növelésével a kialakított enzim-hordozó struktúra stabilitása növekedhet, azonban túl magas koncentráció esetében az enzim aktív centruma sérülhet és ezáltal a fajlagos aktivitás értéke csökkenhet, továbbá az alkalmazott glutáraldehid koncentráció a kialakított keresztkötések helyét (enzim-enzim vagy adott enzimfehérje alegységei közötti kötések) is befolyásolja [ZABORSKY, 1974; MIGNEAULT et al., 2004]. Ezért főként enzim-enzim keresztkötések kialakítása érdekében, a keresztkötési eljárásokhoz alkalmazott glutáraldehid koncentráció 0,125-10 %(m/V) között szokott változni [BALOGH et al., 2005; CSANÁDI & SISAK, 2006].

Az előzőleg meghatározott paraméterek alkalmazása mellett megvizsgáltam a glutáraldehid koncentrációjának hatását az elérhető maximális aktivitásra, valamint stabilitásra. A glutáraldehydes kezelést a 4.4.2 fejezetben leírtak szerint a következőképpen végeztem el: az adszorpciós rögzítés után a nedves hordozókhoz 2 ml 0,1 M nátrium-acetát puffert (pH 5,50) adtam, amelyek glutáraldehydre nézve adott koncentrációjúak voltak [% (m/V) – ábrán „%” jelölés]. Az elegyeket 1 percig rázattam (150 rpm), majd a rögzített enzimet szűrtem, mostam és a 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam. Az eredményeket az 11. ábra mutatja be.

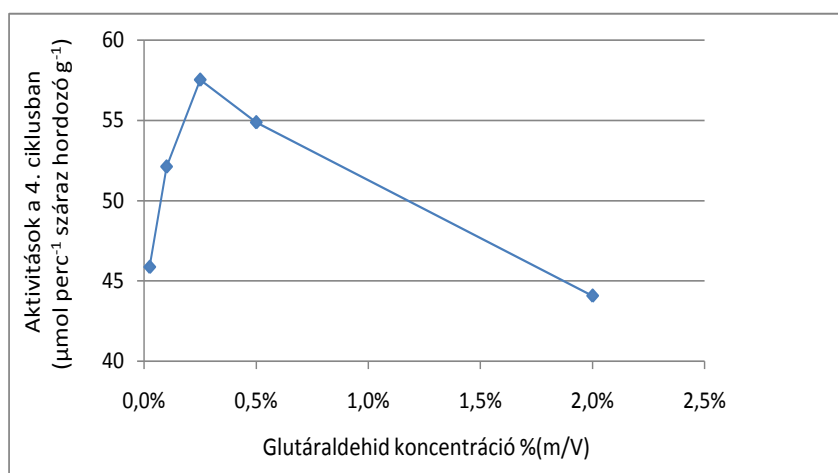


**11. ábra**

A kezeléshez alkalmazott glutáraldehid koncentráció hatása az elérhető aktivitásra és stabilitásra.

A kinetikus-leoldódási vizsgálat eredményei igazolták, hogy adott körülmények mellett a keresztkötések kialakításához használt glutáraldehid koncentrációjának csökkentésével, az elérhető maximális aktivitások növekednek. Ez a növekedés azonban átmeneti, mivel a glutáraldehid koncentrációjának csökkentésével, a felületen elhelyezkedő enzimek között kialakított keresztkötések száma is csökken, ezáltal a kialakított „enzimréteg” veszít stabilitásából. Jól megfigyelhető, hogy amíg 0,25 %(m/V) koncentráció alkalmazása mellett még stabil rögzített enzimkészítményhez jutottunk, addig az alacsonyabb koncentrációk esetén már a rögzült enzimek leoldódásával kellett számolni. A 0,1 %(m/V) koncentráció alkalmazása esetén, a vizsgálat során kezdetben a kombinált rögzítési eljárásra jellemző aktivitásnövekedés volt megfigyelhető, ami a további ciklusok során az adszorpciós kötődésre jellemző leoldódásba ment át. A glutáraldehid koncentrációjának további csökkentése pedig az adszorpciós kötődésre jellemző leoldódási kinetikájú rögzített enzimkészítményhez vezetett, azonban a leoldódás sebessége kisebb mértékű volt, mint az adszorpciós kötődés esetén.

Az elmondottak értelmében látható, hogy az alkalmazott glutáraldehid koncentráció, az elérhető aktivitás és stabilitás függvényében egy optimum ponttal rendelkező görbét ad. Ennek szemléltetésére a negyedik ciklusban mérhető aktivitásokat a koncentrációk függvényében ábrázoltam (12. ábra).



**12. ábra**

A glutáraldehid koncentrációjának hatása az elérhető rögzített enzimaktivitásra.

Az előbb bemutatott eredmények alapján a 0,1 és 0,025 %(m/V) koncentrációk alkalmazása esetén a negyedik ciklus után is további „aktivitás leoldódással” kell számolni, azonban a fenti ábrázolással elvi hibát nem követek el, mert ez a tény csak az optimum görbe felfutását befolyásolja, az optimum értékre hatással nincs. A keresztkötések kialakításához alkalmazott körülmények mellett,

0,25 % (m/V) koncentrációjú glutáraldehid oldat alkalmazás a kedvező, ezért további kísérleteim során is ezt a koncentráció értéket alkalmaztam.

#### *5.2.3.4 Szubsztrát jelenlétének hatása a glutáraldehydes kezelés hatásfokára*

Kovalens kötések kialakításán keresztül történő rögzítési eljárások esetén a biokatalizátor nagymértékű inaktiválódásával lehet számolni. Ennek legfőbb oka, hogy az alkalmazott reagens az enzim aktív centrumába vagy annak közelébe kötődve a biokatalizátor inaktiválódását okozza [HARTMEIER, 1988]. Ezért az az általános gyakorlat, hogy a kovalens kötések kialakítását szubsztrát jelenlétében végzik el, ezáltal csökkentve a reagens aktív centrumba való kötődésének valószínűségét. Ezért megvizsgáltam, hogy a szubsztrát jelenléte milyen hatással van a glutáraldehydes kezeléssel elérhető aktivitásra és stabilitásra.

A glutáraldehydes kezelést a 4.4.2 fejezetben leírtak szerint a következőképpen végeztem el: az adszorpciós rögzítés után a nedves hordozókhoz 2 ml 0,1 M nátrium-acetát puffert (pH 5,50) adtam, amelyek glutáraldehydre nézve 0,25 % (m/V) koncentrációjúak voltak. A szubsztrátot is tartalmazó elegy pedig pNPG-re nézve 10 mM koncentrációjú volt. Az elegyeket 1 percre rázattam (150 rpm), majd a rögzített enzimet szűrtem, mostam és a 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam.

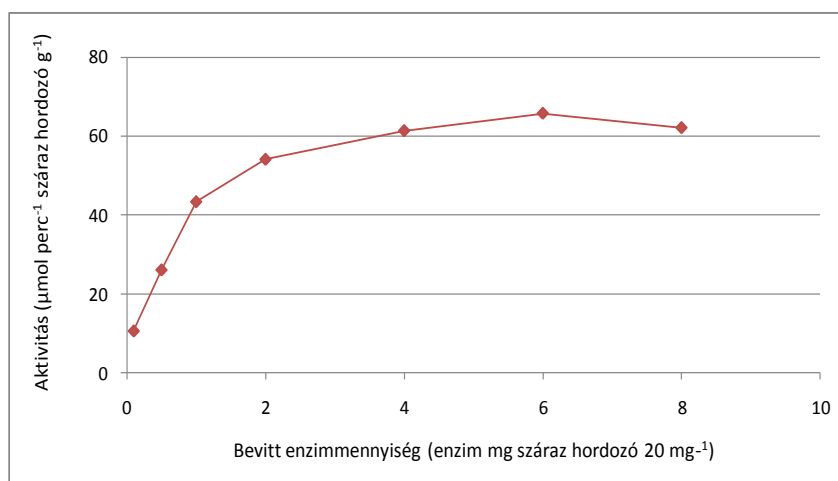
Az általam alkalmazott glutáraldehydes kezeléssel elérhető aktivitást és stabilitást a szubsztrát jelenléte nem befolyásolta. Ez alapján az is kijelenthető, hogy a kötő reagensként használt glutáraldehid a  $\beta$ -glükoszidáz enzim aktív centrumához nem kötődött. Ezért további vizsgálataim során, a keresztkötések kialakításához szubsztrátot nem alkalmaztam.

#### ***5.2.4 A kombinált rögzítési eljárással elérhető maximális aktivitás és rögzítési hozam meghatározása***

Az 5.2.2 és 5.2.3 fejezetekben külön-külön elvégeztem az adszorpciós rögzítés és glutáraldehydes kezelés számára előnyös paraméterek megállapítását. Ebben a vizsgálatban, az előbbieken meghatározott kedvező paraméterek alkalmazása mellett, a rögzítési elegy anyag- és aktivitásviszonyainak változtatásával megállapítottam a hordozóra maximálisan felvihető aktivitást és az elérhető maximális rögzítési hozamot.

A kombinált rögzítési eljárást a kedvező paraméterek alkalmazása mellett a következőképpen hajtottam végre: 20 mg száraz hordozóra minden esetben 1 ml adott koncentrációjú 0,1 M nátrium-acetát pufferrel (pH 5,50) kialakított enzimoldatot mértem, és az elegyet 24 órán keresztül 25 °C hőmérsékleten rázattam (150 rpm). A rázatás végén a felülszót dekantáltam és a

nedves hordozóhoz 2 ml 0,1 M koncentrációjú nátrium-acetát puffert adtam, ami minden esetben 0,25 %(m/V) koncentrációjú volt a glutáraldehidre nézve. Ezt az elegyet 1 percig rázattam (150 rpm), majd a rögzített enzimet kiszűrtem, az eredeti, száraz hordozó tömegére számított  $250\times$  mennyiségű 0,1 M nátrium-acetát pufferral (pH 5,50) mostam, és 4.5.3 pontban ismertetett módon vizsgáltam. Az eredményeket az 13. ábra és a 3. táblázat mutatja be.



**13. ábra**

A hordozóra a kombinált rögzítési eljárással felvihető aktivitás meghatározása.

**3. táblázat:** A kombinált rögzítési eljárással elérhető maximális aktivitás és rögzítési hozam.

Bevitt enzimmennyiség (enzim mg száraz hordozó 20 mg <sup>-1</sup> )	0,1	0,5	1	2	4	6	8
Elérhető aktivitás (μmol perc <sup>-1</sup> száraz hordozó g <sup>-1</sup> )	10,65	26,11	43,36	54,09	61,35	65,75	62,11
A rögzítés hozama (%)	21,4	10,5	8,7	5,4	3,0	2,2	1,6

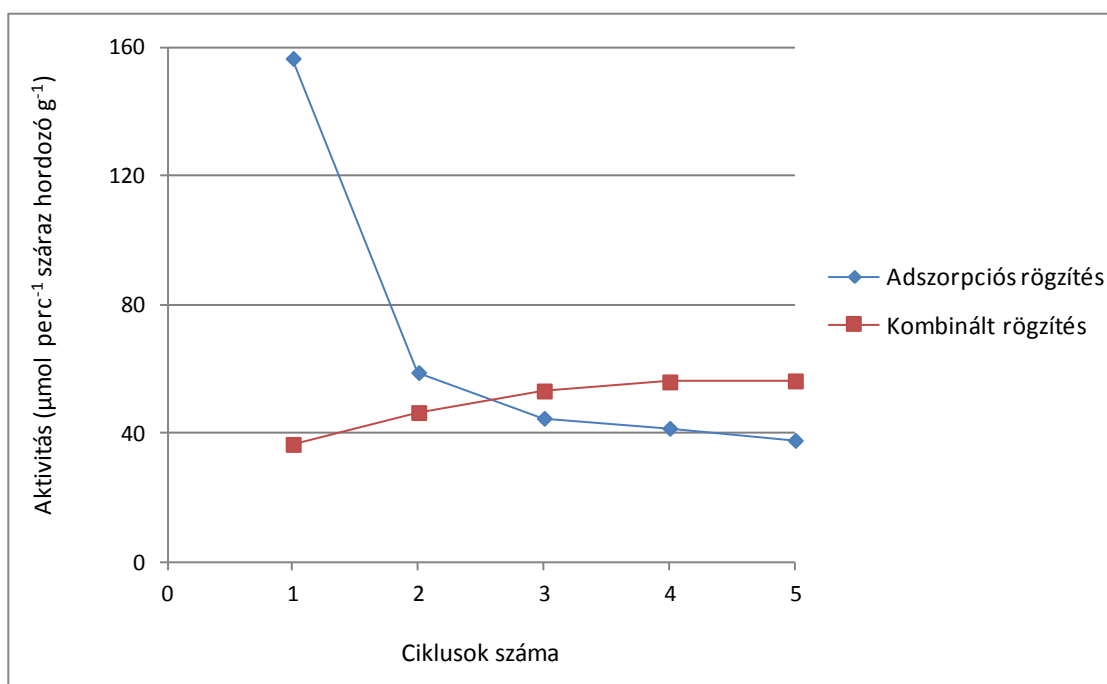
A bevitt enzimmennyiségek növelésével az aktivitásértékek, az 5.2.2.4 pontban bemutatott adszorpciós kötődéshez hasonlóan, egy telítési görbe mentén növekedtek, azonban a növekedés mértéke ez esetben alacsonyabb volt. Ezért a rögzítési hozamok értékei nagyobb mértékben csökkentek a bevitt enzimmennyiség emelése során. Ennek a jelenségnek a hátterében feltehetően a kombinált rögzítési eljárásból adódó erősebb kötési erők dezaktiváló hatása állhatott. A 0,1 mg enzim bevitelével elérhető maximális rögzítési hozam (21,4 %) alig maradt el az adszorpciós kötődés esetén elérhető 22,5 % értéktől. Adott 20 mg száraz hordozó esetén a legnagyobb elérhető aktivitást (a 13. ábra szerint

65,75  $\mu\text{mol perc}^{-1}$  száraz hordozó  $\text{g}^{-1}$ ), az adszorpciós rögzítéssel megegyező módon, 6 mg enzim bevitelével értem el. A rögzítés hozama ez esetben elmaradva az adszorpciós rögzítés hozamától (9,6 %), mindössze 2,2 % volt.

A rögzítéshez használt enzim-hordozó arányt a későbbi felhasználás körülményei alapján érdemes megválasztani, ugyanis a nagy bioreaktor térfogatok esetén az alacsonyabb aktivitású rögzített enzimkészítmények használata is megfelelő lehet, amelyeknél a magasabb rögzítési hozam által gazdaságosabbá tehető a felhasználás. Egy általános felhasználáshoz, adott 20 mg száraz hordozó esetén, a lineárisnak tekinthető szakasz végén elhelyezkedő 1 mg enzim bevitele ajánlott, ahol magasnak tekinthető aktivitás elérése mellett (a 13. ábra szerint 43,36  $\mu\text{mol perc}^{-1}$  száraz hordozó  $\text{g}^{-1}$ ) a rögzítés hozama közel 9 %. Az elvégzett előkísérletek eredményei továbbá azt is mutatják, hogy a rögzítési eljárás hatásfokára a léptéknövelés kedvezőleg hathat.

### **5.2.5 A kombinált rögzítési technika előnyei**

A kombinált rögzítési technika előnyeit az adszorpciós és a kombinált immobilizálási eljárással előállított enzimkészítmények összehasonlításán keresztül, a kinetikus-leoldódási vizsgálat segítségével mutatom be. A rögzítési eljárásokat mind az adszorpciós mind pedig a kombinált módszer esetében a meghatározott legkedvezőbb paraméterek alkalmazása mellett hajtottam végre. Az adszorpciós rögzítést az 5.2.3 pontba leírtak szerint, amíg a kombinált rögzítési eljárást az 5.2.4 fejezetben megadottak alapján végeztem el. Mind a két esetben 20 mg száraz hordozóhoz 2 mg enzimet vittem be. Az enzimkészítmények vizsgálatát a 4.5.3 pontban ismertetett módon hajtottam végre. Az eredményeket az 14. ábra mutatja be.



**14. ábra**

Az adszorpciós és a kombinált rögzítési technika összehasonlítása.

A kinetikus-leoldódási vizsgálat eredményein keresztül jól összehasonlítható a két eljárással előállítható rögzített enzimkészítmények közötti különbség. Szembetűnő, hogy az elérhető aktivitás és stabilitás tekintetében is a kombinált eljárás alkalmazása előnyösebb. Amíg az adszorpciós kötődés esetén az „aktivitás leoldódás” a 4. ciklusra még nem ért teljesen véget, addig a másik eljárással már egy nagyobb aktivitású, stabil rögzített enzimkészítményhez jutottam. A kombinált rögzítési eljárás további előnye, hogy – a felületen kialakított enzimiréteg struktúrájának köszönhetően – a felhasználás során a kedvező körülményektől való eltérés esetén is a készítmény stabilnak tekinthető. Amennyiben a felhasználási körülményekből adódóan még is stabilitási problémák lépnének fel, még mindig lehetőség van a glutáraldehides kezelés paramétereinek változtatásával egy stabilabb struktúra kialakítására.

### 5.3 Rögzített enzimkészítmény jellemzése

Az előző fejezetekben bemutatott, kombinált rögzítési technikával előállított immobilizált enzimpreparátumra, „rögzített enzimkészítmény” néven fogok hivatkozni. A rögzített enzimkészítmény előállításához a további kísérletek során, minden esetben az előzőekben megállapított legkedvezőbb paramétereket alkalmaztam.



Egy enzim rögzítésének hatására a katalitikus tulajdonságok és a stabilitás jellegzetes változásait figyelhetjük meg, ezért egy új enzimmészítményt ezen megfontolások alapján jellemezni kell. Gyakorlati szempontból, általánosságban a kinetikai állandóknak, az aktivitás pH függésének, az aktivitás hőmérséklet függésének és az enzimmészítmény stabilitásának meghatározása szükséges.

### **5.3.1 Rögzített enzimmészítmény kinetikai állandóinak ( $V_{max}$ , $K_m$ ) meghatározása**

Az enzimmészítmények legjellemzőbb tulajdonságai a szubsztrát telítettség esetén elérhető maximális aktivitás érték ( $V_{max}$ ), és ennek az értéknek a feléhez tartozó szubsztrát koncentráció ( $K_m$ ). A rögzített enzimek kinetikai állandói rendszerint eltérnek a natív oldott forma kinetikai állandóitól, amelynek okai konformációs, térbeli, megoszlási és diffúziós hatások lehetnek [GOLDSTEIN & KATCHALSKI-KATZIR, 1976].

A vizsgálat során a mesterséges pNPG szubsztrát alkalmazásával meghatároztam a használt  $\beta$ -glükózidáz enzim oldott formájának és a rögzített enzimmészítménynek a kinetikai állandóit. Az enzimaktivitás méréseket a 4.5.4 pontban leírtak szerint hajtottam végre, amíg a rögzítési eljárás során az 5.2.4 fejezetben leírtak alapján jártam el. Adott 20 mg száraz hordozóhoz, a maximális aktivitás elérése érdekében, a rögzítés során minden esetben 6 mg enzimet adtam. Az immobilizálási eljárás után a rögzített enzimmészítményekkel, az 5.2.3.1 pontban bemutatottak okán, négy aktivitásmérési ciklust hajtottam végre, hogy elérjem a maximális aktivitást. A készítmények ebben az állapotukban kerültek felhasználásra a kinetikai vizsgálatokhoz.

Az adszorpciósan rögzíthető fehérje mennyiségének meghatározására az 5.2.2.4 fejezetben bemutatott spektrofotometriás módszer alapján, 6 mg enzim alkalmazása esetén, a bevitt fehérje mennyiségének a 62,4 % értéke rögzült. Ezért, a maximális aktivitás elérése érdekében a rögzítés során alkalmazott nagy enzimmennyiség miatt, a rögzült aktivitás hozama mindössze 2,5 % volt (a natív enzim  $V_{max}$  értéke alapján). Ez alapján jól szembetűnő, hogy a rögzítési eljárás főként az enzim katalitikus aktivitására volt hatással, amíg a szubsztrátkötő hely működését számottevően nem befolyásolta mivel a  $K_m$  állandó a natív enzim esetében 4,04 mM, amíg a rögzített enzim esetében 4,36 mM értéknek adódott. A rögzítési eljárás, katalitikus aktivitásra gyakorolt hatásainak okát a későbbiekben fogom tárgyalni, valamint az ide tartozó  $V_{max}$  és  $K_m$  értékeket a 6. táblázatban mutatom be.

### **5.3.2 Rögzített enzimkészítmény aktivitásának pH függése**

Mivel a rögzítési eljárások különböző hatásokat gyakorolhatnak az enzimek konformációjára, ionizációs állapotára és disszociációjára, ezért gyakran megváltozik a pH-nak a katalitikus aktivitásra kifejtett hatása is [BALLESTEROS et al., 1994].

A vizsgálat során meghatároztam a rögzített enzimkészítmény katalitikus aktivitásának pH függését. A méréseket a 4.5.5 fejezetben leírtak alapján végeztem el. A rögzítési eljárást az 5.2.4 fejezetben megadottak alapján hajtottam végre, amely során minden esetben 20 mg száraz hordozóhoz 2 mg enzimet vittem be. Az immobilizálási eljárás után a rögzített enzimkészítményekkel, az 5.2.3.1 pontban bemutatottak okán, négy aktivitásmérési ciklust hajtottam végre, hogy elérjem a maximális aktivitást. A készítmények ebben az állapotukban kerültek felhasználásra a vizsgálathoz.

A rögzített enzimkészítmény pH függésének meghatározása során pH 5,00 alatti tartományban az eredmények nem voltak reprodukálhatóak, ez arra utalt, hogy pH 5,00 alatt az enzimkészítménynél stabilitási problémák léptek fel. Ezt a feltevést a későbbi vizsgálatok eredményei is alátámasztották, amelyeket a következő fejezetben fogok bemutatni.

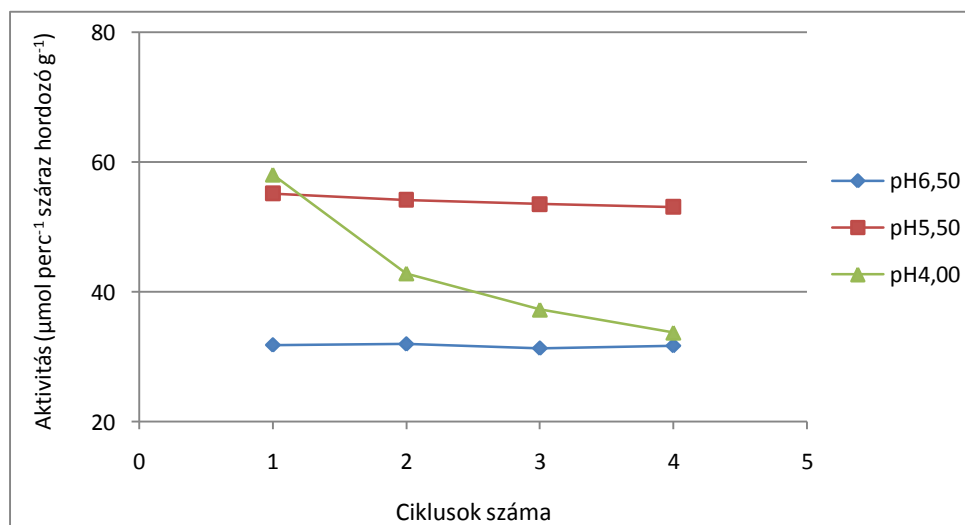
### **5.4 A rögzített enzimkészítmény stabilitásának növelése, ezáltal borászati felhasználásra is alkalmas készítmény előállítása és jellemzése**

A kitűzött célok között egy olyan borjavításra is alkalmas rögzített enzimkészítmény létrehozása volt a cél, amelynek előállítása gazdaságos és egyszerű technológiát igényel. Az előzőekben bemutatott rögzítési eljárás ezeknek a feltételeknek eleget tesz, azonban a rögzített enzimkészítménynek az olyan savas körülmények között is működőképesnek kell lennie, amelyek a borokban is tapasztalhatók. A működőképesség jelen esetben az enzim-hordozó között kialakult kötődés stabilitását és viszonylag magas megőrzött katalitikus aktivitást jelent. Az enzimek aktivitását leginkább befolyásoló tényezők közül, a borokban a pH 3,5-4,5 értékű kémhatás és a 10-12 % (V/V) etanol tartalom a legjellemzőbb tulajdonság. Ezért a kidolgozott rögzítési eljárással olyan enzimkészítmény előállítása volt szükséges, amely az előbb említett paraméterek mellett is stabil és megfelelő aktivitással rendelkezik.

#### 5.4.1 Leoldódási vizsgálatok a rögzített enzimkészítménnyel

A rögzített enzimkészítmény savas körülmények közötti felhasználásra való alkalmasságának vizsgálata során, első lépésként meg kellett állapítanom, hogy mi okozza, az 5.3.2 fejezetben tapasztalt, pH 5,00 érték alatti tartományban az aktivitásmérés zavarait. Feltételeztem, hogy ennek hátterében a környezet alacsony pH értékéből adódó stabilitási problémák állhatnak. Ezért a rögzített enzimkészítmény aktivitását és stabilitását különböző pH értékeken végzett felhasználás során követtem nyomon.

A vizsgálathoz a rögzítési eljárást az 5.2.4 fejezetben megadottak alapján hajtottam végre, amely során minden esetben 20 mg száraz hordozóhoz 2 mg enzimet vittem be. Az immobilizálási eljárás után a rögzített enzimkészítményekkel, az 5.2.3.1 pontban bemutatottak okán, négy aktivitásmérési ciklust hajtottam végre, hogy elérjem a maximális aktivitást. A készítmények ebben az állapotukban kerültek felhasználásra a vizsgálathoz. Az enzimkészítmények vizsgálatát a 4.5.3 pontban ismertetett módon hajtottam végre, különböző pH értékek alkalmazása mellett. Az eredményeket a 15. ábra mutatja be. A kinetikus-leoldódási vizsgálattal párhuzamosan a ciklusok végén, az aktivitásmérési elegyek felülúszóinak aktivitását is meghatároztam (4. táblázat), amelyekből szintén az enzimleoldódás mértékére lehetett következtetni.



15. ábra

A rögzített enzimkészítmény aktivitása és stabilitás, különböző pH értékeken való felhasználás esetén.

**4. táblázat:** Az aktivitásmérési elegyek felülúszóinak, a ciklusok végén mért aktivitása.

	Aktivitás ( $\mu\text{mol perc}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ )			
	1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus
<b>pH6,50</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>pH5,50</b>	0,07	0,02	0,01	<0,01
<b>pH4,00</b>	0,32	0,09	0,02	0,01

Az alkalmazott rögzítési eljárás esetén, pH 4,00 értéken a rögzített enzimkészítménynél jelentős aktivitáscsökkenést tapasztaltam a ciklusok során, amely enzimleoldódási folyamat eredménye lehetett, amíg pH 5,50 és pH 6,50 értéken való felhasználás során azonban a várt módon a készítmény stabil volt. Ezt támasztották alá az aktivitásmérési elegyek felülúszóinak, a ciklusok végén mért aktivitás értékei is. Az aktivitásértékbeli különbséget az alkalmazott közegek pH értékének a katalitikus aktivitásra gyakorolt hatása okozta. A leoldódás az erősebben savas közegben, az enzim és a hordozó közötti elektrosztatikus viszonyok megváltozásának eredménye lehetett, mivel az enzim az izoelektromos pontja (pH 5,5) alatti pH értékeken polikationként viselkedik az anioncserélő hordozó felületén.

Az alkalmazott rögzítési eljárással előállítható készítmény pH 5,50 értéken és a felette elhelyezkedő pH tartományban megfelelően használhatónak bizonyult, azonban az alacsonyabb pH értéken való megbízható felhasználás érdekében a rögzítési eljárás módosítása vált szükségessé.

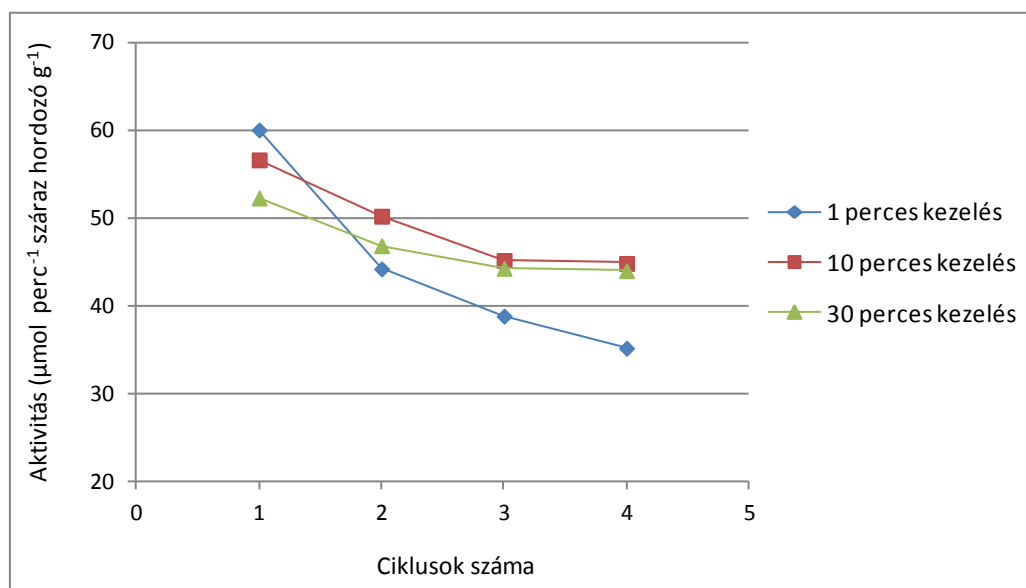
#### **5.4.2 A glutáraldehydes kezelés idejének hatása a rögzített enzimkészítmény stabilitására, pH 4,00 kémhatású közegben történő felhasználás esetén**

A rögzített enzimkészítmény alacsony kémhatású közegben történő felhasználása esetén tapasztalt „aktivitás leoldódás” alapján feltételezhető, hogy az 1 perces glutáraldehydes kezeléssel, az enzimek között kialakított keresztkötések száma nem volt elegendő, így a térhálósítás mértéke is elmaradt a szükségéstől. Ezért a savasabb tartományban történő felhasználáshoz a rögzített enzimkészítmény stabilitását fokozni kellett. Ennek az eléréséhez a legkézenfekvőbb megoldásnak a glutáraldehydes kezelés paramétereinek módosítása tűnt, mivel ezáltal növelhető volt a kialakított keresztkötések száma, ezen keresztül az „enzimháló” struktúra stabilitása. Ezt a hatást elvben a rögzítési eljárás során alkalmazott glutáraldehyd koncentrációjának növelésével vagy a kezelési idő emelésével lehet elérni. Akármelyik megoldást is választjuk, a rögzítéssel elérhető aktivitás kisebb mértékű csökkenésével kell számolni. A fentiek értelmében meghatároztam, hogy milyen hatással van

a rögzített enzimkészítmény stabilitására és aktivitására a glutáraldehides kezelés idejének növelése, adott glutáraldehid koncentráció mellett.

A kísérlethez a rögzítési eljárást az 5.2.4 pontban leírtak szerint hajtottam végre, amely során minden esetben 20 mg száraz hordozóhoz 2 mg enzimet vittem be. A rögzítési eljárást azzal a különbséggel végeztem el, hogy 1, 10 és 30 perces glutáraldehides kezelési időket alkalmaztam. Az immobilizálási eljárás után a rögzített enzimkészítményekkel, az 5.2.3.1 pontban bemutatottak okán, négy aktivitásmérési ciklust hajtottam végre, hogy elérjem a maximális aktivitást. A készítmények ebben az állapotukban kerültek felhasználásra a vizsgálathoz. Az enzimkészítmények vizsgálatát a 4.5.3 pontban ismertetett módon végeztem el, azzal a különbséggel, hogy az aktivitásmérési ciklusokat minden esetben pH 4,00 értéken hajtottam végre. Az eredményeket az 16. ábra mutatja be. A

kinetikus-leoldódási vizsgálattal párhuzamosan a ciklusok végén, az aktivitásmérési elegyek felülúszóinak aktivitását is meghatároztam (5. táblázat), amelyekből szintén az enzimleoldódás mértékére lehetett következtetni.



**16. ábra**

A glutáraldehides kezelés idejének hatása a rögzített enzimkészítmény aktivitására és stabilitására.

**5. táblázat:** Az aktivitásmérési elegyek felülúszóinak, a ciklusok végén mért aktivitása.

	Aktivitás ( $\mu\text{mol perc}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ )			
	1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus
<b>1 perces kezelés</b>	0,32	0,09	0,02	0,01
<b>10 perces kezelés</b>	0,17	0,05	0,02	<0,01
<b>30 perces kezelés</b>	0,06	0,01	<0,01	<0,01

A kinetikus-leoldódási vizsgálat eredményei alapján kijelenthető, hogy a glutáraldehydes kezelés idejének emelésével a rögzített enzimkészítmény stabilitása is növekedést mutatott, mivel az egymást követő ciklusok során a leoldódás mértéke egyre csökkent. Ezt támasztották alá az aktivitásmérési elegyek felülúszóinak, a ciklusok végén mért aktivitás értékei is. Megállapítható továbbá, hogy mind a 10 perces, mind pedig a 30 perces kezelés esetén is a 3. ciklus elérésekor – pH 4,00 kémhatású közegben való felhasználás esetében – az enzimkészítmény már stabilnak tekinthető volt. A 10 és 30 perces kezelések mellett elért végleges aktivitások értékében jelentős eltérés nem volt tapasztalható. Ezért a hosszabb kezelési idővel elérhető nagyobb stabilitás lehetősége miatt, a borászati felhasználásra is jellemző savas körülmények közti alkalmazásra előállított rögzített enzimkészítményhez a 30 perces glutáraldehydes térhálósítás ajánlott. Az így előállított rögzített enzimre a továbbiakban „magnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény” (röviden: MS rögzített enzimkészítmény) néven fogok hivatkozni. Mivel a magnövelt stabilitás az ipari alkalmazások által támasztott követelményeknek nagyobb mértékben megfelel, ezért az ezzel a rögzítési technikával előállítható preparátum élelmiszeripari felhasználhatóságának vizsgálatai során is ezt a készítményt fogom alkalmazni, így ennek készítménynek a jellemzése is szükséges volt.

#### 5.4.3 A magnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény kinetikai állandóinak meghatározása

Az MS rögzített enzimkészítmény kinetikai paramétereinek a meghatározását szintén a 4.5.4 pontban leírtak szerint hajtottam végre, amíg a rögzítési eljárás során ebben az esetben is az 5.2.4 fejezetben leírtak alapján jártam el, amely során a glutáraldehydes kezelés ideje 30 perc volt. Adott 20 mg száraz hordozóhoz, a maximális aktivitás elérése érdekében, a rögzítés során minden esetben 6 mg enzimet adtam. Az rögzítési eljárás után az enzimkészítményekkel négy aktivitásmérési ciklust hajtottam végre, hogy elérjem a maximális aktivitást. A preparátumok ebben az állapotukban kerültek felhasználásra a kinetikai vizsgálatokhoz. A natív, a rögzített és az MS rögzített enzimkészítmények kinetikai paramétereit a 6. táblázat tartalmazza.

**6. táblázat:** A natív, a rögzített és az MS rögzített enzimkészítmények kinetikai állandói.

Oldott enzim		Rögzített enzim		MS rögzített enzim	
$V_{\max}$	$K_m$	$V_{\max}$	$K_m$	$V_{\max}$	$K_m$
( $\mu\text{mol perc}^{-1}$ enzim $\text{mg}^{-1}$ )	(mM)	( $\mu\text{mol perc}^{-1}$ száraz hordozó $\text{g}^{-1}$ )	(mM)	( $\mu\text{mol perc}^{-1}$ száraz hordozó $\text{g}^{-1}$ )	(mM)
19,61	4,04	90,91	4,36	75,64	5,03

A rögzült aktivitás hozama az MS rögzített enzimnél, az 1 perces glutáraldehydes kezelés esetén tapasztalt értékhez (2,5 %) képest csökkent (2,1 %), amelyet feltehetőleg az enzimek között nagyobb számban kialakított kovalens kötések okoztak. Ezáltal az MS rögzített enzimkészítmény maximális aktivitásában is csökkenés volt tapasztalható, amely az 1 perces glutáraldehydes kezelés esetén meghatározott  $90,91 \mu\text{mol perc}^{-1}$  száraz hordozó  $\text{g}^{-1}$  értékről,  $75,64 \mu\text{mol perc}^{-1}$  száraz hordozó  $\text{g}^{-1}$  értékre csökkent, amíg a  $K_m$  állandó  $4,36 \text{ mM}$  értékről,  $5,03 \text{ mM}$  értékre növekedett.

BALLESTEROS és munkatársai (1994) szerint, az enzimek fajlagos aktivitásának csökkenése a rögzítés során rendszerint az enzim harmadlagos szerkezetében bekövetkező változásoknak tulajdonítható. Irodalmi adatok szerint azonban adszorpcióval történő rögzítés esetén nem kell konformáció változással számolni és ezért megőrizhető az enzim aktivitása, bár ez elméleti szempontból a felületi denaturáció lehetősége miatt vitatható, valamint porózus hordozók esetén a diffúzió is okozhat problémákat [HARTMEIER, 1988; KENNEDY & WHITE, 1985].

Az általam előállított MS rögzített enzimkészítmények esetében azonban figyelembe kellett venni, hogy az immobilizálási eljárás során két különböző kémiai kötés került kialakításra. Az már az 5.3.1 pontban megállapítható volt (az 1 perces glutáraldehydes kezelés alkalmazása mellett), hogy a rögzítési eljárás főként az enzim katalitikus aktivitására volt hatással, amíg a szubsztrátkötő hely működését számottevően nem befolyásolta, mivel az alacsony (2,5 %) rögzült aktivitás hozamérték mellett a  $K_m$  állandó  $4,04 \text{ mM}$  értékről (natív enzim),  $4,36 \text{ mM}$  értékre növekedett. Az adatok arra engednek következtetni, hogy ez esetben a fehérje szerkezetében a rögzítési eljárás számottevő eltérést nem eredményezett, így a fajlagos katalitikus aktivitásban tapasztalható nagymértékű csökkenés az enzim molekulák nem megfelelő térhelyzetben való adszorpciós rögzülésének, valamint az esetlegesen fennálló diffúziós gátlásoknak tulajdonítható. Ezáltal a megfelelő térhelyzetben rögzült enzimfehérjék hasonló  $K_m$  értékkel rendelkeznek, mint a natív enzim.

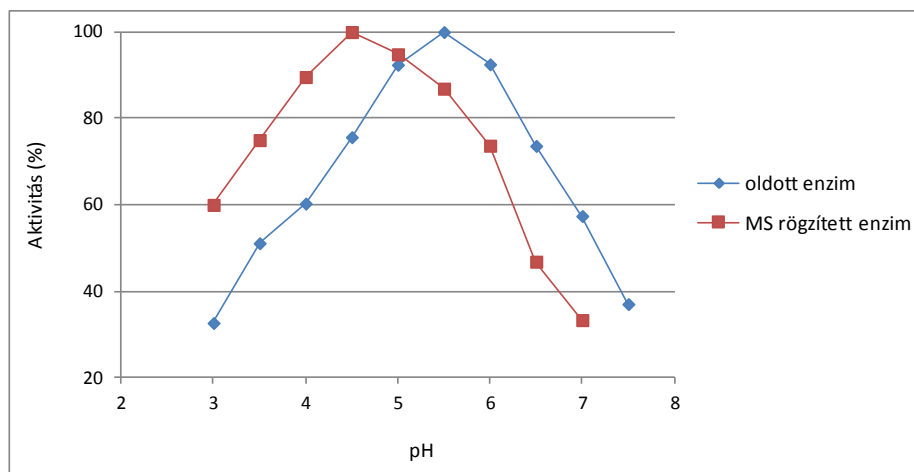
Az általam tapasztalt és a bemutatott irodalmi adatokkal ellentétben KARAGULYAN és munkatársai (2008) viszont azt találták, hogy a kaolinon és a szilikagélen adszorpciósan rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzim  $K_m$  értékeiben, az adszorpciós rögzítés jellegének ellenére nagy eltérés volt tapasztalható ( $1,8$  és  $10 \text{ mM}$ ), ennek lehetséges okait azonban nem magyarázták.

A 30 perces glutáraldehydes kezeléssel előállított MS rögzített enzim esetében azonban a  $K_m$  állandóban jelentősebb mértékű növekedés volt megfigyelhető ( $5,03 \text{ mM}$ ). Ez alapján feltételezhető, hogy az enzimmolekulák között nagyobb számban kialakított keresztkötések számottevő mértékben képesek voltak befolyásolni az enzimfehérjék szerkezetét, így a  $K_m$  értékben növekedés, amíg a  $V_{\text{max}}$  értékben csökkenés volt tapasztalható.

#### 5.4.4 A megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény aktivitásának pH függése

A méréseket ebben az esetben is a 4.5.5 fejezetben leírtak alapján végeztem el. A rögzítési eljárást az 5.2.4 fejezetben megadottak alapján hajtottam végre, amely során minden esetben 20 mg száraz hordozóhoz 2 mg enzimet vittem be. Az immobilizálási eljárás után az MS rögzített enzimkészítményekkel négy aktivitásmérési ciklust hajtottam végre, hogy elérjem a maximális aktivitást. A készítmények ebben az állapotukban kerültek felhasználásra a vizsgálathoz. Az eredményeket a 17. ábra mutatja be.

Az 5.4.1 fejezetben bemutatott stabilitási problémákat a glutáraldehydes kezelés idejének 30 percre való növelésével sikerült megszüntetni, így a vizsgált pH értékek mellett az aktivitásmérési kísérletek során enzimleoldódás nem volt tapasztalható. Az eredmények értékelése során ez esetben is figyelembe kellett vennem, hogy a rögzítési eljárás során alkalmazott két különböző kémiai rögzítés eltérő hatásokkal bírhat az enzimfehérje tulajdonságaira. Ionos hordozóba zárt vagy ionos hordozóhoz kötött enzimek esetében a rögzített enzim mikrokörnyezetében eltérő a  $H^+$  ion koncentráció, a külső ún. makrokörnyezetben mért  $H^+$  ion koncentrációhoz képest. Polianionos mikrokörnyezetben a  $H^+$  ion koncentráció nagyobb, polikationos mikrokörnyezetben pedig kisebb a külső oldathoz képest. Ennek megfelelően, lúgos vagy savas irányú eltolódás észlelhető a katalitikus aktivitás pH optimumában [GOLDSTEIN et al., 1964]. A kovalens kötésekkel kialakított rögzített enzimeknél az enzim kémiai módosítása is okozhatja a pH-aktivitás-görbe eltolódását, azonban az elektromos töltésekkel rendelkező hordozók hatása elfedheti a kovalens kötésből adódó kémiai módosítás hatását [AXEN et al., 1970; GOLDSTEIN et al., 1970].



17. ábra

A natív és az MS rögzített enzimkészítmények katalitikus aktivitásának a pH függése.



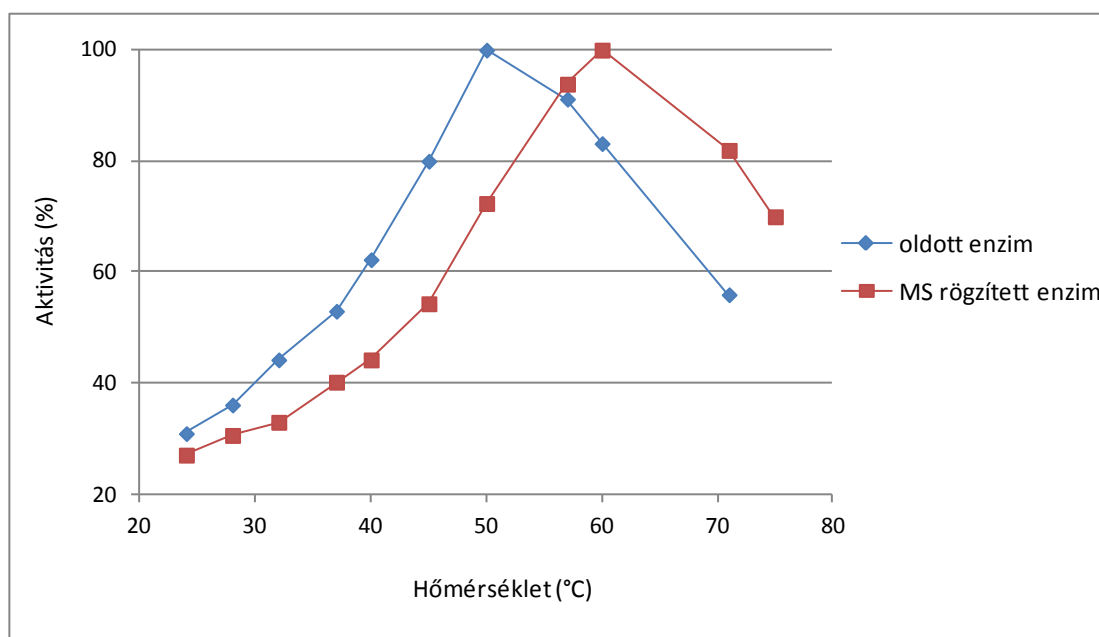
Az előállított MS rögzített enzim katalitikus aktivitásának pH függésében enyhe savas eltolódás volt megfigyelhető, mivel az MS rögzített enzim maximális aktivitása pH 4,50 érték mellett volt mérhető, a natív enzim pH 5,50 értékéhez képest. Ennek legfőbb oka tehát az lehetett, hogy az alkalmazott hordozó által kialakított polikationos mikrokörnyezetben a  $H^+$  ion koncentráció kisebb a külső oldathoz képest, ezért savas irányú eltolódás észlelhető a katalitikus aktivitás pH optimumában.

MARTINO és munkatársai (1996) is hasonló jelenséget tapasztaltak, amikor  $\beta$ -glükózidáz enzimet adszorbeáltattak kitozán hordozóhoz majd glutáraldehiddel alakítottak ki keresztkötéseket. Esetükben a rögzített enzim 0,5 egységgel alacsonyabb pH érték mellett rendelkezett maximális katalitikus aktivitással, amelyet ők is a hordozó polikationos jellegével magyaráztak.

#### ***5.4.5 A megnövelt stabilitású rögzített enzimműszimény aktivitásának hőmérséklet függése***

A rögzítés hatására megváltozhat a katalitikus reakció aktiválási energiája és az enzim hőstabilitása. E két tényező eredőjeként változhat az enzimaktivitás látszólagos hőmérsékletfüggés. Ennek vizsgálata érdekében a méréseket a 4.5.6 pontban leírtak alapján végeztem el, az MS rögzített enzimet pedig az előző pontban bemutatottakkal megegyezően állítottam elő. Az eredményeket a 18. ábra mutatja be.

Az elméleti következtetések levonása során itt is figyelembe kellett vennem a rögzítési eljárás során alkalmazott különböző kötőerők hatásait, az enzim katalitikus aktivitásának látszólagos hőmérséklet függésének tekintetében. Magasabb lehet az optimális hőmérséklet a hordozóba bezárt és a porózus hordozón rögzített enzimek esetében azért is, mert a diffúziós hatások védik az enzimet a hődenaturációval szemben [BALLESTEROS et al., 1994]. Megnövekedett hőtűrést lehet észlelni az ionos vagy kovalens kötéseken keresztüli rögzítésnél is. Ebben az esetben a konformáció változások és a térbeli gátlások játszanak fontos szerepet a hőmérséklet emelésével szembeni megnövekedett tűrőképességben [MARSH, 1973].



**18. ábra**

A natív és az MS rögzített enzimkészítmények katalitikus aktivitásának a hőmérséklet függése.

Az eredmények a bemutatott irodalmi adatokkal összhangban voltak, mivel az MS rögzített enzimkészítmény esetében a katalitikus aktivitás látszólagos hőmérséklet optima 60 °C értékre növekedett, a natív enzim esetében mért 50°C értékről. Ez a növekedés tehát feltehetőleg a hordozó porózus szerkezetének és a kialakított ionos és kovalens kötések, előbb bemutatott együttes hatásaiból származott.

O'NEILL és munkatársai (2002) is a látszólagos hőmérséklet optimum emelkedését (50 °C értékről 55 °C értékre) tapasztalták, amikor a  $\beta$ -glükózidáz enzimet szolgél mátrixba zárták. Ennek okait nem magyarázták, de a jelenséget a hordozóba zárásból adódó diffúziós védőhatások okozhatták [BALLESTEROS et al., 1994], amely hatás az általam használt porózus hordozó esetében is fennállhatott.

### 5.5 A megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény élelmiszeripari felhasználhatóságának vizsgálatai

Mivel a  $\beta$ -glükózidáz enzim a béta térállású glükozidos hidroxilt tartalmazó glükóz glükozidjait képes hidrolizálni, ezért több lehetőség is adódik az enzim élelmiszeripari felhasználására. Ezek közül ipari szempontból a legjelentősebb a cellulóz bontás utolsó lépéseként a cellobióz lebontása. A további felhasználási lehetőségek kiegészítő jellegűek, mint például a borokban történő aromaanyagok felszabadítása a  $\beta$ -glikozidos kötésekkel vagy az élelmiszeriparban detergensként is alkalmazható

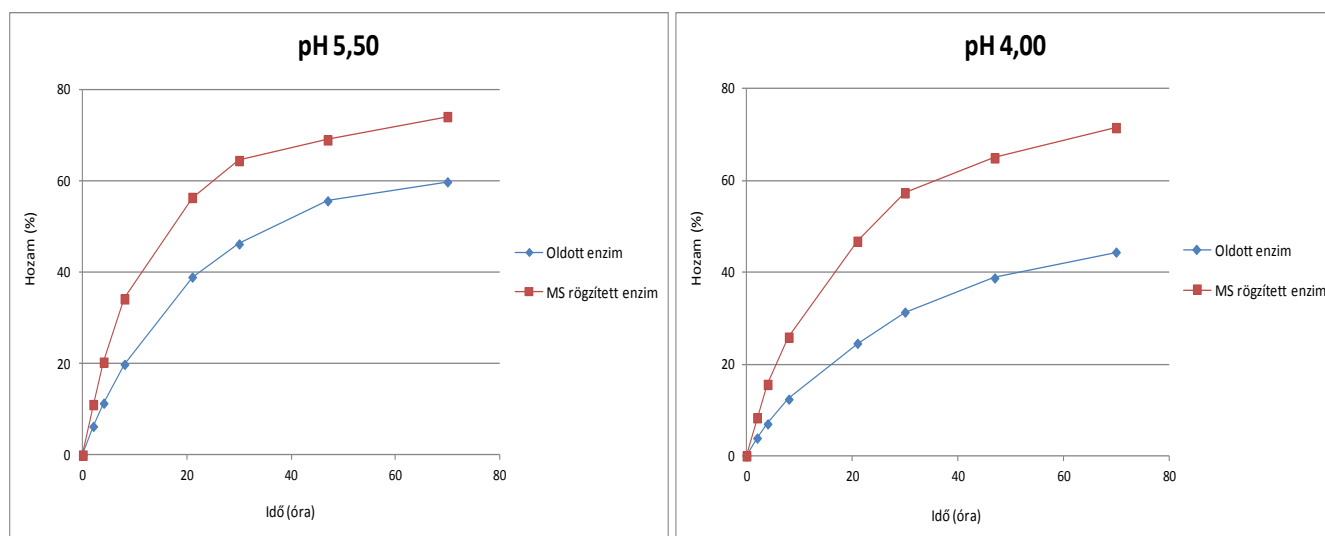
O-glikozidok reverz hidrolitikus előállítás, továbbá a gabonafélék egyik szénhidrát összetevőjének – a  $\beta$ -glükánnak – a lebontásában is kulcsszerepet tölt be. Ennek kapcsán az elvégzett élelmiszeripari felhasználhatósági vizsgálatokat is ezen alkalmazási területek köré csoportosítottam.

Az elvégzett munka során tehát a célom az volt, hogy minél több élelmiszeripari felhasználási területen vizsgáljam meg az előállított, MS rögzített enzimmészítmény alkalmazhatóságát. Minden esetben meg kívántam határozni a preparátum működésének hatékonyságát és a biokatalizátor stabilitását az oldott enzimhez viszonyítva a felhasználás során. A kapott eredmények értelmében minden alkalmazási terület esetén igyekeztem meghatározni a további lehetséges kutatási irányvonalakat. Az így elvégzett előkísérletek alapján, gyakorlati és tudományos szempontok figyelembe vételével ki szerettem volna választani egy olyan felhasználási területet, amelyen részletes vizsgálatokat folytatok.

#### **5.5.1 Felhasználhatósági vizsgálat a cellobióz hidrolitikus bontásában**

A  $\beta$ -glükozidáz enzim legfontosabb felhasználási területe a cellulózból cellulázzal végrehajtott glükóz-előállítás, amely aztán különböző ipari folyamatokban szolgál alapanyagul. A  $\beta$ -glükozidáz ennek a folyamatnak a kulcsenzime, mivel azok a mikrobiális rendszerek, amelyeket a cellulóz hidrolízisére alkalmaznak általában magas endo- és exocelluláz aktivitással rendelkeznek, azonban  $\beta$ -glükozidáz aktivitásuk elhanyagolható. Így a cellobióz hidrolízisére, azaz a glükóz előállítására a  $\beta$ -glükozidázt (célszerűen rögzített állapotban) kívülről kell a rendszerbe juttatni [BUSTO et al., 1994]. Ennek jelentősége kapcsán vizsgáltam az általam előállított MS rögzített enzimmészítmény felhasználhatóságát, a cellobióz bontásában.

Az MS rögzített enzimmészítményt a 4.6 pontban leírtak alapján állítottam elő és a vizsgálatokat pedig a 4.6.1 fejezetben bemutatottak alapján végeztem el. Mivel az iparban a cellulóz lebontására használt mikroorganizmusok pH optimuma eltérő lehet (ezáltal a folyamat során alkalmazott kémhatás is), ezért az enzimmészítmények felhasználhatóságát két különböző pH érték alkalmazása mellett vizsgáltam. A kísérlet eredményeit a 19. ábra és a 7. táblázat mutatja be.



**19. ábra**

Az enzimműködés különböző pH értéken végzett cellobióz bontási kísérleteinek hozamértékei.

**7. táblázat:** az oldott és az MS rögzített enzimműködés maradék aktivitás értékei a cellobióz bontási folyamat 70. órájában (végén).

Maradék aktivitás a 70. órában (%)	
pH 5,50 oldott enzim	69,9
pH 5,50 MS rögzített enzim	73,6
pH 4,00 oldott enzim	48,5
pH 4,00 MS rögzített enzim	67,5

A cellulóz enzimikus hidrolízisekor keletkező cellobióz bontási folyamatának vizsgálatára tehát olyan modell oldatot hoztam létre, amelyben a szubsztrátként jelen levő cellobióz bontásából keletkező glükóz mennyiségének meghatározásával következtethettem a folyamat hatékonyságára. A hozam 100% értékűnek tekinthető, ha a rendszerben jelen levő cellobióz teljes mértékben átalakításra került. Mivel a reakcióelegyhez adott, oldott és MS rögzített enzim mennyiségét úgy választottam meg, hogy a pNPG szubsztráton mért aktivitásuk azonos legyen, ezért a cellobióz bontási folyamat során a két készítmény hatékonysága összehasonlítható volt. Az MS rögzített enzimműködés a pH 5,50 kémhatású közegben végzett bontási eljárás során, a vizsgált hozamértékek alapján hatékonyabbnak bizonyult az oldott enzimműködésnél (mivel a reakció végének választott 70. órában magasabb hozamértékkel rendelkezett, 74,2 és 59,9 %), annak ellenére, hogy az MS rögzített enzimműködés pH 4,50 érték mellett rendelkezik maximális aktivitással. Mivel a reakció végén az oldott és az MS rögzített enzim maradék aktivitásában számottevő eltérés nem volt tapasztalható (69,9 és 73,6 %), ez a tény arra enged következtetni, hogy a cellobióz szubsztráton az MS rögzített enzimműködés hatékonyabban

alkalmazható, mint a mesterséges pNPG szubsztráton. A pH 4,00 kémhatáson végzett bontási folyamat végén az oldott és az MS rögzített enzim hozamértékeiben (44,4 és 71,5 %) tapasztalható eltérés jelentősebb volt. Ennek háttérében az MS rögzített enzim cellobióz szubsztráton való nagyobb hatékonyságán túl, az MS rögzített enzim alacsonyabb pH optimuma (pH 4,50) és a reakció végén mérhető magasabb megőrzött aktivitása (48,5 és 67,5 %) állhatott. Közismert, hogy az enzimrögzítési eljárások az enzimfehérje szerkezetét stabilizálni képesek [MATEO et al., 2007], ami feltehetőleg szintén hozzájárult ahhoz, hogy az MS rögzített enzim nagyobb mértékben őrizte meg aktivitását a pH 4,00 kémhatással rendelkező közegben való felhasználás során, valamint a hordozó mikrokörnyezetében (bázikus jellegéből adódóan) fennálló magasabb pH érték is szerepet játszhatott ebben. Tehát amíg az oldott enzim hozam értékeiben az alkalmazott pH érték (pH 5,50 és 4,00) jelentős eltérést okozott (59,9 és 44,4 %), addig az MS rögzített enzim hozam értékeiben számottevő eltérés nem volt tapasztalható (74,2 és 71,5 %). Ennek oka feltehetőleg, hogy az oldott  $\beta$ -glükózidáz enzim pH optimuma pH 5,50, amíg az MS rögzített készítményé pH 4,50 (a hordozóként alkalmazott ioncserélő gyanta bázikus jellege miatt). Ezért az MS rögzített készítmény az oldott enzim esetében optimálisnak tekinthető pH 5,50 érték alatt is megfelelően magas aktivitással rendelkezik, és a rögzítési eljárásnak köszönhetően az alacsony pH okozta inaktíváló hatásnak is jobban ellenáll.

TU és munkatársai (2006) *Aspergillus niger* törzsből izolált  $\beta$ -glükózidáz enzimet rögzítettek adszorpciósan Eupergit C hordozón, és vizsgálták a felhasználhatóságát cellulóz bontása során (celluláz enzim együttes alkalmazásával). A reakciót az *Aspergillus niger* számára kedvezőnek tekinthető pH 4,8 értéken vizsgálták (velem ellentétben más pH értéket nem alkalmaztak) és a reakcióelegy a folyamat kezdetén a cellobiózra nézve 110 mM koncentrációjú volt (amíg az általam alkalmazott reakcióelegyben 250 mM). Az általuk a reakció végének tekintett 48. órában, a rögzített enzim alkalmazásával a maximálisan elérhető hozam nagy hasonlóságot mutatott az általam elért maximális hozamértékkel (82 és 74 %). Azonban az én esetemben ez az érték a reakció 72. órájában volt mérhető, aminek az oka az eltérő enzim-szubsztrát arány lehetett. Azt tapasztalták, hogy a rögzített és a natív enzim közel azonos hatékonysággal volt alkalmazható, amíg az általam elvégzett kísérletek során az MS rögzített enzim mutatott nagyobb hatékonyságot, valamint a reakciók végén a maradék aktivitásokat nem vizsgálták.

KARAGULYAN és munkatársai (2008) szintén  $\beta$ -glükózidáz enzimet rögzítettek adszorpciósan kaolin hordozón, aminek a felhasználhatóságát vizsgálták cellulóz bontás során (szintén celluláz enzim együttes alkalmazásával). A cellulóz bontási kísérleteit olyan reakcióelegyben hajtották végre, amelynek pH értéke 5,0 volt és kiindulási koncentrációja cellobiózra nézve 175 mM. Az általuk a

reakció végének tekintett 144. órában az elért maximális hozamérték 79 % volt, ami nagyban megegyezik az előbb bemutatott saját és irodalmi adatokkal.

Az általam elvégzett kísérletek folytatását jelenthetné, az MS rögzített enzimmészítmény teljes cellulóz bontási kísérletekben való felhasználása különböző alapanyagokon, celluláz enzim együttes alkalmazásával. Ennek során pedig a bontási folyamat optimális paramétereinek (a közeg pH értéke - hőmérséklete, a megfelelő enzim-szubsztrát arány valamint ezen belül az alkalmazott enzimmészítmények aránya) a meghatározása lenne szükséges.

### ***5.5.2 Felhasználhatósági vizsgálat borászati körülmények között***

Mivel a borokban az aromaanyagok túlnyomó többsége alkoholos hidroxilcsoportot tartalmaz, de nagyrészt nem illékony formában, hanem túlnyomó többségében  $\beta$ -glükózidos kötésben, ezért a  $\beta$ -glükozidáz hidrolitikus aktivitásának az aromaanyagok felszabadítása szempontjából döntő a jelentősége. Azonban a borok saját  $\beta$ -glükozidáz aktivitása elenyésző, ezért valamilyen exogén módon bevitt  $\beta$ -glükozidáz készítmény alkalmazása előnyös lehet. A borok aromaprofiljának utólagos módosításához tehát  $\beta$ -glükozidáz közvetlen bevitele szükséges. A natív enzim alkalmazása azonban nem kívánatosan megnöveli a kezelt bor fehérjetartalmát, ezért az enzimet rögzített formában érdemes alkalmazni.

Az általam előállított MS rögzített enzimmészítmény borászati körülmények között való felhasználhatóságának vizsgálatait két részre osztottam. Először meg kívántam határozni, hogy a borokban jellemző savas pH érték és etanoltartalom milyen hatást gyakorol az oldott és az MS rögzített enzim katalitikus aktivitására, és ezen keresztül szerettem volna jellemezni a rögzítési eljárás katalitikus aktivitásra gyakorolt hatását különböző felhasználási körülmények között. Másodsorban az MS rögzített enzimmészítmény felhasználási stabilitását vizsgáltam különböző körülmények között.

#### ***5.5.2.1 A pH és etanoltartalom hatása az enzimmészítmények aktivitásértékeire***

A pH és etanoltartalom katalitikus aktivitásra gyakorolt hatásainak vizsgálatát a 4.6.2.1 pontban leírtak alapján hajtottam végre. Az MS rögzített enzimmészítményt a 4.6 pontban leírtak alapján állítottam elő és az elvégzett mérések során minden esetben 4-5 aktivitásmérési ciklust hajtottam végre és az összehasonlításához azokat az aktivitásértékeket használtam, amely ez alapján már állandónak volt tekinthető. A vizsgálat eredményeit a 8. táblázat tartalmazza.

**8. táblázat:** a pH és etanoltartalom hatás az oldott és az MS rögzített enzimek készítmény katalitikus aktivitására.

	Maradék aktivitás (%)				Borminta
	pH 5,50		pH 4,00		
	0 %(V/V) etanol	10 %(V/V) etanol	0 %(V/V) etanol	10 %(V/V) etanol	
oldott enzim	100	55	43	24	5
MS rögzített enzim	100	75	82	59	26

Az oldott enzim esetében mind a közeg kémhatása, mind pedig a 10 %(V/V) etanoltartalom jelentős mértékű aktivitásvesztést eredményezett, azonban az alkalmazott 4,00 kémhatás nagyobb inaktiváló hatással bírt, mint az alkalmazott etanoltartalom. Elmondható az is, hogy a kémhatás és az etanoltartalom additív módon fejtették ki az inaktiváló hatásukat az aktivitásra. A modell oldatnak tekinthető [pH 4,00 és 10 %(V/V)] elegyhez képest, az alkalmazott bormintában (Pajzos-Megyer pincészet, 2007 évjáratú félédese Tokaji furmint) további jelentős inaktiválódás volt megfigyelhető. Ennek hátterében a bormatrix inaktiváló hatása, a bormintában jelen levő egyéb szubsztátok (glikozidos kötésben levő vegyületek, pl. aromaanyagok), valamint a félédese borokra jellemző magas glükóz tartalom (15-50 g/l) represszáló hatásai állhattak.

A bormatrix inaktiváló hatására irányuló feltételezésemet más szerzők eredményei is alátámasztják akik a bormatrix összetételének és az ipari felhasználás körülményeinek a jelentős inaktiváló hatásairól számoltak be [GÜNATA et al., 1990; COLAGRANDE et al., 1994].

Az adatokból jól szembetűnő, hogy az alkalmazott rögzítési eljárás pozitív hatással volt az enzim környezeti hatásokkal szemben mutatott katalitikus aktivitásának a stabilitására. Az MS rögzített enzimek készítmény esetében mind az etanoltartalom, mind pedig a savasabb kémhatás kisebb inaktiváló hatással bírt, mint az oldott enzim esetében. Ezenfelül, a savas kémhatás kevésbé volt hatással a katalitikus aktivitásra, mint az etanoltartalom, amelynek oka a már korábban bemutatott pH optimum savas irányba való eltolódása.

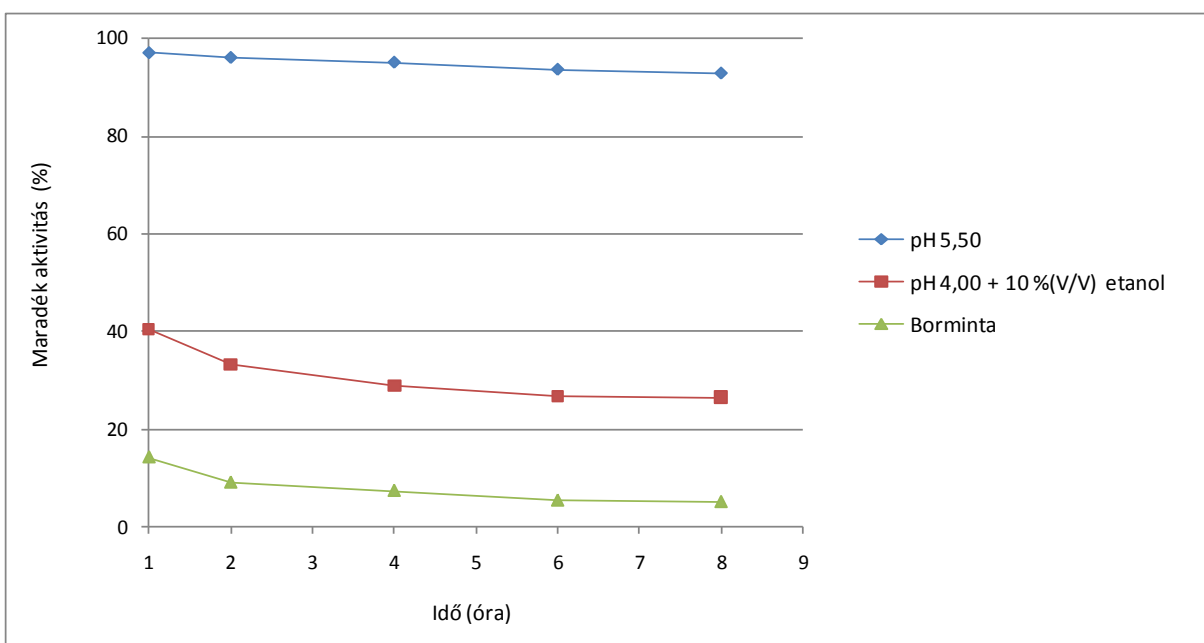
Ugyan ezt a jelenséget tapasztalták MARTINO és munkatársai (1996), amikor kereskedelmi forgalomban kapható  $\beta$ -glükózidáz enzimet adszorbeáltattak kitozánra, majd alakították ki keresztkötéseket glutáraldehiddel. A polikationos hordozó miatt a pH optimum savas irányba való eltolódása volt megfigyelhető, ezáltal alacsonyabb pH értéken a rögzített enzimek készítmény nagyobb aktivitással rendelkezett, mint az oldott enzim. Különböző etanol koncentrációk mellett vizsgálták az enzimpredarátumok aktivitását és azt tapasztalták, hogy 10 %(V/V) koncentráció mellett a rögzített enzimek készítmény 50 % maradék aktivitással rendelkezett, amely elmaradt az általam mért 75 %

értéktől. Olyan adatokat is közöltek, amikor a felhasználási közegben jelen levő etanol pozitív hatással volt az enzim katalitikus aktivitására, azonban ezekben az esetekben a  $\beta$ -glükózidáz enzimet *Aspergillus niger* törzsekből izolálták [MARTINO et al., 2000; CALDINI et al., 1994].

Az általam változtatott két környezeti paraméter az MS rögzített enzim esetében is additív módon fejtette ki inaktíváló hatását. A bormintában itt is további inaktíválódás volt megfigyelhető, amelynek mértéke azonban elmaradt az oldott enzim vizsgálata során megfigyelt értéktől. Ez arra enged következtetni, hogy a bormintában az inaktíváló hatás legfőbb oka a bormátrix (ugyanis az egyéb szubsztrátok jelenléte és a jelen levő magas glükóz tartalom mind a két esetben azonos volt), amelynek az MS rögzített enzim a rögzítési eljárás stabilizáló hatása miatt jobban ellenállt.

#### 5.5.2.2 A megnövelt stabilitású rögzített készítmény felhasználási stabilitásának vizsgálata

Az enzimmészítmények egyik legjelentősebb gyakorlati tulajdonsága, a felhasználás körülményei között mutatott működési stabilitás. Ennek vizsgálatát a 4.6.2.2 pontban leírtak alapján hajtottam végre. A kísérlet eredményeit a 20. ábra mutatja be.



**20. ábra**

Az MS rögzített enzimmészítmény felhasználási stabilitásának vizsgálata borászati körülmények között.

A mérések során kontrollként az MS rögzített enzimmészítmény aktivitását az optimálisnak tekinthető pH 5,50 értéken is meghatároztam, és ennek a kezdeti aktivitását tekintetem 100 %



értékűnek. A modell oldatban és a bormintában tapasztalható alacsony aktivitás a kontroll oldathoz képest, a már korábban bemutatott savas pH és etanoltartalom eredménye. Az első 1-2 órában (ciklusban) mind a modell oldatban, mind pedig a bormintában nagyobb mértékű aktivitásvesztés figyelhető meg, amit a felülúszókban mért aktivitásmérés eredményei alapján enzimleoldódás okozott. A 2. órát követően azonban az aktivitásvesztés mértéke lecsökkent és a 6. és 8. óra között már közel azonos aktivitásértékek voltak megfigyelhetők. Az előző fejezetben említettek okán a bormintában alacsonyabb aktivitás volt mérhető, mint a modell oldatban, továbbá a ciklusok során tapasztalható aktivitásvesztés mértéke is nagyobb volt a borminta esetében. A modell oldatban az MS rögzített enzimmészítmény az első órában mért aktivitásának 66 % értékét őrizte meg a 8. órára, amíg a bormintában ez az érték 40 % volt. A bormintában a 8. órában mért aktivitás a kontroll oldatban mért maximális értékhez képest 7 % volt, ami még így is magasabb, mint az oldott enzim esetében, a bormintában mért azonnali inaktiválódás okozta 5 % maradék aktivitás.

MARTINO és munkatársai (1996), akik kitozánon adszorpciósan majd glutáraldehydes keresztkötésekkel rögzítettek  $\beta$ -glükózidáz enzimet borászati felhasználás céljából, szubsztrátot és etanolt nem tartalmazó puffer oldatban (pH 3,5) vizsgálták az előállított enzimmészítmény stabilitását. Azt tapasztalták, hogy a glutáraldehydes keresztkötés idejének növelésével az enzim stabilitása növelhető volt, így a 15 perces keresztkötési idővel előállított enzimmészítmény 2 nap alatt, amíg a 30 perces 30 nap alatt veszítette el eredeti aktivitásának a felét. A szerzők viszont nem vizsgálták az előállított készítmények stabilitását olyan közegben, amely szubsztrátot és etanolt is tartalmazott, így eredményeik nem szolgálnak lényegi információval az általuk előállított rögzített enzimmészítmény felhasználási stabilitásáról borászati körülmények között.

GALLIFUOCO és munkatársai (1999) kitozán pelletéken rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimet borászati felhasználás céljából. Az előállított enzimmészítmény stabilitásának vizsgálata során azt találták, hogy a közeg etanol tartalmának növekedése és az enzim felezési idejének csökkenése között lineáris összefüggés van. Így a 3 % (V/V) etanoltartalom mellett a felezési idő 2586 órának, amíg 12 % (V/V) mellett 1378 órának adódott. Ezek az értékek is kedvezőbbnek tekinthetők, mint az általam kapott értékeke, azonban ezen elegyek sem tartalmaztak szubsztrátot, ezért érdemben nem összehasonlíthatók az én eredményeimmel.

Az előző fejezetekben bemutatott eredmények alapján tehát kijelenthető, hogy az általam előállított MS rögzített enzimmészítmény borászati körülmények között való felhasználása előnyösebb lehet, mint az oldott enzim alkalmazása. A felhasználás tekintetében problémát jelenthetnek a hatályos bortörvények és a „konzervatív” borkészítési technológiák. Amennyiben ezen akadályok áthidalhatók, további fejlesztési irányok lehetnek az enzimmészítmény stabilitásának növelése a glutáraldehydes

kezelés idejének a növelésével, más borfajtákban való tesztelés és az aromaprofil vizsgálata az enzimkezelés hatására GC-MS rendszerrel.

### **5.5.3 Felhasználhatósági vizsgálat *O*-glikozidok reverz hidrolitikus módon történő előállításában**

Amint ezt az irodalmi összefoglalásban bemutattam (2.4.1) a reverz hidrolitikus szintézis reakciókat kiterjedten használják *O*-glükozidok előállítására. Az egyszerű cukroknak (elsősorban glükóznak) alifás alkoholokkal képzett *O*-glükozidjai a nem ionos, felületaktív anyagok egyik nagyon fontos csoportját képezik, antimikrobás tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint biológiailag lebonthatók. A hidrolázok által katalizált reverz hidrolízishez tehát az szükséges, hogy az enzim katalizálta reakció egyensúlyának iránya az alacsony víztartalom következtében a hidrolízis helyett a kapcsolás, azaz a szintézis felé tolódjon el. Az egyensúly eltolására több megközelítés is létezik. Az egyik szerint a reakcióelegyhez vízzel elegyedő oldószert adagolnak, amely lecsökkenti a termodinamikus vízaktivitást, így segíti elő a kapcsolási reakciót. 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. Munkám során a tanszéki tapasztalatokra alapozva az utóbbi megoldást alkalmaztam. A víz (vagy poláros fázis) helyettesítése szerves oldószerral a katalitikus aktivitás drasztikus csökkenéséhez és a szubsztrátspecifitás elvesztéséhez vezethet. Ennek egyik oka az enzimmolekulák aggregációja lehet. A másik ok az aktív konformáció elvesztése. A konformációváltozás megakadályozható az enzimmolekula rögzítésével, amely merevebbé teszi a szerkezetet. Történhet a rögzítés olyan hordozón is, amely részlegesen kizárja a szerves oldószert. Ebben az esetben az enzim mikro környezetében a szerves oldószert koncentrációja kisebb, mint a külső közegben. Ez a helyzet a nagyszámú töltést hordozó, polielektrolit jellegű hordozóknál [KLIBANOV, 1979]. Ha több ponton kötődik a hordozóhoz, az is megvédheti az enzimet a szerves oldószerek által okozott inaktiválódástól. Ezért az általam alkalmazott hordozótól és rögzítési eljárástól azt vártam, hogy hatékonyan lesz képes stabilizálni az enzim szerkezetét az alkalmazott közegekben, ezáltal hatékonyabb felhasználást téve lehetővé az oldott enzimhez képest.

Az MS rögzített enzimmézőtényint a 4.6 pontban leírtak alapján állítottam elő, a kísérleteket pedig a 4.6.3 fejezetben leírtak alapján hajtottam végre. A vizsgálataimban alkalmazott paramétereket, a tanszéken Balogh Teréz által korábban folytatott kutatási munka (Dr. Kosáry Judit témavezetésével) során legkedvezőbbnek tekintett feltételek alapján [BALOGH et al., 2004] választottam ki. Eszerint a reakcióelegy 10 % értékben tartalmazott vizet és 1:9 arányban a reakció partnerként szolgáló

alkoholokat és a hígítószer szerepét betöltő 1,2-diacetoxi-etánt (DAE). Az eredményeket 21. és 22. ábra, valamint a 9. táblázat mutatja be.

A reverz hidrolitikus folyamat hatékonyságára a rendszerben szabadon levő glükóz mennyiségének csökkenése alapján következtettem, így a folyamat hozama 100 % értékűnek tekinthető, ha a rendszerben szabad glükóz nem mérhető (mivel azok *O*-glükozid formában vannak jelen). Olyan kontroll oldatot is felraktam párhuzamosan rázatni, amely alkohol helyett is a DAE hígítószert tartalmazta. Ezzel kívántam megállapítani, hogy a reakció során glükóz molekulák is összekapcsolódhatnak-e egymással. A 3 napos reakció idő alatt a rendszerben levő glükóz koncentráció állandó volt, így kijelenthető, hogy az alkalmazott körülmények között a glükóz molekulák összekapcsolódásával nem kellett számolni. Balogh Teréz doktori munkája során HPTLC mérési módszerrel is igazolta az ilyen rendszerekben keletkező alifás alkoholokkal képzett *O*-glükozidok jelenlétét [BALOGH, 2004].

A reverz hidrolitikus reakciók általában több napig tartanak, ezért a szerves közeg enzimek oldhatóságára, stabilitására és aktivitására gyakorolt hatását általában a reakció közben is vizsgálni kell, valamint az enzim azonnali inaktiválódási értékét is érdemes meghatározni. A  $\beta$ -glükozidázra 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  $\beta$ -glükozidázra a szerves oldószeres közegben [PAINTRARUX et al., 1996].

**9. táblázat:** Az oldott és az MS rögzített enzimkészítmény maradék aktivitása a reverz hidrolitikus reakció során.

	Oldott enzim maradék aktivitás (%)				
	0 nap	0,5 nap	1 nap	2 nap	3 nap
<b>Butoxi-etanol+DAE</b>	65	38	26	20	19
<b>Hexanol+DAE</b>	64	41	32	24	24
<b>Butanol</b>	52	29	15	10	8
<b>Butanol+DAE</b>	61	32	19	15	13

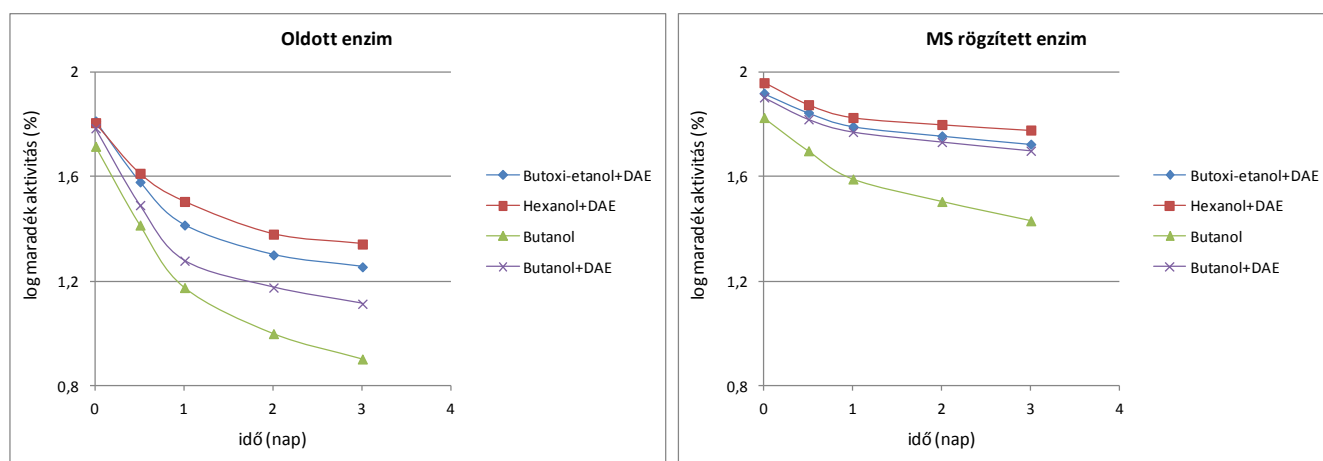
  

	MS rögzített enzim maradék aktivitás (%)				
	0 nap	0,5 nap	1 nap	2 nap	3 nap
<b>Butoxi-etanol+DAE</b>	83	70	62	57	53
<b>Hexanol+DAE</b>	91	75	67	63	60
<b>Butanol</b>	67	50	39	32	27
<b>Butanol+DAE</b>	80	66	59	54	50

Esetemben a 0 naphoz tartozó aktivitásértékek voltak az azonnali inaktiválódási értékek. A legnagyobb megőrzött aktivitásokat mind az oldott, mind pedig az MS rögzített enzim esetében a hexanolt és a butoxi-etanolt tartalmazó közegekben mértem (9. táblázat), amíg a legkisebb aktivitásokat a tisztán butanolt tartalmazó közegekben. Azt találtam, hogy az MS rögzített enzimmészítmény azonnali inaktiválódása minden közegben kisebb mértékű volt, mint az oldott enzimnél. A rögzítési eljárás 28-42 % értékkel képes volt növelni az enzim megőrzött aktivitását. Ennek oka feltehetőleg a rögzítési eljárás konformáció stabilizáló hatása, valamint a hordozó polielektrolit jellegéből adódhatott, hogy a hordozó mikrokörnyezetében a szerves oldószer kisebb koncentrációban volt jelen.

Balogh Teréz doktori munkája során azt tapasztalta, hogy a butoxi-etanol+DAE, a hexanol+DAE és a butanol+DAE közegekben az oldott enzim azonnali inaktiválódásának hatására a megőrzött aktivitása rendre 30, 27 és 24 % volt, amíg a rögzített enzim esetében 33,38 és 32 % volt [BALOGH et al., 2004; BALOGH, 2004]. Ezek az értékek elmaradnak az általam mért értékektől, azonban amíg én az azonnali inaktiválódás méréséhez 1 percre inkubáltam az enzimet, Balogh Teréz 1 órán keresztül. A rögzített enzim esetében ő is nagyobb megőrzött aktivitásokat figyelt meg minden közegben, azonban ezen növekedés mértéke a különböző közegekben eltérő volt az általam tapasztalt értékekhez képest, amelyet feltehetőleg az eltérő rögzítési eljárások enzimre gyakorolt tulajdonságai eredményeztek.

Érdemes először az enzimmészítmények reakció során mutatott inaktiválódásának a kinetikáját megvizsgálni, ezáltal a hozamértékek is jobban magyarázhatóvá válnak. Az oldott és az MS rögzített enzimmészítmények inaktiválódásának mértéke a reakció során szemléletesebbé tehető, ha a maradék aktivitások logaritmusát ábrázoljuk az idő függvényében (21. ábra).



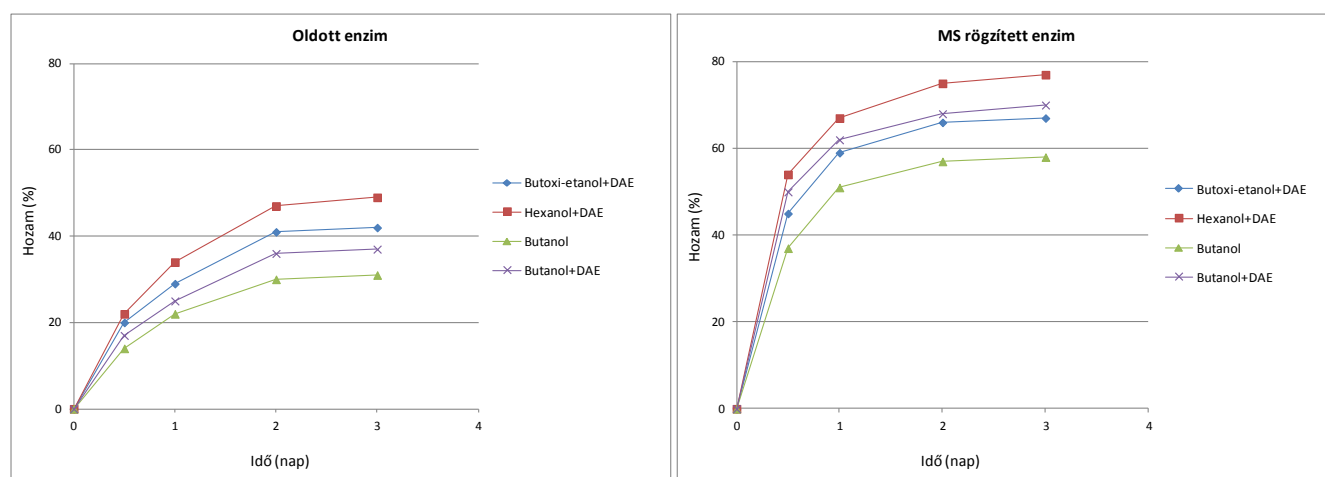
**21. ábra**

Az enzimmészítmények reakció során mutatott inaktiválódási kinetikája.

Az azonnali inaktiválódás mértéke minden esetben meghatározta a reakció során végbemenő inaktiválódás sebességét is, ugyanis azokban az elegyekben, amelyekben az enzimek készítmények jobban képesek voltak megőrizni aktivitásukat (az azonnali inaktiválódási mérések alapján), az inaktiválódás sebessége is kisebb volt. Mind a két készítmény a legstabilabb a hexanosos, amíg a legkevésbé ellenálló a tisztán butanosos elegyben volt a reakció során. A rögzítési eljárás az enzim ellenálló képességét a különböző közegek függvényében nem változtatta meg, azonban elmondható, hogy a különböző közegek inaktiváló hatásai között mutatkozó eltérések sokkal kevésbé érvényesültek, és az enzim rögzített formában az aktivitásának jóval nagyobb részét őrizte meg a reakció végének tekintett 3. napra. Ennek háttérében a rögzítési eljárás és az alkalmazott hordozó már bemutatott kedvező hatásai állhatnak.

Balogh Teréz doktori munkája során csak a rögzített enzimek készítmény felhasználhatóságát vizsgálta és a butoxi-etanol+DAE, a hexanol+DAE és a butanol+DAE közegekben a reakció végén a maradék aktivitások rendre 32, 37 és 25 % értéknek adódtak [BALOGH, 2004]. A közegek egymáshoz viszonyított inaktiváló hatása hasonlóan mutatkozott, mint az általam végzett mérések során, azonban ezek elmaradtak az esetemben mért maradék aktivitás értékektől, amelynek oka a hosszabb (6 napos) reakcióidő és az eltérő rögzítési eljárás lehetett.

A hozamok tekintetében megállapítható, hogy azokban a közegekben voltak a nagyobb értékek mérhetők, amelyekben az enzimek készítmények a leginkább képesek voltak aktivitásukat megőrizni, így a legnagyobb hozam mind a két esetben a hexanosos közegben, amíg a legalacsonyabb a tisztán butanososban volt megfigyelhető (22. ábra).



**22. ábra**

Az enzimek készítmények hozamértékei a reverz hidrolitikus reakció során.

Az oldott enzim esetében a 3 napos reakció végén mérhető hozamok 31-49 %, amíg az MS rögzített enzimnél 58-77 % között változtak közegtől függően. Az MS rögzített enzim esetében tapasztalt magasabb értékeknek több oka is lehetett: a nagyobb stabilitás és ezáltal a magasabb megőrzött aktivitás a reakció során; a reakcióhoz az oldott és az MS rögzített enzim esetében azonos aktivitást vittem be, azonban ezt pNPG szubsztráton határoztam meg; a hordozó enyhe hidrofób tulajdonsága miatt hatékonyabban működhetett ebben a heterogén, alapvetően apoláris jellegű reakcióközegben.

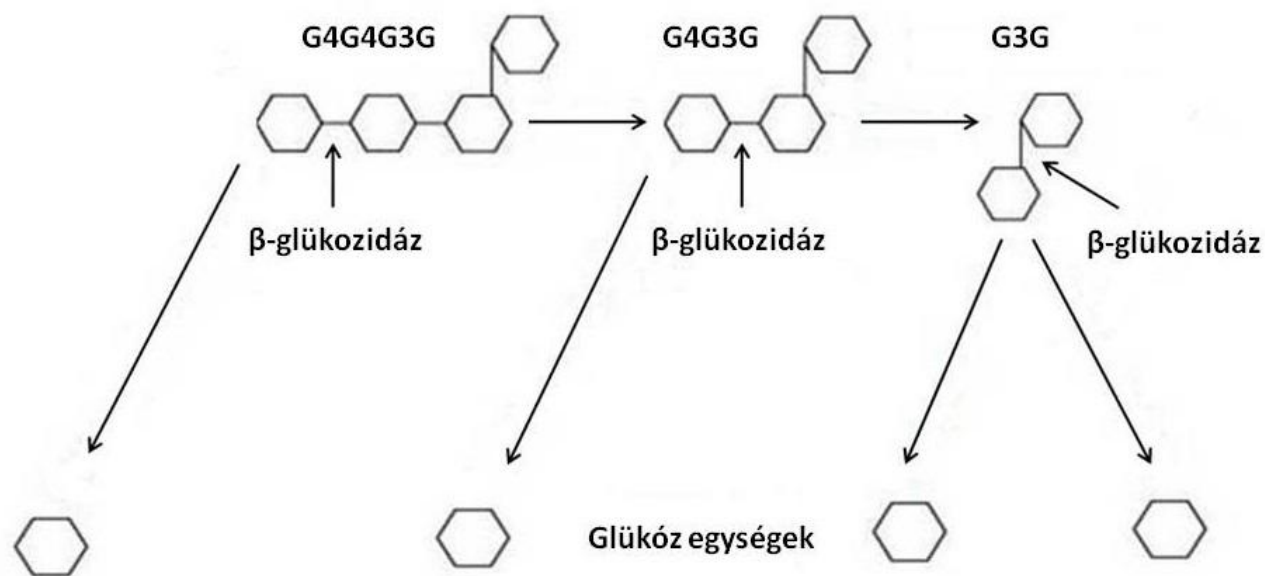
BALOGH és munkatársai (2004), akik Acrylex C-100 hordozóra rögzítettek  $\beta$ -glükózidáz enzimet, hasonló reakciókörülmények között 40-60 % közötti hozamokat értek el a közegtől függően (oldott enzimet nem vizsgáltak). Ez elmarad az általam megfigyelt hozamoktól, amelynek oka lehetett, hogy esetükben alacsonyabb volt az enzimmészítmény megőrzött aktivitása, valamint a reakcióelegyeket úgy állították össze, hogy reakció teljes mértékben való végbemeneteléséhez közel 6 nap legyen szükséges, az általam alkalmazott 3 napos reakcióval ellentétben.

A bemutatott eredmények alapján tehát kijelenthető, hogy az alkalmazott hordozóval és rögzítési eljárással előállított enzimmészítmény sikeresen és hatékonyabban volt alkalmazható reverz hidrolitikus reakciókban, mint a natív enzim. A témában való további kutatási irányvonalak lehetnek: a stabilitás fokozása, amely főként a glutáraldehides keresztkötési idő növelésével érhető el; más alkoholok és eltérő összetételű reakcióelegyek tesztelése; az említett *O*-glükózidok preparatív méretekben való előállítása, megfelelő műszeres analitikai mérésekkel kiegészítve.

#### **5.5.4 Felhasználhatósági vizsgálat az árpa $\beta$ -glükán tartalmának lebontásában**

Sok esetben az élelmiszeripari technológiák megkívánják a  $\beta$ -glükán degradációját, amelynek legáltalánosabb és legelterjedtebb módja az enzimes hidrolízis. Ezentúl a  $\beta$ -glükán teljes hidrolízise olyan élelmiszeripari területek felé is utat nyithat, amelyek a glükózból való etanol előállításával foglalkoznak. Az árpafélék a  $\beta$ -glükán elsődleges forrásának tekinthetők. A növényekben a  $\beta$ -glükán lebontása a csírázási folyamat egy korai lépése, amelyet első lépésben különböző specifitású endogén enzimek katalizálnak, amelyek közül a legjelentősebb az (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glükán-4-glükán hidroláz (továbbiakban glükánáz) (E.C. 3.2.1.73). A glükánáz katalizált árpa  $\beta$ -glükán lebontási folyamat legfőbb végtermékei tri- és tetraszacharid egységek (általában a keletkezett végtermékek 90 % arányban tartalmazzák ezeket), névlegesen a 3-*O*- $\beta$ -cellobiozil-D-glükopiranóz (G4G3G) és a 3-*O*- $\beta$ -cellotriozil-D-glükopiranóz (G4G4G3G) (3. ábra). A  $\beta$ -glükán lebontás utolsó lépéseként az előbb bemutatott oligoszacharidok lebontására kerül sor, amelyet a  $\beta$ -glükózidáz és egyéb  $\beta$ -glükán

exo-hidroláz enzimek katalizálnak. Mivel a  $\beta$ -glükózidáz enzim a nem redukáló láncvégről képes glükóz molekulákat lehasítani, ezért működése hatásaként a G4G4G3G szubsztrátból G4G3G és egy szabad glükóz molekula, a G4G3G szubsztrátból laminaribióz (G3G) és egy újabb glükóz molekula, a G3G szubsztrátból pedig két szabad glükóz molekula keletkezik (23. ábra).



**23. ábra**

A  $\beta$ -glükózidáz enzim működése a glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztráton.

A  $\beta$ -glükán és enzim lebontásának a már korábban ismertetett élelmiszeripari jelentőségei miatt, az enzim működési mechanizmusának és kinetikai paramétereinek ismerete elengedhetetlen fontosságú, annak hatékony és gazdaságos felhasználása érdekében. Korábban már folytak kutatások, amelyek során a  $\beta$ -glükózidáz enzim kinetikai paramétereit határozták meg árpából előállított  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid szubsztrátokon [HRMOVA & FINCHER, 1998; HRMOVA et al., 1998]. Ezekben a kísérletekben a kinetikai paramétereket mindig egy adott tiszta szubsztrát esetében határozták meg hagyományos biokémiai módszerekkel, a felszabaduló glükóz vagy redukáló láncvégek mennyisége alapján. Azonban meg kell jegyezni, hogy a felszabaduló glükóz vagy redukáló láncvégek mennyiségének nyomon követésével nem minden esetben kapunk pontos képet a szubsztrát mennyiségének alakulásáról a reakció során. Ez egyes kinetikai paraméterek meghatározása során hibákhoz vezethet, továbbá ez az eljárás nem alkalmazható olyan rendszerekben ahol egyszerre több  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid szubsztrát van jelen (pl. glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán).

Az említett problémára megoldást jelenthet az irodalmi áttekintésben bemutatott HPAEC-PAD mérési módszer. Ennek feltétele egy olyan mennyiségi meghatározási módszer kidolgozása, amely a  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidok mennyiségének valós és pontos meghatározását teszi lehetővé. Amennyiben ez rendelkezésre áll, a mérési módszer lehetőséget ad arra, hogy a  $\beta$ -glükozidáz enzim kinetikai paramétereit pontosan meghatározzuk (a szubsztrát mennyisége alapján), akár olyan rendszerben is ahol egyszerre több szubsztrát van jelen. Ezen túlmenően, ha ismerjük a natív, oldott enzim kinetikai paramétereit, azt is meg tudjuk állapítani, hogy milyen hatással van egy adott rögzítési eljárás az enzim katalitikus tulajdonságaira egy ilyen jellegű felhasználás során. Az irodalomban sem a HPAEC-PAD rendszerrel történő pontos mennyiségi meghatározásra (az említett árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidok esetében), sem pedig a  $\beta$ -glükozidáz enzim működésének és kinetikai paramétereinek a vizsgálatára (az említett szubsztrátokon) műszeres analitikai módszerekkel még nem került sor. Ezért a tanulmányozott élelmiszeripari felhasználások közül, tudományos jelentősége miatt ezt a területet választottam, amelyen elsőként folytattam részletes vizsgálatokat a norvégiai Nofima Mat kutatóintézzettel együttműködésben.

#### *5.5.4.1 A natív enzim inaktiválási lehetőségeinek vizsgálata*

Mivel az árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidok lebontását műszeres analitikai módszerrel követtem nyomon, ezért a reakció elegyből kivett minták esetében az enzim inaktiválás a szokásosnál is nagyobb szerepet kapott, a mintavétel és a mérés között esetlegesen fennálló nagy időkülönbség miatt. Gyakorlati és elméleti megfontolások alapján, több az irodalomban is alkalmazott módszert vizsgáltam meg: hőinaktiválás, szerves oldószer alkalmazása, enzim inhibitorok használata és ezek lehetséges kombinációinak tanulmányozását is elvégeztem. A pontos mérési eredmények elérése érdekében az enzim teljes inaktiválását tűztem ki célul, és ehhez olyan módszert kívántam alkalmazni, ami gyors és kíméletes így sem a vizsgálandó anyagokra sem pedig a műszeres mérésre nincs hatással. Az MS rögzített enzim esetében ezzel a problémával nem kellett számolnom, mert a későbbi vizsgálatok igazolták, hogy a mérésekhez előkészített MS rögzített enzimműködés esetében számottevő mértékű leoldódás nem volt tapasztalható. A méréseket a 4.6.4.1 pontban leírtak alapján hajtottam végre. A nagyszámú mérési eredmény és a most tárgyalt fejezet jelentősége miatt csak a legalkalmasabbnak tűnő eljárások (és ezek kombinációi) esetén tapasztalt maradék aktivitás értékeket fogom bemutatni (10. táblázat).



**10. táblázat:** A natív enzim inaktiválási lehetőségeinek összefoglaló bemutatása.

A vegyszerek koncentrációja az inaktiváló elegyben		Maradék aktivitás (%)	
		+ 2 perces hőinaktiválás forrásban lévő vízfürdőben	
Imidazol (mM)	10	11	0
	25	1	0
	50	0,2	0
$\omega$ -N-acetil hisztamin (mM)	5	8	0
	10	3	0
	20	0,3	0
Acetonitril %(V/V)	25	22	0
	50	5	0
Acetonitril + Imidazol	10 %(V/V) ACN + 25 mM Imidazol	0,4	0
	10 %(V/V) ACN + 50 mM Imidazol	0,1	0
	50 %(V/V) ACN + 50 mM Imidazol	0,03	0
Acetonitril + $\omega$ -N-acetil hisztamin	25 %(V/V) ACN + 20 mM $\omega$ -N-ac.	0,15	0
	50 %(V/V) ACN + 20 mM $\omega$ -N-ac.	0,03	0

Az alkalmazott üvegekémcsövek esetében azt tapasztaltam, hogy 30 másodperc volt szükséges az enzim teljes inaktiválásához. Az enzim inaktiválódása eleinte lassú volt, majd 15 másodperc után az inaktiválódás sebessége nagymértékben növekedett. Az első 15 másodperc feltehetőleg az üvegekémcső és a benne levő oldat felmelegedéséhez volt szükséges, amely tény rávilágított arra, hogy eltérő üvegeszköz más tulajdonságokkal bírhat a hőinaktiválás szempontjából, ezért a továbbiakban 2 perces kezeléseket alkalmaztam. Későbbiekben ki fogok térni arra, hogy miért igyekeztem lecsökkenteni a hőkezelés idejét, az általánosan alkalmazott 5 perces kezeléshez képest. A fehérjék katalitikus aktivitásának hőmérséklet függésének jellegéből adódóan, a hőinaktiválás során van egy rövid nem kívánt szakasz, amikor az enzim a megemelkedett hőmérsékleten nagy aktivitással rendelkezik (az adott szubsztrát koncentrációtól függően), ezért ezt az eljárást önmagában nem, csak kiegészítő jelleggel alkalmaztam.

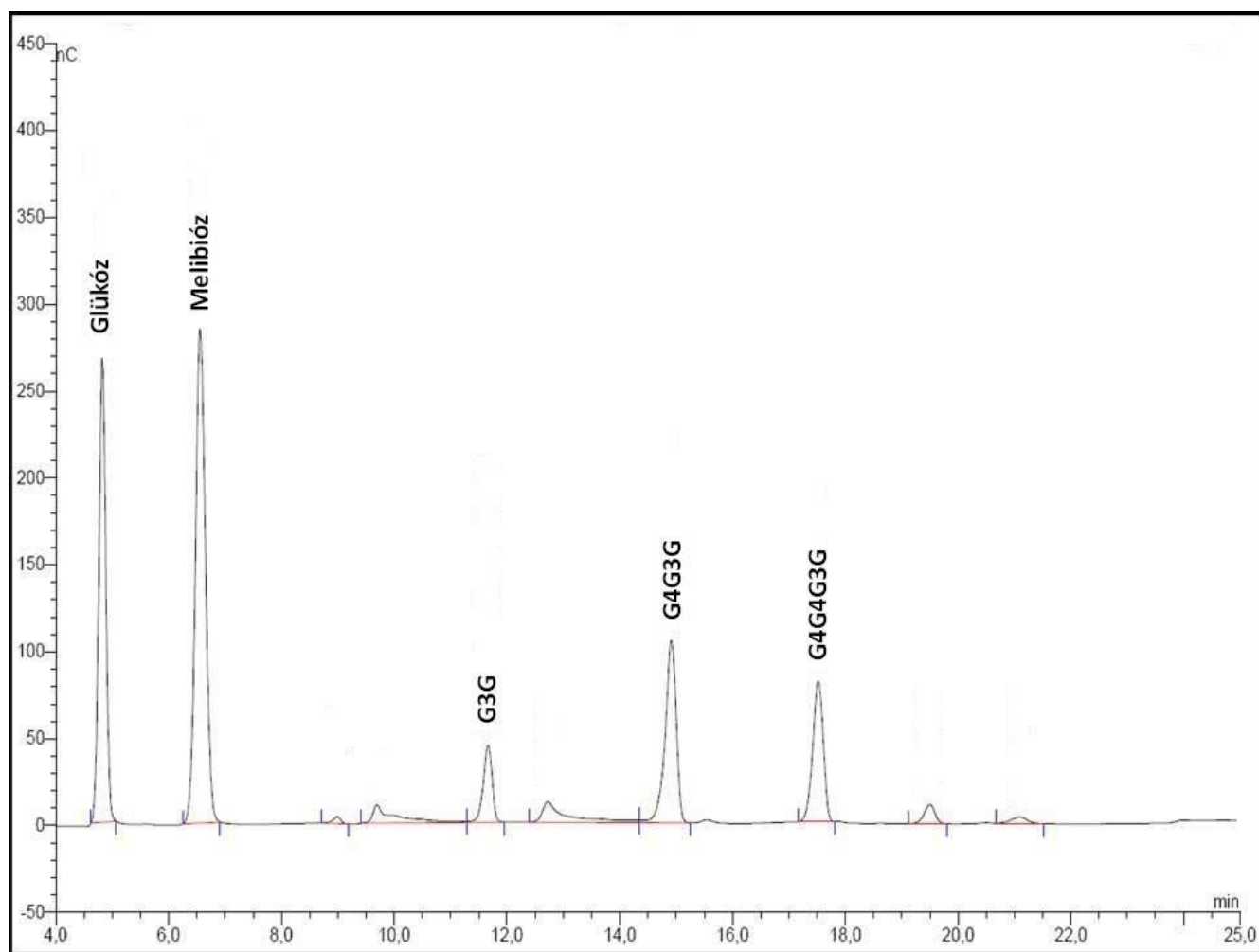
Irodalmi források alapján (FIELD et al., 1991), 3 különféle, számomra is könnyen hozzáférhető enziminhibitort teszteltem: hisztidint, imidazolt és  $\omega$ -N-acetil hisztamint. A szerzők azt találták, hogy a leghatékonyabban az  $\omega$ -N-acetil hisztamin, az imidazol majd pedig a hisztidin volt alkalmazható. Az én méréseim is ezt támasztják alá, ugyanis azt találtam, hogy az enzim aktivitásában 50 % csökkenés volt tapasztalható, amikor az  $\omega$ -N-acetil hisztamin 0,5 mM, az imidazol 3 mM és a hisztidin pedig 50 mM koncentrációban volt jelen. Mivel az alkalmazott inhibitorok szerkezetükből adódóan károsak lehetnek a HPAEC mérés során alkalmazott oszlopra, ezért a lehető legkisebb koncentrációban érdemes őket alkalmazni.

Szerves oldószerként acetonitrilt teszteltem (a Nofima Mat norvég kutatóintézetrel kapcsolatban álló, UMB egyetemen dolgozó Vincent Ejsink professzor ajánlása alapján), amely során azt tapasztaltam, hogy az alkalmazott mérési elegyben 10 %(V/V) értékben jelen levő acetonitril csak kismértékben inaktíválja az enzimet, amíg 25 és 50 %(V/V) értékek esetén az inaktíváló hatás már jelentős mértékű (22 és 5 % maradék aktivitás). Az irodalomban található olyan hivatkozás is, amely ennek teljes mértékben ellent mond, ugyanis Vic és munkatársai (1995) azt tapasztalták, hogy a mandulából izolált  $\beta$ -glükozidáz enzim teljes mértékben megőrizte aktivitását 90 %(V/V) acetonitril és 10 %(V/V) víz elegyében, meg kell azonban említeni, hogy rajtuk kívül senki nem közölt hasonló eredményeket.

Az acetonitril és az inhibitorok együttes alkalmazás esetén a natív enzim majdnem teljes mértékben inaktíválható volt (ez esetekben a hőinaktíválás szükségtelen), azonban a HPLC oszlopot is gyártó Dionex munkatársai nem tudtak felvilágosítást adni az alkalmazott inhibitorok esetleges káros hatásairól, csak arról, hogy 50 %(V/V) koncentrációban az acetonitril biztonságosan injektálható és alkalmazható. Ezért a műszeres mérések során alkalmazott mérési elegyek 50 %(V/V) térfogatban tartalmaztak acetonitrilt és mintavétel után (tehát az enzimaktivitás 5 % alatt a mérési elegyben) még 2 percig voltak inkubálva forrásban lévő vízfürdőben. A mérési elegyek teflonbevonatú kupakkal lezárt üvegcsékben voltak, azonban az acetonitril párolgásának nagy veszélye miatt fontos volt a minél rövidebb hőkezelési idő. Az azonos mintakezelés érdekében az MS rögzített enzimes kísérletek során kivett mintákat is ugyanebbe a mérési elegybe helyeztem és hasonló módon jártam el a továbbiakban is.

#### *5.5.4.2 Az árpa $\beta$ -glükán oligo- és diszacharidok HPAEC-PAD rendszerrel történő meghatározása*

HPAEC-PAD rendszerrel történő méréseket a 4.6.4.2 pontban leírtak alapján hajtottam végre. A glükóz, G3G, G4G3G, G4G3G3G és a melibióz [mint belső standard ( $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc)] alapvonali elválasztását, olyan pozitív acetát gradiens létrehozásával értem el, amelynek paraméterei FUKAMIZO és munkatársai (2008) által alkalmazott paramétereken alapszik. A használt gradiens elúciós program megfelelő elválasztási hatékonyságot biztosított (24. ábra), így ezen paraméterek optimalására nem került sor.



**24. ábra**

$\beta$ -glükoszidáz enzimmel kezelt, glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán kromatogramja.

A glükánáz által hidrolizált  $\beta$ -glükánok és a magasabb polimerizáltsági fokkal (DP) rendelkező  $\beta$ -glükánok kvantifikálásához általánosan malto-oligoszacharidokat használnak, mivel ezen  $\beta$ -glükánok elegendő mennyiségben való előállítása hosszadalmas és drága, valamint kereskedelemben csak az elmúlt egy-két évben váltak elérhetővé. Korábban többen is úgy találták, hogy a többféle kötést is tartalmazó  $\beta$ -glükán oligoszacharidok viselkedése a detektorral szemben hasonló, mint az azonos DP értékkel rendelkező malto-oligoszacharidoké, ezért ezek a szerzők a megfelelő DP értékkel rendelkező malto-oligoszacharidokat használták a mennyiségi meghatározás alapjául [JIANG & VASANTHAN, 2000, KOIZUMI et al., 1989, VAN RIEL & OLIEMAN, 1991]. Azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni a strukturális különbséget a  $\beta$ -glükánok és a malto-oligoszacharidok között, mivel a malto-oligoszacharidok olyan lineáris glükóz láncok, amelyekben kizárólag  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) kötések fordulnak elő. Ezáltal a jelen levő malto-oligoszacharidok mennyiségének változásával, a detektorban

kiváltott jel mértékének változása eltérő lehet. Erről a témakörrel máig sem született még egységes álláspont, ezért a kvantifikálás során a lehetséges hibák elkerülésének érdekében, a Megazyme által újonnan forgalmazott megfelelő standardokat (G3G, G4G3G, G4G4G3G) alkalmaztam. A mérések során belső standardot is használtam, amelyhez olyan szénhidrátot kellett találnom, amelynek retenciós ideje nem egyezik meg egyik detektálni kívánt szénhidráttal sem. A vizsgált szénhidrátok közül ennek egyedül a melibióz tett eleget. A belső standard használata általában a gázkromatográfiás mérések körében elterjedt, így az irodalomban sem találni példát arra amikor  $\beta$ -glükán oligo- és diszacharidok mennyiségének HPAEC-PAD rendszerrel való mérése során belső standardot alkalmaztak volna. Ennek használata azonban elengedhetetlen, mert közismert, hogy a PAD detektor a sorozatmérések során veszít érzékenységből, amelyet a rendszer mosásával lehet csak normalizálni, azonban belső standard használatával ezen hibák korrigálhatók. További előnye, hogy a belső standard hozzáadása után, a mintát ért bármilyen behatás (pl. a minta párolgása vagy hígulása stb.) korrigálható és kalkulálható. A kromatogramon 9,5 valamint 13 percnél megfigyelhető két azonosítatlan csúcs is, amelyek feltehetőleg a G4G3G és G4G4G3G lúgos környezet (mérés során alkalmazott eluens) hatására létrejövő módosulatai. Ennek megállapítása érdekében kísérleteket végeztem, amelyek eredményei igazolták feltevésemet. Ugyanis azt tapasztaltam, hogy lúgos közegben (pH 12, 10 mM NaOH) való inkubálás során ezen csúcsok területei az eltelt idővel arányos növekedtek, amíg a G4G3G és G4G4G3G csúcsok területei szintén arányosan csökkentek. Ezt a problémát korábban az irodalomban még senki nem vizsgálta, így a keletkező anyagok szerkezeti meghatározására sem került még sor. Ezek azonosítását jelenleg is végzem a Nofima Mat kutatóintézettel együttműködésben. Az így fellépő hibával azonban méréseim során nem kalkuláltam, mivel állandó mérési körülményeket alkalmaztam. Viszont az elsődlegesen az enzim inaktiválására használni kívánt lúgos pH (a mérés során is alkalmazott NaOH oldattal) nem volt alkalmazható, ezért kellett az 5.5.4.1 pontban bemutatott széles körű vizsgálatokat elvégezni.

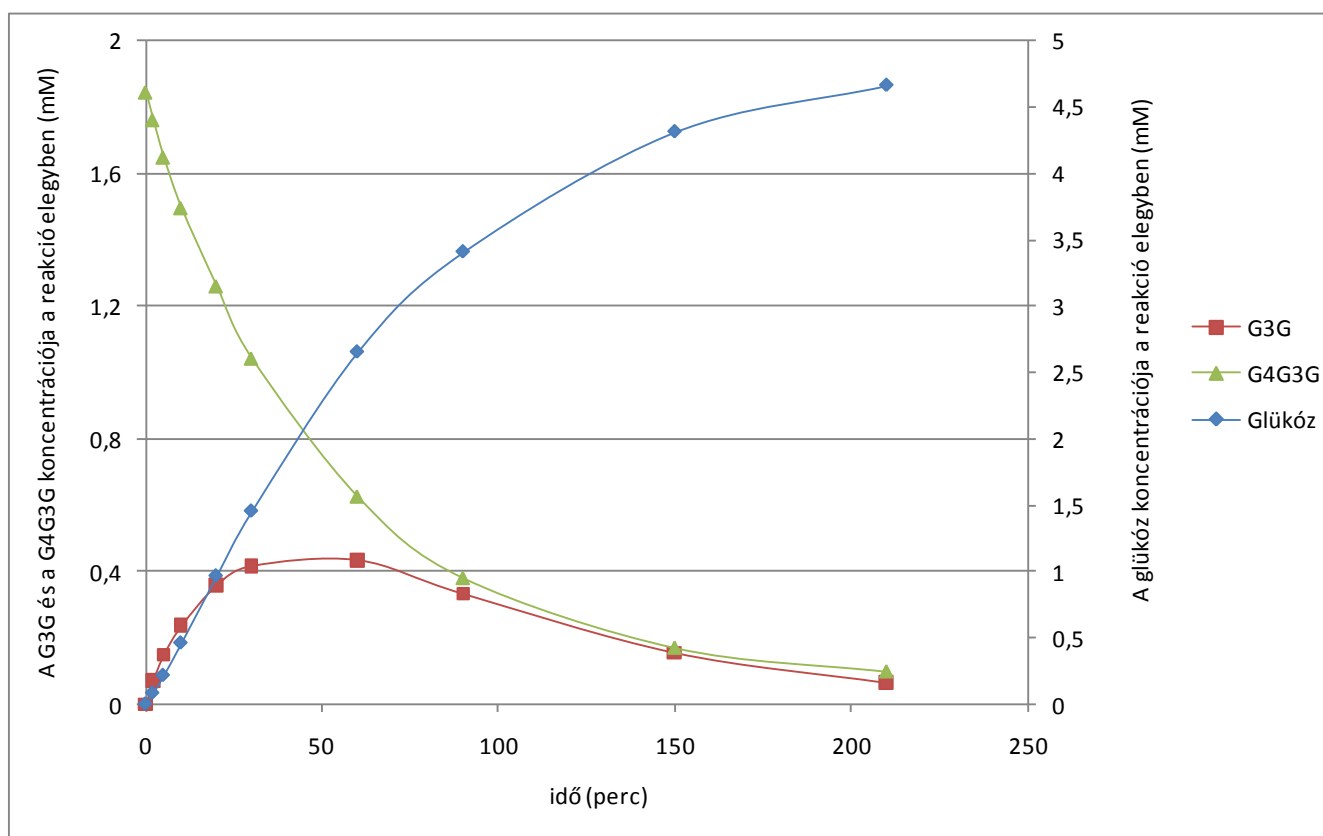
A méréseim során alkalmazott belső standard és a kvantifikáláshoz használt újonnan beszerezhető standardok, olyan, az irodalomban eddig még be nem mutatott meghatározási módszert tettek számomra lehetővé, amellyel akár egy enzimreakció pontos nyomon követése is lehetővé vált.

#### *5.5.4.3 Az enzimkészítmények kinetikai paramétereinek meghatározása a tiszta árpa $\beta$ -glükán oligo- és diszacharid szubsztrátokon*

Az irodalmi eredmények alapján megállapítható, hogy a glükózból felépülő szubsztrátokon, az exohidrolázok kinetikai paramétereit általában a felszabaduló glükóz molekulák, vagy redukáló

láncvégek alapján határozzák meg [KAWAI et al., 2004; HRMOVA & FINCHER, 1998; HRMOVA et al., 1998; HRMOVA et al., 1996; PÉREZ-PONS et al., 1995]. A glükózból felépülő szubsztrátok esetében, különösen a kettőnél nagyobb polimerizáltsággal és esetleg vegyes kötésekkel rendelkezőknél azonban a kinetikai paraméterek meghatározása a felszabaduló glükóz vagy redukáló láncvégek alapján hibához vezethet. Kihasználva a HPAEC-PAD mérési módszer hatékonyságát, lehetőségem volt, hogy meghatározzam a  $\beta$ -glükozidáz enzimkészítmények kinetikai paramétereit a tiszta G3G, G4G3G és G4G4G3G szubsztrátokon, mind a jelen levő szubsztrát mind pedig a felszabadult glükóz mennyisége alapján. A könnyebb követhetőség érdekében először a natív enzim vizsgálata során tapasztaltakat és ennek kinetikai eredményeit mutatom be és hasonlítom össze az irodalmi eredményekkel, majd ez alapján kerülnek bemutatásra az MS rögzített enzimkészítmény esetében mért eredmények.

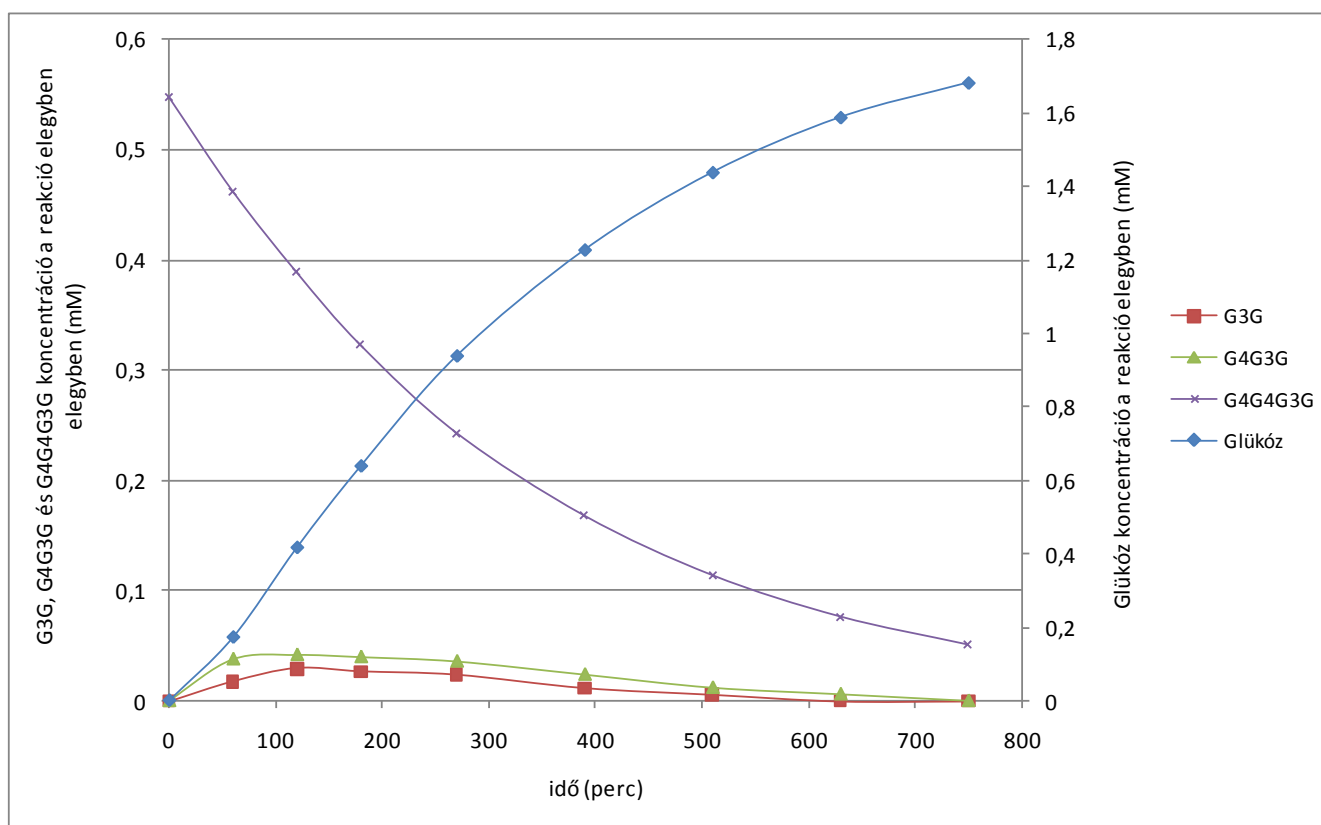
A vizsgálatokat különböző szubsztrát:enzim arányok mellett is elvégeztem, a kinetikai paraméterek meghatározása érdekében elvégzett kísérletet a 4.6.4.4 fejezetben leírtak mutatják be. Az összes elvégzett mérés előtt a natív enzimkészítményt a 4.6.4.3 pontban leírtak alapján szűrtem. Minden szubsztrát esetében azt tapasztaltam, hogy a felszabaduló glükóz mennyisége az enzimreakció során egy kezdeti lineárisan növekvő szakasz után, a szubsztrát mennyiségének fogyásával egyidejűleg telítési tendenciát követett. Az alkalmazott szubsztrátok mennyisége pedig értelemszerűen a kezdeti lineárisan csökkenő szakasz után, közel exponenciális függvénnyel volt leírható. A G4G3G hidrolízise során először a nem redukáló láncvégről kerül leszakításra egy glükóz molekula és az így keletkező G3G egyszerre lett termék és szubsztrát a rendszerben. A G3G mennyiségében először egy növekvő szakasz, majd egy maximum koncentráció elérése után csökkenés volt tapasztalható (25. ábra). Ez alapján kompetitív inhibíciót feltételeztem a G4G3G és a G3G között. A G3G képződése és növekvő mennyisége a reakció elején azt is eredményezte, hogy a felszabaduló glükóz mennyisége az idő függvényében kisebb volt a reakció elején, mint később, amikor a maximum értéket mutatott. Megfigyelhető továbbá, hogy a rendszerben levő G3G (felhalmozódásával és lebomlásával a szubsztrát koncentrációjától függően) szabályozni tudta a felszabaduló glükóz mennyiségét a reakció során, és így képes volt a képződő glükóz mennyisége számára hosszabb lineáris szakaszt eredményezni, mint amilyen a szubsztrát csökkenésében volt tapasztalható. Ennek a kinetikai paraméterek meghatározása során van jelentősége, ugyanis a szubsztrát és a végtermék alapján történő meghatározás során eltérő eredményeket kaphatunk.



**25. ábra**

A tiszta G4G3G szubsztrátum natív  $\beta$ -glükozidáz enzim által történő lebontása során általánosan megfigyelt hidrolízis görbék a reakció elegyben (23 °C hőmérséklet és pH 5,50 kémhatás mellett).

A G4G4G3G lebontásakor a felszabaduló G4G3G (és az ebből felszabaduló G3G) egyszerre volt termék és szubsztrát, amelyek mennyiségében kezdetben kismértékű növekedés volt tapasztalható, majd közel állandó, alacsony koncentrációban voltak jelen a reakció során (26. ábra). A G4G3G és G3G mennyiségében megfigyelhető kezdeti növekedés szintén azt eredményezte, hogy a felszabaduló glükóz mennyiségének a sebessége a reakció kezdetén alacsonyabb volt, mint a későbbiekben.



**26. ábra**

A tiszta G4G4G3G szubsztrátum natív  $\beta$ -glükozidáz enzim által történő lebontása során általánosan megfigyelt hidrolízis görbék a reakció elegyben (23 °C hőmérséklet és pH 5,50 kémhatás mellett).

A kinetikai paraméterek meghatározása során azért nem tudtam a hagyományos meghatározási módszert (és modelleket) alkalmazni, miszerint különböző szubsztrát koncentrációk mellett meghatározom a kezdeti enzim aktivitásokat (lehetőleg a  $K_m$  érték 0,1-10-szeres tartományában), mert szubsztrátként a forgalomban nem rég kapható standardokat használtam, így a hagyományos vizsgálati módszer irreálisan magas költségekkel járt volna. Mivel kétszer 2 hónapot volt csak lehetőségem Norvégiában tölteni, ez az idő nem lett volna elég a szubsztrátok helyben történő előállítására és a szükséges számú mérések elvégzésére. Arról sem szabad továbbá megfeledkezni, hogy a bemutatott, vizsgált rendszerek nagyfokú komplexitása miatt, a hagyományosan alkalmazott kinetikai modellek nagymértékű hibákhoz vezethettek volna. Az elmondottak okán a kinetikai paraméterek meghatározásához olyan módszerre volt szükségem, amely minden vizsgált esetben megbízhatóan alkalmazható és az alkalmazásával kapott eredmények összehasonlíthatók. A tiszta szubsztrátok esetében a kinetikai paramétereket a felszabaduló végtermék (glükóz) és a szubsztrát alapján is meghatároztam, amíg a glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükánon erre csak a szubsztrátok mennyisége alapján volt lehetőségem. Minden vizsgálat esetében a szubsztrát és az enzim koncentráció arányát

addig növeltem a tízszeresére, amíg a szubsztrát mennyiségének a kezdeti csökkenésének és/vagy a felszabaduló glükóz mennyiségének a kezdeti felszabadulásának a mértékében 20 %-nál alacsonyabb eltérés nem volt tapasztalható a változtatás hatására, ezt tekintettem közel szubsztrát telítettségi állapotnak. Ezeket a megfelelő szubsztrát:enzim arányokat alkalmaztam, hogy a szubsztrát és/vagy a glükóz mennyisége a reakció elején lineárisan csökkenjen vagy növekedjen legalább fél órán keresztül. Ezeket a lineáris szakaszokat minden esetben legalább 4 mérési ponttal azonosítottam ( $R^2 > 0,998$ ), és a  $K_{cat}$  értékeket ezek alapján határoztam meg. Mivel nem nevezhettem ezeket tökéletes szubsztrát telítettségi állapotnak ezért a továbbiakban  $K_{cat}'$  jelzést használok. A  $K_m$  értékeknek az így meghatározott maximális aktivitások feléhez tartozó szubsztrát koncentrációkat tekintettem, amelyeket a mérési pontokhoz illesztett megfelelő (leginkább illeszkedő) függvények egyenletei alapján határoztam meg. A  $K_m$  állandó minden vizsgált szubsztrát:enzim aránynál meghatározásra került és értékükben hasonló mértékű változások voltak megfigyelhetők, mint a  $K_{cat}$  értékek esetén a szubsztrát:enzim aránytól függően. Ezért a továbbiakban ez az állandó pedig  $K_m'$  jelzést kap. Az elvégzett vizsgálatokkal az enzim kinetikai állandókat gyakorlati úton határoztam meg (közel szubsztrát telítettségi állapotban), így ezek elméleti értelemben nem pontos kinetikai paraméterek, de az így kapott eredmények összehasonlíthatók mivel a meghatározás paraméterei és menete minden esetben azonos volt.

A kinetikai paraméterek meghatározásához szükséges vizsgálatokat a 4.6.4.4 pontban leírtak alapján hajtottam végre, amely vizsgálatok előtt az alkalmazott enzimoldatot a 4.6.4.3 fejezetben megadottak szerint szűrtem. Az eredményeket a 11. és 12. táblázat mutatja be. A könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért itt mutatom be a glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükánon mért eredményeket is.



**11. táblázat:** A natív enzimkészítmény kinetikai paramétereai a különböző rendszerekben és szubsztrátokon.

		Szubsztrát alapján			Végtermék alapján		
		$K_{cat}'$ ( $S^{-1}$ )	$K_m'$ (mM)	$K_{cat}'/K_m'$ ( $10^{-3} S^{-1} M^{-1}$ )	$K_{cat}'$ ( $S^{-1}$ )	$K_m'$ (mM)	$K_{cat}'/K_m'$ ( $10^{-3} S^{-1} M^{-1}$ )
Tiszta szubsztrát	<b>G3G</b>	1,46	5,24	0,2786	1,51	5,37	0,2812
	<b>G4G3G</b>	0,119	1,62	0,0735	0,061	0,79	0,0772
	<b>G4G4G3G</b>	0,0026	0,34	0,0076	0,0022	0,35	0,0063
Glükanáz által hidrolizált árpa $\beta$ -glükán szubsztrát	<b>G3G</b>	-	-	-			
	<b>G4G3G</b>	0,053	0,88	0,0602			
	<b>G4G4G3G</b>	0,0019	0,54	0,0035			

**12. táblázat:** Az MS rögzített enzimkészítmény kinetikai paramétereinek százalékban kifejezett értékei a különböző rendszerekben és szubsztrátokon a natív enzimhez képest.

		Szubsztrát alapján			Végtermék alapján		
		$K_{cat}'$ ( $S^{-1}$ )	$K_m'$ (mM)	$K_{cat}'/K_m'$ ( $10^{-3} S^{-1} M^{-1}$ )	$K_{cat}'$ ( $S^{-1}$ )	$K_m'$ (mM)	$K_{cat}'/K_m'$ ( $10^{-3} S^{-1} M^{-1}$ )
Tiszta szubsztrát	<b>G3G</b>	7,67	90,27	8,50	7,55	88,45	8,54
	<b>G4G3G</b>	10,08	102,47	9,84	8,20	97,47	8,41
	<b>G4G4G3G</b>	11,92	105,88	11,26	10,91	108,57	10,05
Glükanáz által hidrolizált árpa $\beta$ -glükán szubsztrát	<b>G3G</b>	-	-	-			
	<b>G4G3G</b>	11,32	107,95	10,49			
	<b>G4G4G3G</b>	13,68	112,96	12,11			

Az előzetes feltételezésemmel megegyezően, a kinetikai paraméterekben eltérések voltak tapasztalhatók attól függően, hogy a rendszerben jelen levő szubsztrát vagy pedig a felszabaduló végtermék alapján kerültek meghatározásra. Ezen eltérések mértéke a vizsgált szubsztráttól függően változott, amely eredmények jól magyarázhatók az előzőekben bemutatott eredményekkel. A G3G szubsztráton, ahol csak egy  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) kötés került hidrolizálásra, számottevő eltérés nem volt tapasztalható a kinetikai paraméterekben. A G4G3G szubsztrát esetében a reakció elején felszabaduló és a nagymértékben felhalmozódó G3G jelentősen képes befolyásolni (csökkenteni) a felszabaduló végtermék (glükóz) mennyiségét az idő függvényében, így a kinetikai paraméterekben is jelentős eltérések voltak tapasztalhatók, amikor az irodalomban is alkalmazott módszer szerint a felszabaduló glükóz mennyisége alapján kerültek meghatározásra. Mind a  $K_{cat}$ , mind pedig a  $K_m$  érték közel a fele volt a szubsztrát mennyisége alapján meghatározott értékekhez képest, azonban az enzim katalitikus hatékonyságának a jellemzésére szolgáló paraméterben a  $K_{cat}/K_m$  értékében jelentős eltérés nem volt tapasztalható. A G4G4G3G lebontása során bemutattam, hogy kis mennyiségben G4G3G és G3G is felszabadul, amely aztán közel állandó koncentrációban van jelen. Ez a jelenség szintén képes befolyásolni a felszabaduló glükóz mennyiségét és ezáltal a kinetikai paraméterek értékeit, azonban az eltérés lényegesen alacsonyabb, mint a G4G3G esetében. A  $K_{cat}$  értékében mindössze 20 % csökkenés volt megfigyelhető a szubsztráton meghatározott paraméterhez képest, amíg a  $K_m$  értékek közel azonosak voltak.

A bemutatott eredmények alapján kijelenthető, hogy az ilyen jellegű szubsztrátok esetén egy adott exohidroláz kinetikai paramétereinek pontos meghatározásához a szubsztrát mennyiségének a nyomon követése szükséges, mivel a felszabaduló végtermék mennyisége alapján történő számolás hibákhoz vezethet. Mivel a kinetikai paraméterek definíció szerinti meghatározását csak a szubsztrát mennyisége alapján történő számolás tette lehetővé, továbbá ezzel a módszerrel olyan komplex rendszerekben is lehetőség van a kinetikai paraméterek megállapítására, ahol a reakció kezdetén több szubsztrát is jelen van (pl. glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán), ezért a további kísérletek során ezt a fajta meghatározási módszert alkalmaztam.

Általában elmondható, hogy a  $\beta$ -D-glükán exohidrolázok aktivitása a lamino- és cello-oligoszacharid szubsztrátokon a lánchossz növekedésével csökken [KAWAI et al., 2004; HRMOVA et al., 1998; PITSON et al., 1997], azonban ettől eltérő eredményt is publikáltak már [PÉREZ-PONS et al., 1995]. Ennek a csökkenésnek a mértéke nagyon eltérő lehet, amely leginkább az enzim származási helyétől és a szubsztrát típusától függ. Az irodalmi adatokkal megegyezően [HRMOVA et al., 1998] én is azt tapasztaltam, hogy a lánchossz egy egységgel való növekedése több mint egy nagyságrenddel képes az enzim aktivitását csökkenteni. A legnagyobb aktivitást ( $1,46 \text{ S}^{-1}$ ) a G3G szubsztráton mértem,

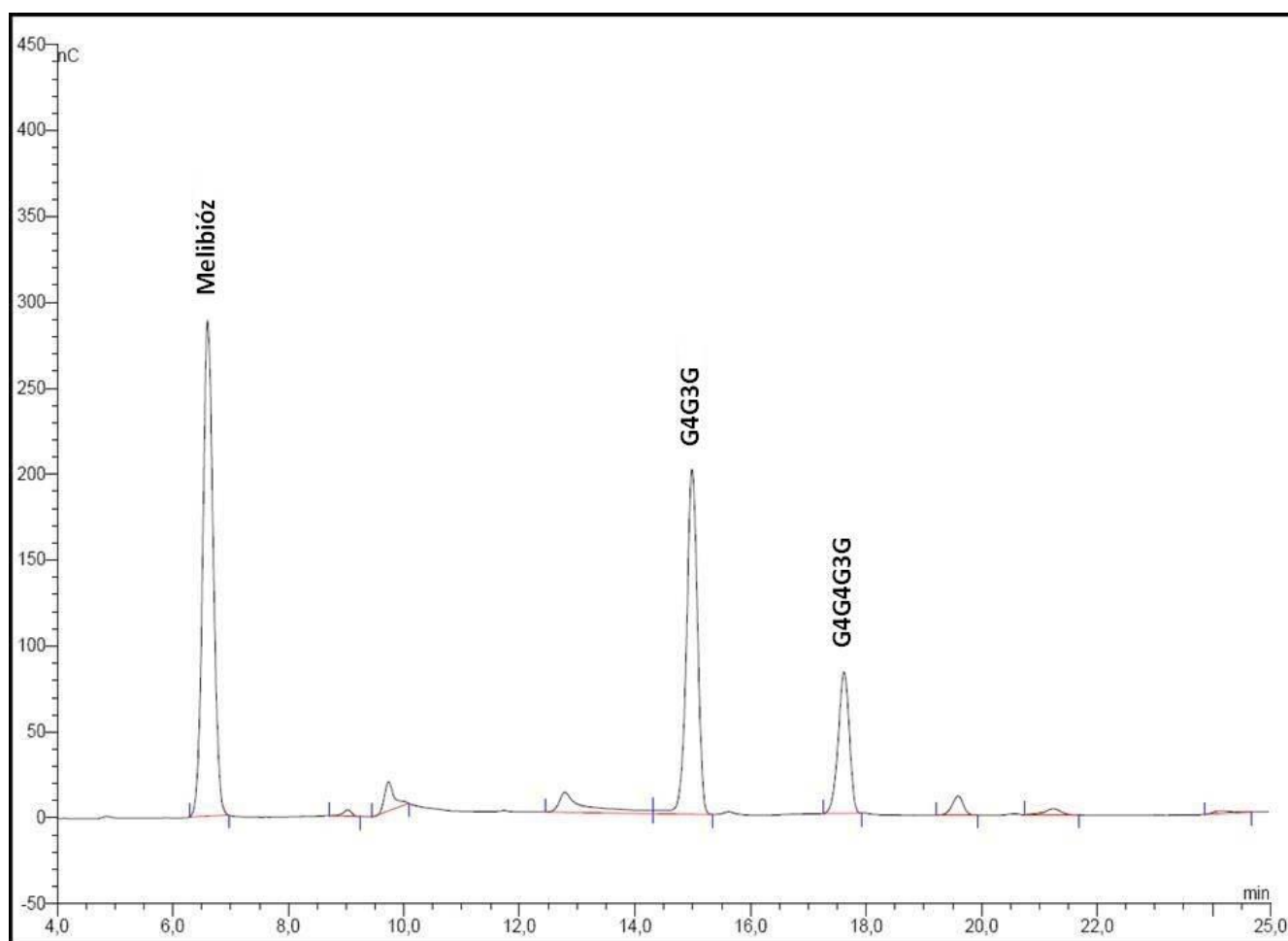
amely érték nagyban elmarad a Hrmováék által árpából kivont  $\beta$ -glükózidáz enzim aktivitásától ( $14 \text{ S}^{-1}$ ). A  $K_m$  értékek azonban nagyfokú hasonlóságot mutattak, ugyanis a G3G szubsztráton az általam alkalmazott (mandulából kivont) enzimmészítmény  $5,24 \text{ mM}$  értékkel, addig a Hrmováék által kivont enzimmészítmény  $5,37 \text{ mM}$  értékkel rendelkezett. Ezek az eredmények jól szemléltetik az alkalmazott enzim katalitikus aktivitásának a specifitását a származási helyétől függően. Szintén a  $\beta$ -glükózidáz származási helyétől függően a G3G szubsztráton mért aktivitása lehet magasabb [PITSON et al., 1997], közel megegyező [HRMOVA et al., 1998] vagy alacsonyabb [PÉREZ-PONS et al., 1995], mint a cellobióz szubsztráton. Az általam alkalmazott enzimmészítmény aktivitása G3G szubsztráton közel a fele volt a cellobiózon mért aktivitásnak ( $3,15 \text{ S}^{-1}$ ). A natív enzim továbbá 12-szer és 560-szor alacsonyabb aktivitást mutatott a G4G3G és G4G4G3G szubsztrátokon, mint a G3G szubsztráton.

Az MS rögzített enzimmészítménnyel végzett vizsgálatokhoz az enzimmészítményt a 4.6 pontban megadottak alapján állítottam elő, a méréseket pedig a 4.6.4.4 pontban leírtak szerint végeztem el. A kinetikai vizsgálatok elvégzése előtt, a létrehozott MS rögzített enzimmészítményt fél órán keresztül a későbbi felhasználás közegében rázattam, hogy a korábban bemutatottak miatt elérjem az MS rögzített enzimmészítmény maximális aktivitását, valamint, hogy a gyengébben kötődött enzim aggregátumok leoldódjanak. A reakciók végén az enzimleoldódásból származó enzimaktivitások nem voltak kimutathatók a reakcióelegyek felülúszójában. Az MS rögzített enzimmészítmény kinetikai paramétereit a könnyebb értelmezhetőség kedvéért a natív enzim értékeihez viszonyítva %-os értékekben adtam meg. A  $K_{cat}$  érték meghatározásához tudnom kellett a rögzített fehérje mennyiségét, amelyet az 5.2.2.4 fejezetben bemutatott fotometriás módszer alapján állapítottam meg. Ez alapján az MS rögzített enzimmészítmény  $K_{cat}$  értékei 7-12 % között változtak (12. táblázat) a natív enzim értékeihez képest, amely értékek lényegében az aktivitás rögzítési hozamának értékei. Kijelenthető, hogy ezeken a természetes szubsztrátokon megállapított rögzítési hozamok közel azonosak, mint a mesterséges pNPG szubsztráton meghatározott értékek (ugyanilyen enzim-hordozó aránynál 7 %). A  $K_m$  értékeknél is hasonló jelenséget tapasztaltam, mint a pNPG szubsztráton megállapítottaknál, miszerint a rögzítési eljárás számottevő mértékben nem volt képes befolyásolni ezen paramétereiket. Ennek magyarázata hasonló lehet, miszerint a fehérje szerkezetében a rögzítési eljárás számottevő eltérést nem eredményezett, így a fajlagos katalitikus aktivitásban tapasztalható nagymértékű csökkenés az enzim molekulák nem megfelelő térhelyzetben való adszorpciós rögzülésének, valamint az esetlegesen fennálló diffúziós gátlásoknak tulajdonítható. Ezáltal a megfelelő térhelyzetben rögzült enzimfehérjék hasonló  $K_m$  értékkel rendelkeznek, mint a natív enzim. Mivel a felszabaduló glükóz mennyisége alapján meghatározott kinetikai paraméterek natív enzimhez viszonyított százalékos értékei hasonló értékeket mutattak, mint a szubsztrát mennyisége alapján történő számolás során, így

kijelenthető, hogy a végtermék alapján történő számolás hasonló hibához vezetett, mint a natív enzimnél.

#### 5.5.4.4 A glükánáz által hidrolizált árpa $\beta$ -glükán oligoszacharid tartalmának meghatározása a reakcióelegyben

A glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán előállítását a 4.6.4.5 pontban leírtak alapján hajtottam végre. Az árpa  $\beta$ -glükán glükánáz enzimmel való lebontásának végtermékei (90 % értékben) tehát, a már korábban bemutatott G4G3G és G4G4G3G. Ezek aránya mintegy ujjlenyomatként jellemzőek az adott  $\beta$ -glükán forrására. Ezért is tartottam fontosnak az általam használt, a Megazyme által forgalmazott nagy tisztaságú árpa  $\beta$ -glükán enzim kezelése során kapott végtermékeinek mennyiségi meghatározását. A hidrolizátumról felvett kromatogramot a 27. ábra szemlélteti.



**27. ábra**

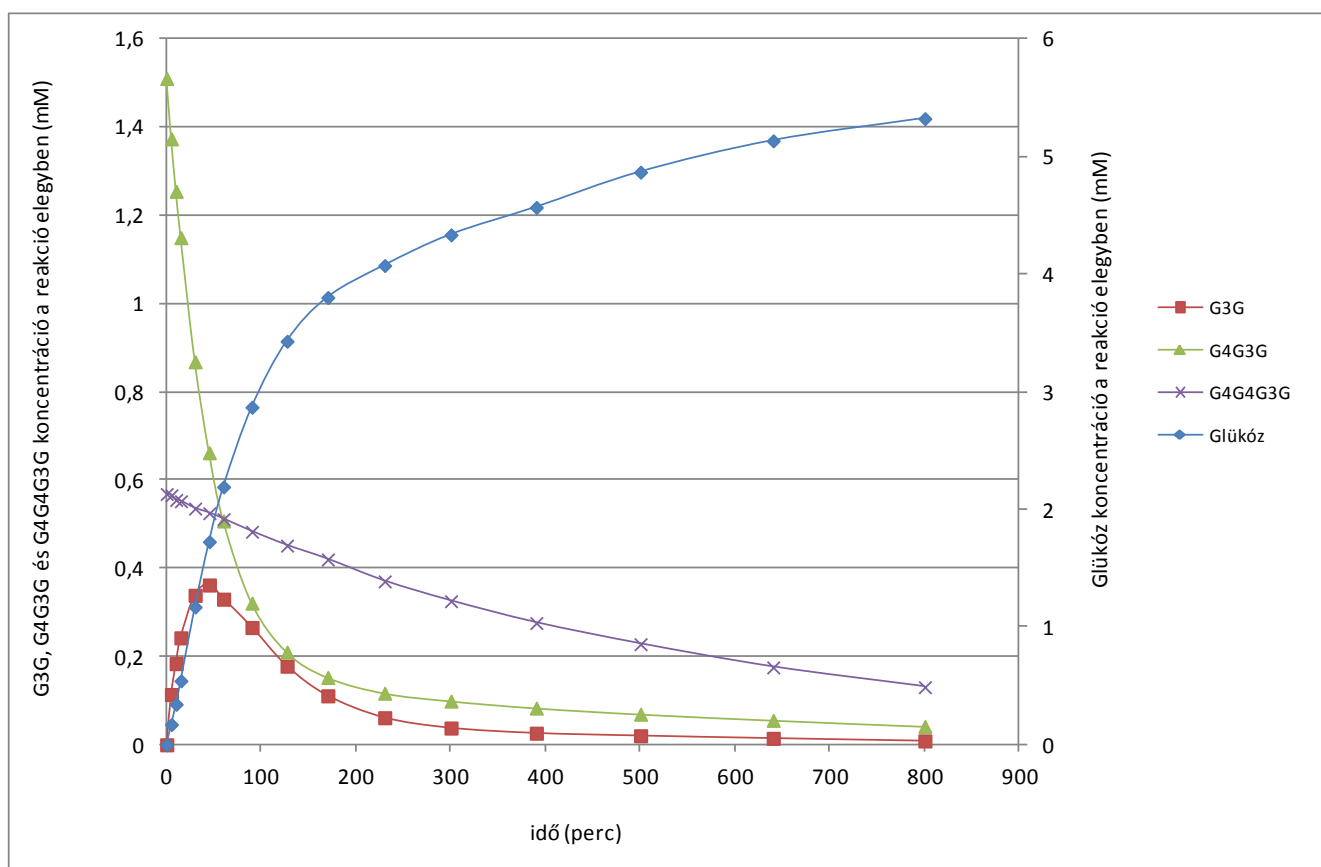
Glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztrát kromatogramja.

Esetemben a G4G3G:G4G4G3G aránya 1,99 volt, ami összhangban van JIANG és VASANTHAN (2000) eredményeivel, akik 10 különböző árpából izolált  $\beta$ -glükán esetében azt találták, hogy ez az arány 1,62 és 2,15 között változik. Az említett összetevőkön kívül más kisebb mennyiségben jelen levő anyagok is detektálhatóak voltak, amelyek minden bizonnyal az enzimes lebontás során keletkező nagyobb polimerizáltsági fokú oligoszacharidok voltak, valamint G3G nem volt kimutatható. A további kinetikai vizsgálatok során minden esetben ezt a hidrolizátumot használtam szubsztrátként.

#### *5.5.4.5 Az enzimmészítmények kinetikai paramétereinek meghatározása a glükánáz által hidrolizált árpa $\beta$ -glükánon*

Miután a tiszta árpa  $\beta$ -glükán oligo- és diszacharid szubsztrátokon meghatároztam az enzimmészítmények kinetikai paramétereit, fontosnak tartottam olyan természetes közegben (glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán) is ezen paraméterek meghatározását, amelyben a reakció kezdetén több szubsztrát is jelen van. Ennek vizsgálatát a kidolgozott HPAEC-PAD mérési módszer lehetővé tette, ugyanis az általánosan alkalmazott végtermék mennyiség mérési módszer ilyen rendszerekben nem alkalmazható. A méréseket a 4.6.4.6 pontban leírtak szerint hajtottam végre, az MS rögzített enzimmészítmény előállítását és előkezelését, valamint a kinetikai paraméterek meghatározását pedig az 5.5.4.3 pontban bemutatottak szerint végeztem el. Az eredményeket a 28. ábra és a 11. és 12. táblázat mutatja be. Ebben a fejezetben is először a natív enzim vizsgálatai során tapasztaltakat mutatom be részletesen, majd ezekhez viszonyítom az MS rögzített enzim tesztelése során kapott eredményeket.

Mivel a reakció elején a G4G3G és a G4G4G3G szubsztrátok meghatározott arányban voltak jelen, ezért a kinetikai paraméterek meghatározása során figyelembe kellett venni, hogy a G4G4G3G bontása közben G4G3G is keletkezik. A tiszta szubsztrátok esetében azt állapítottam meg, hogy az enzimmészítményeknek közel 45-ször alacsonyabb az aktivitása a G4G4G3G, mint a G4G3G szubsztráton. Mivel az így felszabaduló G4G3G nagyon kis mennyiséget jelent és ennek felszabadulása az idő függvényében közel lineáris a reakció elején, ezért a G4G4G3G szubsztrátból felszabaduló G4G3G mennyiségével nem kalkuláltam az enzimmészítmények G4G3G szubsztráton való kinetikai paramétereinek a meghatározása során. A natív enzimmel végrehajtott reakció során a felszabaduló glükóz mennyisége megközelítőleg logaritmikus függvénnyel volt leírható, amíg az elsődleges szubsztrátnak tekinthető G4G3G mennyisége ennek a fordított tendenciáját követve csökkent. A G4G4G3G mennyisége a reakció során pedig szintén közel exponenciális függvénnyel volt jellemezhető (28. ábra). A G3G mennyisége csak úgy, mint a tiszta G4G3G lebontása során, először növekedett, majd egy maximum koncentráció elérése után csökkenést mutatott.



**28. ábra**

A glükánáz hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztrátum natív  $\beta$ -glükozidáz enzim által történő lebontása során általánosan megfigyelt hidrolízis görbék a reakció elegyben (23 °C hőmérséklet és pH 5,50 kémhatás mellett).

A G4G4G3G szubsztráton meghatározott  $K_{cat}$ ' érték a 73 %-a volt a natív szubsztráton meghatározott értéknek, amíg a  $K_m$ ' paraméter értékében 59 %-os növekedés volt tapasztalható, így a katalitikus hatékonysága az enzimnek ebben a rendszerben 46 %-ra csökkent. Ezt a csökkenést a G4G3G szubsztrát jelenlétének tulajdonítottam és itt is a két szubsztrát között fennálló kompetitív jellegű inhibíciót feltételeztem. A G4G3G szubsztráton az enzim katalitikus aktivitásában 55 % értékű csökkenés volt mérhető, amíg a  $K_m$ ' értékben ennél kisebb, 46 %-os csökkenést határoztam meg, így a katalitikus aktivitás a 82 %-a volt a tiszta szubsztrát esetén mértnek. Főként a G4G3G szubsztráton bemutatott kinetikai paraméterek nem támasztják alá definíciószerűen a feltételezett kompetitív inhibíciót, amelynek főbb okai lehetnek, hogy: nem csak tisztán kompetitív inhibíció áll fenn a két szubsztrát között, hanem előfordulhat, hogy egyszerre képesek megkötődni az aktív helyen ezzel akadályozva a termékek kijutását. Természetesen az sem zárható ki, hogy az általam alkalmazott módszer ebben a rendszerben nem alkalmazható tökéletesen a kinetikai paraméterek pontos meghatározására (ez esetben az eredmények csak tájékoztató jellegűek lehetnének). Mivel a G3G

főként a G4G3G szubsztrátból szabadult fel a reakció során, ezért koncentrációja a G4G3G koncentrációjától és aktuális lebontási sebességétől függött, így ezen a szubsztráton a kinetikai paraméterek meghatározása értelmetlennek tűnt.

Az MS rögzített enzim esetében a reakció során megfigyelhető anyagmérleg és az egyes szubsztrátok és termékek mennyiségének a tendenciái lényegében megegyeztek a natív enzim vizsgálataiban bemutatottakkal. Az MS rögzített enzimkészítmény paramétereinek százalékos értékei (a natív enzimhez viszonyítva) közel azonosak voltak mint, azokban a rendszerekben, ahol a tiszta szubsztrátok voltak jelen, így az előbbieken (5.5.4.3) tett megállapítások és kijelentések az MS rögzített enzim esetében is helytállóak. Ez alapján kijelenthető, hogy a rögzítési eljárás az enzim katalitikus aktivitásában okozott nagyobb mértékű csökkenést (a fent bemutatottak okán), azonban a  $K_m$  értékeiben és ezekben a rendszerekben megfigyelhető alapvető viselkedésében és tulajdonságaiban nem. Mivel a reakciókat technikai okokból úgy terveztem meg, hogy maximálisan 13 óráig legyenek, ezért az elvégzett vizsgálatok alapján a natív és az MS rögzített enzimkészítmények reakció során mutatott stabilitásával kapcsolatban érdemi megfigyeléseket nem lehetett elvégezni. Ezért a jelen vizsgálatok alapján az MS rögzített enzim alkalmazásának előnye az ilyen jellegű élelmiszeripari folyamatokban az újrafelhasználhatóságában és gazdaságosságában nyilvánul meg.

Az elvégzett kísérletek jó alapot szolgáltatnak további vizsgálatok megtervezésére és elvégzésére. További munka részét képezheti a kidolgozott HPAEC-PAD mérési módszer továbbfejlesztés, hatékonyabbá tétele, valamint a mérési rendszer által alkalmazott NaOH a vizsgált szénhidrátokra gyakorolt hatásának vizsgálatai. Szükséges lehet olyan módszer kidolgozása is, amellyel labor körülmények között lennének előállíthatók a vizsgált szénhidrátok (nagy mennyiségben), ezáltal lehetőség nyílna a kinetikai paraméterek általánosan alkalmazott módszerekkel történő meghatározására is. Érdekes lenne olyan több napos/hetes kísérletsorozatok elvégzése is, amellyel a natív és az MS rögzített enzimkészítmények stabilitása válna megfigyelhetővé a bemutatott rendszerekben.

## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

**1. A kinetikus-leoldódási vizsgálat kidolgozása.** Az általam alkalmazott kétlépéses, kombinált rögzítési technika vizsgálatához egy speciális módszert dolgoztam ki. Az irodalomban már ismertetett működési stabilitás vizsgálat tapasztalatainak a felhasználásával kidolgoztam a számomra megfelelő ún. kinetikus-leoldódási vizsgálatot [RADVA et al., 2011], amellyel egyszerre határozható meg az immobilizált enzimmészítmény aktivitása és a „rögzült enzimaktivitás leoldódása” alapján annak stabilitása. Ez a módszer különösen jól alkalmazható volt az általam használt rögzítési eljárás vizsgálatára, mivel a két eltérő kémiai kötés kialakításához szükséges paraméterek, elkülönítve voltak vizsgálhatók. A módszer tehát lehetővé tette, hogy nyomon kövessem az immobilizálási eljárás egyes lépéseinek és a környezet paramétereinek hatását a rögzített enzimmészítmény aktivitására és stabilitására.

**2. Új, rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimmészítmény előállítása és általános jellemzése.** Elsőként állítottam elő egy olyan új, rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimmészítményt, amelyhez a használt hordozó olcsó és könnyen beszerezhető, az alkalmazott rögzítési technika pedig egyszerű. Ez egy olyan kombinált rögzítési technika, ahol első lépésként az enzimet adszorbeáltattam a hordozó (*Amberlite IRA 900 Cl*) pórusszerkezetéhez, majd a második lépésben glutáraldehides kezelést alkalmaztam, ami egy stabilabb fehérje-struktúra kialakulását eredményezte, a hordozón levő fehérjemolekulák összekapcsolása révén. A rögzítési eljárás kedvező paramétereit az általam kidolgozott kinetikus-leoldódási vizsgálat segítségével határoztam meg. Az így előállított új készítmény általános jellemzését is elvégeztem, amelynek során meghatároztam a kinetikai paramétereit és a katalitikus aktivitásának pH és hőmérséklet függését is [RADVA & KOSÁRY, 2011].

**3. Az új, rögzített enzimmészítmény élelmiszeripari folyamatokban való tesztelése.** Az előállított új készítményt négy különböző élelmiszeripari folyamatban teszteltem, amelyek közül az egyiken részletes vizsgálatokat végeztem. A borászati, a cellobióz bontási és reverz hidrolitikus felhasználás körülményei között azt állapítottam meg, hogy a rögzített enzimmészítmény nagyobb mértékben volt képes megőrizni aktivitását, tehát stabilabbnak volt tekinthető, mint a natív enzim. A megőrzött magasabb aktivitásból és a megváltozott pH optimumból adódóan a rögzített enzimmészítmény nagyobb hatékonysággal volt alkalmazható az említett folyamatokban, mint a natív enzim.



**4. Új folyadékkromatográfiás (HPAEC-PAD) mérési módszer kidolgozása az árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidok mérésére.** A  $\beta$ -glükozidáz enzimkészítmények árpa  $\beta$ -glükán lebontásában való vizsgálataihoz kidolgoztam egy olyan, az irodalomban még nem ismertett mérési módszert, amellyel az árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidok minőségileg és mennyiségileg is pontosan meghatározhatók voltak, ezáltal lehetőség nyílt egy enzimreakció pontos nyomon követésére is. Az irodalmi gyakorlattól eltérően a mérések során használtam belső standardot (erre a célra a melibióz diszacharid tűnt a legalkalmasabbnak), amivel korrigálni tudtam a detektor válaszjeleinek a mérések során fellépő eltéréseit, valamint a mennyiségi meghatározáshoz a kereskedelemben nem rég hozzáférhető árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid standardokat használtam a megfelelő polimerizáltsági fokú maltooligoszacharidok helyett [RADVA et al., 2012].

**5. A natív és a rögzített enzimkészítmények működésének vizsgálata és kinetikai paramétereinek meghatározása árpa  $\beta$ -glükán szubsztrátokon.** A kidolgozott új HPAEC-PAD mérési módszernek köszönhetően elsőként végeztem részletes vizsgálatokat a  $\beta$ -glükozidáz enzim (mind a natív mind pedig az általam előállított rögzített készítménnyel) működésén és kinetikai paramétereinek a meghatározásán glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztrátokon. Ennek során tanulmányoztam az enzimkészítmények működését a tiszta árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid, továbbá glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztráton is, valamint meghatároztam az enzimkészítmények kinetikai paramétereit ezekben a rendszerekben. Ennek során jutottam arra a következtetésre is, hogy ilyen típusú szubsztrátok esetén a kinetikai állandók meghatározására általánosan alkalmazott módszer, miszerint a paramétereket a felszabaduló végtermék alapján állapítják meg, hibához vezethet ezért mindenképpen szükséges a szubsztrát mennyisége alapján történő meghatározás [RADVA et al., 2012].

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám kezdetekor egy olyan, új élelmiszeripari felhasználásra alkalmasnak tűnő rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimkészítmény előállítását határoztam meg célként, amelynek előállítása gazdaságos, technológiai szempontból egyszerű, és az irodalomban még nem ismertetett. A kidolgozott és előállított rögzített enzimkészítményt négy különböző élelmiszeripari felhasználás során teszteltem (cellobióz hidrolitikus bontása, borászati körülmények között való felhasználás, *O*-glikozidok reverz hidrolitikus előállítása és az árpa  $\beta$ -glükán tartalmának lebontása). A kísérletsorozat első lépéseként, az irodalomban leírt  $\beta$ -glükózidáz enzimaktivitás mérésére szolgáló módszerek közül kiválasztottam a számomra legmegfelelőbbnek tűnő eljárást, amely a *p*-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozid mesterséges szubsztrátot alkalmazó módszer volt. A rögzítési eljárás során a  $\beta$ -glükózidáz enzimhez elsőként használtam hordozóként az *Amberlite IRA 900 Cl* típusú anioncserélő gyantát (olcsó és könnyen hozzáférhető), amihez az enzimet egy olyan kombinált technikával immobilizáltam, amely két lépésből állt. Első lépésként az enzimet adszorbeáltattam a hordozó pórusszerkezetéhez, majd a második lépésében glutáraldehydes kezelést alkalmaztam, ami egy stabilabb fehérje-struktúra kialakulását eredményezte, a hordozón levő fehérjemolekulák összekapcsolása révén. Az adszorpciós rögzítést és a glutáraldehydes térhálósítást befolyásolni képes paramétereket elméleti megfontolások alapján választottam meg, és ezeknek a kedvező értékeit a két rögzítési lépésre külön-külön határoztam meg. Ezen kísérletek elvégzéséhez egy olyan, eddig az irodalomban nem ismertetett vizsgálati módszert dolgoztam ki, amely lehetővé tette a rögzítési eljárás paramétereinek a rögzített enzim tulajdonságaira gyakorolt hatásának, és így ezen paraméterek kedvező értékeinek a meghatározását. Ezt a módszert kinetikus-leoldódási vizsgálatnak neveztem el.

A kombinált rögzítési eljárás vizsgálatának első lépéseként, az adszorpciós kötődés kialakulását befolyásoló paraméterek vizsgálatát végeztem el, amelynek során a pH, só koncentráció, hőmérséklet és a szubsztrát jelenlétének hatását vizsgáltam és határoztam meg ezek kedvező paramétereit. A kombinált rögzítési technika tanulmányozásának második lépéseként annak a glutáraldehydes kezelésnek a vizsgálatát végeztem el, amellyel az adszorpciósan rögzített enzimek kötődését stabilizáljuk a hordozóhoz. Ennek során a kezelési idő, kémhatás, glutáraldehyd koncentráció és a szubsztrát jelenlétének hatását tanulmányoztam és határoztam meg ezeknek a kedvező értékeit. Az így előállított rögzített enzimkészítmény jellemzése során megállapítottam, hogy a borokra is jellemző alacsony pH érték mellett nagymértékű enzim leoldódás tapasztalható, amely problémát a

glutáraldehydes kezelési idő megnövelésével sikerült megszüntetnem. Az így előállított rögzített készítményt, megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítménynek neveztem el.

Ezután elvégeztem a megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény általános jellemzését, amely során meghatároztam rá jellemző enzimkinetikai állandókat, a katalitikus aktivitásának pH és hőmérséklet függését. Igyekeztem minél több élelmiszeripari folyamatban tesztelni az előállított készítményt, amelyek során általánosan a rögzített enzim stabilitását és hatékonyságát vizsgáltam az adott felhasználási körülmények között a natív enzimhez képest. Ezen túlmenőleg, elméleti és gyakorlati megfontolások alapján kiválasztottam egy felhasználási területet, amelyen részletes vizsgálatokat végeztem. Mind a borászati, a cellobióz bontási és reverz hidrolitikus felhasználás körülményei között azt tapasztaltam, hogy a natív enzim számára kedvezőtlen környezeti paraméterek mellett (alacsony pH, etanol vagy szerves oldószer jelenléte), a megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény nagyobb mértékben volt képes megőrizni aktivitását, tehát stabilabbnak volt tekinthető. Ennek hátterében feltehetőleg a rögzítéshez használt hordozó előnyös tulajdonságai (porózus szerkezet és lúgos mikrokörnyezet), valamint az alkalmazott rögzítési eljárás fehérje szerkezetre gyakorolt stabilizáló hatásai állhattak. A megőrzött magasabb aktivitásból és a megváltozott pH optimumból adódóan a rögzített enzimkészítmény nagyobb hatékonysággal volt alkalmazható az említett folyamatokban, mint a natív enzim. Tudományos megfontolások alapján részletes vizsgálatokat az árpa  $\beta$ -glükán tartalmának lebontásán végeztem, amely kísérleteket Norvégiában a Nofima Mat élelmiszerkutató intézetben végeztem el. Ennek során kidolgoztam egy új folyadékkromatográfiás (HPAEC-PAD) mérési módszert az árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidok (amelyek szubsztrátként szolgáltak) meghatározására, továbbá elsőként vizsgáltam és határoztam meg a natív és az általam előállított rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimkészítmény kinetikai paramétereit ezeken a szubsztrátokon, valamint a glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztráton. Az eddig elvégzett vizsgálatok alapján annyi bizonyos, hogy a megnövelt stabilitású rögzített enzimkészítmény az újrafelhasználhatósága révén gazdaságosabban és hatékonyabban alkalmazható a natív enzimmél az árpa  $\beta$ -glükán lebontása során.

Doktori munkám során tehát egy olyan új, rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimkészítményt sikerült előállítanom, amely sikeresen volt alkalmazható különböző élelmiszeripari folyamatokban, így az általam nyert eredmények indokoltá teszik a készítmény további vizsgálatait és esetleges ipari adaptációját.

## SUMMARY

The aim of my work was to produce a completely new immobilized  $\beta$ -glucosidase preparation for food industrial use, and to work out a simple and cheap immobilization method. The synthesized immobilized enzyme was tested in four different food industrial utilizations (cellobiose degradation, flavour enrichment of wines, reverse hydrolytic production of *O*-glycosides and degradation of barley  $\beta$ -glucan). I used first the *Amberlite IRA 900 Cl* anion exchange resin for the immobilization of  $\beta$ -glucosidase. The immobilization technique was a two-step procedure: the enzyme was immobilized by adsorption followed by a cross-linking of the enzyme molecules on the surface of the carrier with glutaraldehyde that resulted in a more stable protein structure on the surface of the resin. The parameters that could mostly affect the adsorption process and the glutaraldehyde cross-linking were sorted out by theoretical considerations and their advantageous values were determined separately for the two different steps. For these experiments I worked out a new investigation method that permitted the examination of the effects of the parameters on the properties of the immobilized enzyme preparation so thus the determination of the propitious values of these parameters. This method was called kinetic desorption method.

At first the parameters of the adsorption process were examined. In the course of these tests I studied the effect of the pH, the concentration of salt, the temperature and the presence of substrate and determined their optimal values. Then the parameters of the cross-linking step were examined. Related to these tests the effect and the advantageous values of the time of treatment, the pH, the concentration of glutaraldehyde and the presence or absence of the substrate were determined. In the course of the characterization of the synthesized immobilized enzyme I found that such a low pH value that is in wines could results in a strong desorption of the enzymes from the surface of the carrier. I could solve this problem by increasing the time of glutaraldehyde treatment that caused more strong interactions of the enzymes to the carrier than it was earlier. This enzyme preparation was called immobilized enzyme with enlarged stability.

I also carried out the general characterization of the immobilized enzyme with enlarged stability that involved the determination of the kinetic parameters and the pH and the thermal dependence of its catalytic activity. I tried to test this preparation in the several number of food industrial processes and in these applications I generally examined the stability and the efficiency of this immobilized enzyme with enlarged stability compared to the native enzyme. Additionally one application field was chosen by practical and scientific considerations for more detailed examinations. I found that the immobilized enzyme with enlarged stability could retain its activity more efficiently than the native enzyme in the

case of cellobiose degradation, reverse hydrolytic synthesis of *O*-glycosides and wine industrial use, thus it could be considered as a more stable preparation than the native enzyme. I supposed that this positive feature of the immobilized preparation could be the result of the positive properties of the carrier (porous construction and the alkali microenvironment) and the stabilizing effect of the applied immobilization technique. The retained higher activity and the changed pH optimum resulted in that the immobilized preparation could be used with higher efficiency in the above mentioned applications than the native enzyme. Based on mostly scientific considerations I carried out more detailed examinations on the degradation of barley  $\beta$ -glucan. This work was accomplished in collaboration with Nofima Mat (Norway) where I spent altogether four months. During this period I worked out a new quantitative HPLC (HPAEC-PAD) measurement method for the barley  $\beta$ -glucan di- and oligosaccharides (that were the substrates for the enzymatic reactions). Additionally, I examined and determined first the kinetic characteristics of native and immobilized  $\beta$ -glucosidase on these barley  $\beta$ -glucan substrates and on the lichenase hydrolyzed barley  $\beta$ -glucan substrate. Because of the reusability of the immobilized enzyme it could be utilized more efficiently and economically than the native enzyme.

Within the confines of my PhD work I produced such a new immobilized  $\beta$ -glucosidase enzyme preparation that could be used successfully in different food industrial applications. Accordingly my results justify further examinations and the possible industrial adaptation of this preparation.

## MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK

- ADLERCREUTZ P. (1993): Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1163 (2) 144-148. p.
- Amberlite IRA 900 Cl Product Data sheet, Rohm and Haas – Ion Exchange Resins, [www.rohmhaas.com](http://www.rohmhaas.com)
- ANDERSSON M. & ADLERCREUTZ P. (2001): A kinetic study of almond- $\beta$ -glucosidase catalysed synthesis of hexyl-glycosides in low aqueous media Influence of glycosyl donor and water activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14 (4-6) 69-76. p.
- ANDREWS G. F. & FONTA J. P. (1989): A fluidized-bed continuous bioreactor for lactic acid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20-21 (1) 375-390. p.
- AUNSTRUP K. (1979): Production, isolation and economics of extracellular enzymes. 27-69. p. In: WINGARD L. B., KATCHALSKI-KATSIR E., GOLDSTEIN L. (eds.): *Applied biochemistry and bioengineering*. New York: Academic Press Vol2.
- AXEN R., MYRIN P. A., JANSON J. C. (1970): Chemical fixation of chymotrypsin to water-insoluble crosslinked dextran (Sephadex) and solubilisation of the enzyme derivatives by means of dextranase. *Biopolymers*, 9 (4) 401-413. p.
- BACIC A. & STONE B. A. (1981): Isolation and ultrastructure of aleurone cell walls from wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8 (5) 453–474. p.
- BALLANCE S., AARSTAD O. A., SIKORSKI P., SKJAK-BRAEK G., CHRISTENSEN G. (2005): Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and statistical analysis to study oligosaccharide distributions – a complementary method to investigate the structure and some properties of alginates. *Journal of Chromatography A*, 1093 (1-2) 59-68. p.
- BALLESTEROS A., BOROSS L., BUCHHOLZ K., CABRAL J. M. S., Kasche V. (Eds.: CABRAL J. M. S., BEST D., BOROSS L., TRAMPER, J.) (1994): *Applied Biocatalysis*. Switzerland: Harwood Acad. Publ., 237 p.
- BALOGH T. (2004): Néhány hidroláz, az  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükózidáz, valamint a pektin-metil-észteráz élelmiszeripari alkalmazhatóságának vizsgálata. Doktori (Ph.D.) Értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem
- BALOGH T., KOSÁRY J., BOROSS L. (2004): Novel reaction system for the synthesis of o-glucosides by enzymatic reverse hydrolysis. *Tetrahedron*, 60 (3) 679-682. p.
- BALOGH T. & KOSÁRY J. (2005): A preparative-scale synthesis of O-alkyl- $\beta$ -D-glucosides by enzymatic reverse hydrolysis. *Acta Alimentaria*, 34 (3) 247-251. p.
- BALOGH T., TÓTH Á., KOSÁRY J. (2005): S-layer, a new support for enzyme immobilization. *Acta Alimentaria*, 34 (2) 203-208. p.

- BEUTLER H. O., KIRK J., MICHAL G., RUMMEL M. (1974): Enzymes as aids in pharmaceutical analysis. *Chem. Labor. Betr.*, 27 314-318. p.
- BLOM H. (1983): Partial characterisation of thermostable antocyanin- $\beta$ -glycosidase from *Aspergillus niger*. *Food Chemistry*, 12 (3) 197-204. p.
- BOROSS L., SISAK CS., SZAJÁNI B. (2008): Szilárd fázisú biokatalizátorok. Budapest: Akadémiai Kiadó. 34-123. p.
- BORNSCHEUER U. T. & KAZLAUSKAS R. J. (1999): Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations. New York: John Wiley & Sons Inc. 112-125. p.
- BRENA B. M., OVSEJEVI M., LUNA K., BATISTA-VIERA B. (1993): Thiolation and reversible immobilization of sweet-potato beta-amylase on thiosulfonate agarose. *Journal of Molecular Catalysis*, 84 (3) 381-390. p.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 15 (2) 359-375. p.
- BROWN G. M., NIEDUSZYNSKI I. A., MORRIS H. G., ABRAM B. L., HUCKERBY T. N., BLOCK J. A. (1995): Skeletal keratin sulphate structural-analysis using keratanase-II digestion followed by high-performance anion-exchange chromatography. *Glycobiology*, 5 (3) 311-317. p.
- BUSTO M. D., ORTEGA N., PEREZ-MATEOS M. (1994): Studies on microbial  $\beta$ -D-glucosidase immobilized in alginate gel beads. *Process biochemistry*, 30 (5) 421-426. p.
- 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 (5) 581-587. p.
- CABRAL J. M. S., NOVAIS J. M., CARDOSO J. P. (1981): Immobilization of amyloglucosidase on alkylamine derivatives inorganic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 23 (9) 2083-2092. p.
- CALDINI C., BONOMI F., PFIFFERI P. G., LANZARINI G., GALANTE Y. M. (1994): Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzyme and Microbiol Technology*, 16 (4) 286-291. p.
- 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,  $\beta$ -glucosidase, and  $\beta$ -furanosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 13 (7) 547-553. p.
- CAO L. (2005): Immobilized enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, 9 (2) 217-226. p.

- CATALDI T. R. I., CAMPA C., DE BENEDETTO G. E. (2000): Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368 (8) 739-758. p.
- CHANG M. Y. & JUANG R. S. (2007): Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of  $\beta$ -glucosidase. *Biochemical Engineering Journal*, 35 (1) 93-98. p.
- CHIBATA I., TOSA T., YAMAMOTO K., TAKATA T. (1987): Production of L-malic acid by immobilized microbial-cells. *Methods in Enzymology*, 136, 455-463. p.
- COLAGRANDE O., SILVA A., FUMI D. (1994): Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnology Progress*, 10 (1) 2-18. p.
- CORDONNIER R., BAYONOVE C., BAUMES R. (1986): Données récentes sur les précurseurs d'arôme du raisin, perspectives de leur exploitation en vinification. *Revue Francaise Oenologie*, 102 (26) 29-41. p.
- CRUEGER W. & CRUEGER A. (1987): Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. München: R. Oldenburg Verlag. 175-203. p.
- CUI W. & WOOD P. J. (2000): Relationships between structural features, molecular weight and rheological properties of cereal b-D-glucans. 159–168. p. In: NISHINARI, K. (Ed.): *Hydrocolloids Physical Chemistry and Industrial Applications of Gels, Polysaccharides and Proteins*. Amsterdam: Elsevier Voll.
- CSANÁDI ZS. & SISAK CS. (2006): Immobilization of pectinex ultra sp-1 pectinase and its application to production of fructooligosaccharides. *Acta Alimentaria*, 35 (2) 205-212. p.
- CSANÁDI ZS. (2008): Prebiotikus hatású fruktooligoszacharidok enzimkatalitikus szintézise integrált rendszerben. Doktori (Ph.D.) Értekezés, Veszprém: Pannon Egyetem, 34-68. p.
- D'SOUZA S. F. & KUBAL B. S. (2002): A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51 (2) 151-159. p.
- DAY A. G. & WITHERS S. G. (1986): The purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Alcaligenas faecalis*. *Biochemistry and Cell Biology*, 64 (9) 914–922. p.
- DE BARI I., CUNA D., NANNA F., BRACCIO G. (2004): Ethanol production in immobilized-cell bioreactors from mixed sugar syrups and enzymatic hydrolysates of steam-exploded biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 114 (1-3) 539-557. p.
- DEY G., SINGH B., BANERJEE R. (2003): Immobilization of alpha-amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46 (2) 167-172. p.
- Dionex Technical Note 20. (1994): Dionex Corporation



- DIMITRIU E., SECUNDO F., PATARIN J., FECHETE L. (2003): Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22 (3-4) 119-133. p.
- DIXON M. & WEBB E. C. (1979): Enzymes. New York: Acad. Press, 229. p.
- ENGASSER J. M. & HORVÁTH Cs. (1976): Applied Biochemistry and Bioengineering. (eds.): WINGARD L. B. JR., KATCHALSKI-KATZIR E., GOLDSTEIN L. New York: Acad. Press. 127. p.
- ESAWY M. A. & COMBET-BLANC Y. (2006): Immobilization of *Bacillus licheniformis* 5A1 milk-clotting enzyme and characterization of its enzyme properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (3) 197-200. p.
- FIELD R. A., HAINES A. H., CHRYSTAL E. J. T., LUSZNAK M. C. (1991): Histidines, histamines and imidazoles as glycosidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 274 885-889. p.
- FREER S. N. (1993): Kinetic characterisation of  $\beta$ -glucosidase from a yeast, *Candida wickerhamii*, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (13) 9337-9342. p.
- FROST G., LEEDS A. A., DORE C. J., MADERIOS S., BRADING S., DORNHURST A. (1999): Glycaemic index as a determinant of serum, cholesterol concentration. *The Lancet*, 353 (9158) 1045–1048. p.
- FUJIKAWA S., YOKOTA T., KOGA K. (1988): Immobilization of  $\beta$ -glucosidase in calcium alginate gel using genipin as a new type of cross-linking reagent of natural origin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28 (4-5) 440-441. p.
- FUKAMIZO T., HAYASHI K., TAMOI M., FUJIMURA Y., KUROTAKI H., KULMINSKAYA A., KITAOKA M. (2008): Enzymatic hydrolysis of 1,3-1,4-beta-glucosyl oligosaccharides by 1,3-1,4-beta-glucanase from *Synechocystis* PCC6803: A comparison with assays using polymer and chromophoric oligosaccharide substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 478 (2) 187-194. p.
- GALLIFUOCO A., D'ERCOLE L., ALFANI F., CANTARELLA M., SPANGA G., PFIFFERI P. G. (1998): On the use of chitosan-immobilized  $\beta$ -glucosidase in wine making: kinetics and enzyme inhibition. *Process Biochemistry*, 33 (2) 163-168. p.
- GALLIFUOCO A., ALFANI F., CANTARELLA M., SPANGA G., PFIFFERI P. G. (1999): Immobilized  $\beta$ -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. *Process Biochemistry*, 35 (1-2) 179-185. p.
- GARGOURI M., SMAALI I., MAUGARD T., LEGOY M. D., MARZOUKI N. (2004): Fungus  $\beta$ -glycosidases: immobilization and use in alkyl- $\beta$ -glycoside synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29 (1-6) 89-94. p.
- GASZTONYI K. & LÁSZTITY R. (1992): Élelmiszer-kémia 1. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 788. p.

- GERMAN J. B., XU R., WALZEM R., KINSELLA J. E., KNUCKLES B., NAKAMURA M., YOKOYAMA W. H. (1996): Effect on dietary fats and barley fibre on total cholesterol and lipoprotein cholesterol distribution in plasmas of hamsters. *Nutrition Research*, 16 (7) 1239–1249. p.
- GODFREY T. & REICHELT J. (1983): Industrial enzymology: The application of enzymes in industry. London: Macmillan Ltd., 600. p.
- GODJEVARGOVA T., NENKOVA R., KONSULOVA V. (2006): Immobilization of glucose oxidase by acrylonitrile copolymer coated silica supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38 (2) 59-64. p.
- GOLDSTEIN L., LEVIN Y., KATCHALSKI-KATZIR E. (1964): A Water-insoluble Polyanionic Derivative of Trypsin. II. Effect of the Polyelectrolyte Carrier on the Kinetic Behavior of the Bound Trypsin. *Biochemistry*, 3 1913-1919. p.
- GOLDSTEIN L., PECHT M., BLUMBERG S., ATLAS D., LEVIN Y. (1970): Water-insoluble enzymes. Synthesis of a new carrier and its utilization for preparation of insoluble derivatives of papain, trypsin, and subtilopeptidase A. *Biochemistry*, 9 (11) 2322-2334. p.
- GOLDSTEIN L. & KATCHALSKI-KATZIR E. (1976): Immobilized Enzyme Principles. New York: Acad. Press. 96. p.
- GÓMEZ J. M., ROMERO M. D., FERNÁNDEZ T. M., GARCÍA S. (2009): Immobilization and enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase on mesoporous SBA-15 silica. *Journal of Porous Materials*, 17 (6) 657-662. p.
- GROVER A. K., MACMURCHIE D. D., CUSHLEY R. J. (1977): Studies on almond emulsin  $\beta$ -D-glucosidase I. Isolation and characterization of bifunctional isoenzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 482 (1) 98-108. p.
- GUEGUEN Y., CHEMARDIN P., JANBON G., ARNAUD A., GLAZY P. (1996): A very efficient  $\beta$ -glucosidase-catalyst for the hydrolysis of flavor precursors process of wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (8) 2336-2340. p.
- GUEGUEN Y., CHEMARDIN P., PIEN S., ARNAUD A., GLAZY P. (1997): Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Biotechnology*, 55 (3) 151-156. p.
- GUPTA M. N. (1992): Enzyme function in organic solvents. *European Journal of Biochemistry*, 203 (1-2) 25-32. p.
- 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. *Journal of Chromatography A*, 331 83-90. p.

- GÜNATA Y. Z., BAYONOVE C., TAPIRO C., CORDONNIER R. (1990): Hydrolysis of grape monoterpenyl  $\beta$ -D-glucosides by various  $\beta$ -D-glucosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (5) 1232-1236. p.
- HARDY M. R. & TOWNSEND R. R. (1988): Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (10) 3289-3293. p.
- HARTMEIER W. (1988): Immobilized Biocatalysts. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 33-39. p.
- HEICHAL-SEGAL O., RAPPORT S., BRAUN S. (1995): Immobilization in alginate-silicate sol-gel matrix protects  $\beta$ -glucosidase against thermal and chemical denaturation. *Biotechnology*, 13 798-800. p.
- HELFERICH B. & KLEINSCHMIDT T. (1965): Hoppe-Seyler's *Z. Physiological Chemistry*, 340 31. p.
- HERZOG V. & FAHIMI H. D. (1974): Effect of glutaraldehyde on catalase. Biochemical and cytochemical studies with beef liver catalase and rat liver peroxisomes. *The Journal of Cell Biology*, 60 303-311. p.
- HRMOVA M., HARVEY A. J., WANG J., SHIRLEY N. J., JONES G. P., STONE B. A., HOJ P. B., FINCHER G. B. (1996): Barley beta-D-glucan exohydrolases with beta-D-glucosidase activity - Purification, characterization, and determination of primary structure from a cDNA clone. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 5277-5286. p.
- HRMOVA M. & FINCHER G. B. (1998): Barley  $\beta$ -D-glucan exohydrolases. Substrate specificity and kinetic properties. *Carbohydrate Research*, 305 209- 221. p.
- HRMOVA M., MACGREGOR A., BIELY P., STEWART R. J., FINCHER G. B. (1998): Substrate binding and catalytic mechanism of barley  $\beta$ -D-glucosidase-(1,4)- $\beta$ -D-glucan exohydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (18) 11134-11143. p.
- HSIEH M. C. & GRAHAM T. L. (1997): Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*, 58 (7) 995-1005. p.
- HUGHES F. A. & LEW B. W. (1970): Physical and functional properties of some higher alkyl polyglucosides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 47 (5) 162-167. p.
- ILLANES A., WILSON L., CABALLERO E., FERNANDEZ-LAFUENTE R., GUISAN J. M. (2006): Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of beta-lactam antibiotics in organic medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133 (3) 189-202. p.

- IWASAKI K., NAKAJIMA M., SASAHARA H. (1993): Rapid continuous lactic-acid fermentation by immobilized lactic-acid bacteria for soy-sauce production. *Process Biochemistry*, 28 (1) 39-45. p.
- JAKUBKE H. D. (1991): Enzymochemische Peptidsynthese (Teil 1). *Kontakte* (Darmstadt) 3, 60-72. p.
- JANG K. H., SONG K. B., KIM J. S., KIM C. H., CHUNG B. H., RHEE S. K. (2000): Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 23 (1) 89-93. p.
- JENADET P., BESSISI R., SBAGHI M., MEUNTER P. (1994): Occurrence of resveratrol  $\beta$ -D-glucosidase in wine: Preliminary studies. *Vitis*, 33 183-184. p.
- JIANG G. & VASANTHAN T. (2000): MALDI-MS and HPLC quantification of oligosaccharides of lichenase-hydrolyzed water-soluble beta-glucan from ten barley varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8) 3305-3310. p.
- JIN C. W., SELVAM W., HUI H. T., CHOW B. H., TALUKDER M. M. R., WON J. C. (2006): Immobilization of *Candida rugosa* lipase by cross-linking with glutaraldehyde followed by entrapment in alginate beads. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24 352-357. p.
- JOHANSSON L., VIRKKI L., ANTTILA H., ESSELSTRÖM H., TUOMAINEN P., SONTAG-STROHM T. (2005): Hydrolysis of  $\beta$ -glucan. *Food Chemistry*, 97 (1) 71-79. p.
- KAPOOR M. & KUHAD R. C. (2007): Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142 (2) 125-138. p.
- KARAGULYAN H. K., GASPARYAN V. K., DECKER S. R. (2008): Immobilization of Fungal  $\beta$ -Glucosidase on Silica Gel and Kaolin Carriers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146 (3) 39-47. p.
- KAWAI R., IGARASHI K., KITAOKA M., ISHII T., SAMEJIMA M. (2004): Kinetics of substrate transglycosylation by glycoside hydrolase family 3 glucan (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucosidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Carbohydrate Research*, 339 (18) 2851-2857. p.
- KENG S. W. M. & STAMS A. J. M. (1994): An extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*; a comparison with other glycosidases. *Biocatalysis*, 11 (2) 79-88. p.
- KENNEDY J. F. & CARBAL J. M. (1983): Applied Biochemistry and Bioengineering. (eds.: CHIBATA I. & WINGARD L. B.) Vol.4. New York: Academic Press. 189. p.
- KENNEDY J. F. & WHITE C. A. (1985): Handbook of Enzyme Biotechnology. (Ed.: WIESMAN A.) Chichester: Ellis Horwood. 147. p.

- KLIBANOV A. M. (1979): Enzyme stabilization by immobilization. *Analytical Biochemistry*, 93 (1) 1-25. p.
- KLIBANOV A. M. (1983): Immobilized enzymes and cells as practical biocatalysts. *Science*, 219 722-727. p.
- KOBAYASHI S., ADACHI S., NAKANISHI K., MATSUNO R. (2000): Synthesis of alkyl glycosides through  $\beta$ -glucosidase-catalyzed condensation in an aqueous-organic biphasic system and estimation of the equilibrium constants for their formation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (1) 13-21. p.
- KOIZUMI K., KUBOTA Y., TANIMOTO T., OKADA Y. (1988): Determination of cyclic glucans by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 454 (1) 303-310. p.
- KOIZUMI K., KUBOTA Y., TANIMOTO T., OKADA Y. (1989): High-performance anion-exchange chromatography of homogeneous D-gluco-oligosaccharides and D-gluco-polysaccharides (polymerization degree-greater-than-or-equal-to-50) with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 464 365-373. p.
- KOSÁRY J., STEFANOVITS-BÁNYAI É., BOROSS L. (1998): Reverse hydrolytic process for *o*-alkylation of glucose catalysed by immobilized  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases. *Journal of Biotechnology*, 66 (1) 83-86. p.
- LANDBERG E., LUNDBLAD A., PAHLSSON P. (1998): Temperature effects in high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*, 814 (1-2) 97-104. p.
- LARNER J. (1960): Other glucosidases. 369-378. p. In: BOYER P. D., LARDY H., MYRBÄCK K. (eds.): *The Enzymes*. Vol. 4. New York: Academic Press.
- LAROUTE V. & WILLEMOT R. M. (1992): Glucoside synthesis by glucoamylase or  $\beta$ -glucosidase in organic solvents. *Biotechnology Letters*, 14 (3) 169-174. p.
- 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 (1) 41-45. p.
- LEE Y. C. (1990): High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Analytical Biochemistry*, 189 151-162. p.
- LEE Y. C. (1996): Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 720 (1-2) 137-149. p.
- LIN J. T., RIEDEL S., KINNE R. (1979): The use of octyl- $\beta$ -D-glucoside as detergent for hog kidney brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 557 (1) 179-187. p.

- LJUNGER G., ADLERCREUTZ P., MATTIASSON B. (1994): Enzymatic synthesis of octyl- $\beta$ -glucoside in octanol at controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 16 (9) 751-755. p.
- LÓPEZ-GALLEGO F., BETANCOR L., MATEO C., HIDALGO A., ALONSO-MORALES N., DELLAMORA-ORTIZ G., GUISÁN J. M., FERNÁNDEZ-LAUFENTE R. (2005): Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology* 119 (1) 70-75. p.
- MAEDA H., SUZUKI H., SAKIMAE A. (1973): Preparation of immobilized enzymes by  $\gamma$ -ray irradiation. *Biochimica et Biophysica Acta Enzymology*, 315 (1) 18-21. p.
- MALKKI Y. (2004): Trends in dietary fibre research and development. *Acta Alimentaria*, 33 (1) 39–62. p.
- MARSH D. (1973): Kinetics of glucoamylase immobilized on porous glass. PhD thesis, Iowa State University. 27. p.
- MARTINO A., DURANTE M., PIFFERI P. G., SPANGA G., BIANCHI G. (1995): Immobilisation of  $\beta$ -glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. *Process Biochemistry*, 31 (3) 281-285. p.
- MARTINO A., PIFFERI P. G., SPANGA G. (1996): Immobilisation of  $\beta$ -glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimatization of the immobilization process on chitosan. *Process Biochemistry*, 31 (3) 287-293. p.
- MARTINO A., SCHIRALDI C., DI LAZZARO A., FIUME I., SPANGA G., PIFFERI P. G., DE ROSA M. (2000): Improvement of the flavor of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 36 (1-2) 93-102. p.
- MATEO C., PALOMO J. M., FERNANDEZ-LORENTE G., GUISAN J. M., FERNANDEZ-LAFUENTE R. (2007): Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 45 (6) 1451-1463. p.
- MIGNEAULT I., DARTIGUENAVE C., BERTRAND M. J., WALDRON K. C. (2004): Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37 (5) 790-802. p.
- MIKES O. (1975): A survey of modern techniques and applications. In: Liquid column chromatography *Journal of Chromatography A*, Library Vol. 3, Amsterdam: Elsevier. 69-87. p.
- MITSUO N., TATEICHI H., SATOH T. (1984): Synthesis of alkyl glucosides by enzymatic transglucosylation. *Chemical and Pharmaceutic Bulletin*, 32 (3) 1183-1187. p.
- MONSAN P. & COMBES D. (1988): Enzyme stabilization by immobilization. *Methods in Enzymology*, 137 584-598. p.

- NAVRATIL M., GEMEINER P., STURDIK E., DOMENY Z., SMOGROVICOVA D., ANTALOVA Z. (2000): Fermented beverages produced by yeast cells entrapped in ionotropic hydrogels of polysaccharide nature. *Minerva Biotechnology*, 12 337-344. p.
- O'NEIL H., ANGLELY 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. *Biotechnology Letters*, 24 (10) 783-790. p.
- OKAMOTO K., NAKANO I. I., YATAKE T., KIM T., KITAKATA S. (2000): Purification and some properties of a  $\beta$ -glucosidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64 (2) 333-340. p.
- OLSEN O., BORRIS R., SIMON O., THOMSEN K. K. (1991): Hybrid bacillus (1-3, 1-4)-beta-glucanases engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Molecular and General Genetics*, 225 (2) 177-185. p.
- PANINTRARUX C., ADACHI S., YOICHI A., KIMURA Y., MATSUNO R. (1995): Equilibrium yield of *n*-alkyl- $\beta$ -D-glucoside through condensation of glucose and *n*-alcohol by  $\beta$ -glucosidase in biphasic system. *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (1) 32-40. p.
- PAINTRARUX C., ADACHI S., MATSUNO R. (1996): *n*-Octyl  $\beta$ -D-glucoside synthesis through  $\beta$ -glucosidase catalyzed condensation of glucose and *n*-octanol in a heterogeneous system with high glucose concentration. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1 (3-6) 165-172. p.
- PARK D., HAAM S., JANG K., AHN U. I., KIM W. S. (2005): Immobilization of starch-converting on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40 (1) 53-61. p.
- PATIL V. B. & PATIL N. B. (2000): Biomass conversion: Synergistic use of immobilized alpha-amylase and amyloglucosidase for rapid and maximum conversion of starch into glucose. *Indian Journal of Chemical Technology*, 7 47-55. p.
- PEMBERTON M. S., BROWN R. D., EMERT G. H. (1980): The role of  $\beta$ -glucosidase in the bioconversion of cellulose to ethanol. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 58 (3) 723-729. p.
- PÉREZ-PONS J. A., REBORDOSA X., QUEROL E. (1995): Properties of a novel glucose-enhanced  $\beta$ -glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1251 (2) 145-153. p.
- PIFFERI P. G., TRAMONTINI M., MALACARNE A. (1989): Immobilization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus-niger* on various types of macromolecular supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 33 (10) 1258-1266. p.

- PITSON S. M., SEVIOUR R. J., MCDOUGALL M. (1997): Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in beta-glucan degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21 (3) 182-190. p.
- RADVA D. & KOSÁRY J. (2011): Production of new immobilized  $\beta$ -glucosidase preparation for food industrial purposes by using kinetic desorption method. *Acta Alimentaria*, 40 176-187. p.
- RADVA D., SPANYOL J., KOSÁRY J. (2011): Testing of the effect of parameters on the enzyme immobilization by adsorption and cross-linking processes with kinetic desorption method. *Food Technology and Biotechnology*, 49 (2) 257-262. p.
- RADVA D., KNUTSEN S. H., KOSÁRY J., BALLANCE S. (2012): Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection to compare the kinetic characteristics of  $\beta$ -glucosidase on oligosaccharides derived from lichenase digested barley  $\beta$ -glucan. *Carbohydrate Research*, 358 56-60. p.
- RANI A. S., DAS M. L. M., SATYANARAYANA S. (2000): Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 (5) 471-476. p.
- RAVET C., THOMAS D., LEGOY M. D. (1993): Gluco-oligosaccharide synthesis by free and immobilized  $\beta$ -D-glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 42 (3) 303-308. p.
- RENDELMAN J. A. (1973): In: *Advances in Chemistry*, Ser. No. 117. Washington DC: American Chemical Society. 51-68. p.
- 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  $\beta$ -glucosidases released from two yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (2) 123-129. p.
- ROCKLIN R. D. & POHL C. A. (1983): Determination of carbohydrates by anion-exchange chromatography by pulsed amperometric detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 6 (9) 1577-1590. p.
- ROCKLIN R. D., CLARKE A. P., WEITZHANDLER M. (1998): Improved long-term reproducibility for pulsed amperometric detection of carbohydrate via a new quadruple-potential waveform. *Analytical Chemistry*, 70 (8) 1496-1501. p.
- SHOSEYOV O., BRAVDO B. A., SIEGEL D., GOLDMAN A., COHEN S., SHOSEYOV L., IKAN R. (1990): Immobilized endo- $\beta$ -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (6) 1387-1390. p.



- SIMON L. M., KOTORMÁN M., SZAJÁNI B., BOROSS B. (1986): Preparation and characterization of immobilized glucophosphatase isomerase. *Enzyme and Microbial Technology*, 8 (4) 222-226. p.
- SIMON L. M., KOTORMÁN M., SZAJÁNI B. (1992): Coenzyme production using immobilized enzymes. 1. preparation, characterization, and laboratory-scale application of an immobilized NAD<sup>+</sup> kinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 14 (12) 997-1000. p.
- SKENDI A., BILIADERIS C. G., LAZARIDOU A., IZYDORCZYK M. S. (2003): Structure and rheological properties of water soluble  $\beta$ -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *Journal of Cereal Science*, 38 (1) 15–31. p.
- SLEYTR U. B., SÁRA M., KÜPCÜ Z., MESSNER P. (1986): Structural and chemical characterization of S-layers of selected strains of *Bacillus steraothermophilus* and *Desulfotomaculum nigrificans*. *Archives of Microbiology*, 146 (1) 19-24. p.
- SMITH N. K., GILMOUR S. G., RASTALL R. A. (1997): Statistical optimization of enzymatic synthesis of derivatives of trehalose and sucrose. *Enzyme and Microbial Technology*, 21 (5) 349-354. p.
- SPAGNA G., BARBAGALLO R. N., PIFFERI P. G., GRECO E., MANENTI I. (2002): A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilized by inclusion in chitosan gels. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (1) 80-89. p.
- STERNBERG D., VIAYAKUMAR P., REESE E. T. (1977):  $\beta$ -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, 23 (2) 139-147. p.
- STONE B. A. & CLARKE A. E. (1992): Chemistry and Biology of 1,3-L- Glucans. Bundoora, Australia: La Trobe University Press. 119. p.
- SZABOLCSI G. (1991): Enzymes analízis. Budapest: Akadémiai Kiadó. 48-52. p.
- SZAJÁNI B., KISS A., BOROSS L. (1980a): Investigation of the active center and catalytic mechanism of porcine kidney aminoacylase: a model of the active center. *Acta Biochimica and Biophysica*, 15 29-37. p.
- TABERNERO C., COLL P. M., FERNANDEZ-ABALOS J. M., PÉREZ P., SANTAMARÍA R. I. (1994): Cloning and DNA-sequencing of BGAA, a gene encoding an endo-beta-glucanase, from an alkalophilic bacillus strain (N137). *Applied Environmental Microbiology*, 60 (4) 1213-1220. p.
- TAHERZADEH M. J., MILLATI R., NIKLASSON C. (2001): Continuous cultivation of dilute-acid hydrolysates to ethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95 (1) 45-57. p.
- TIMMERMANS J. W., VAN LEEUWEN M. B., TOURNOIS H., DE WIT D., Vliegenthart J. F.G. (1994): Quantification analysis of the molecular weight distribution of inulin by means of anion exchange HPLC with pulsed amperometric detection. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 13 (6) 881-888. p.

- TOWNSEND R. R., HARDY M. R., HINDSGAUL O., LEE Y. C. (1988): High-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides using pellicular resins and pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, 174 (2) 459-470. p.
- TREPEL F. (2004): Dietary fibre: more than a matter of dietetica. I. Compounds, properties, physiological effects. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 116 (15-16) 465–476. p.
- TU M., ZHANG X., KURABI A., GILKES N., MABEE W., SADDLER J. (2006): Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters*, 28 (3) 151-156. p.
- 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. p.
- VAN RANTWIJK F., WOUDEBERG-VAN OOSTEROM M., SHELDON R. A. (1999): Glycosidase catalysed synthesis of alkyl-glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6 (6) 511-532. p.
- VAN RIEL J. & OLIEMAN C. (1991): Selectivity control in the anion-exchange chromatographic determination of saccharides in dairy products using pulsed amperometric detection. *Carbohydrate Research*, 215 (1) 39-46. p.
- VEIBEL S. (1950):  $\beta$ -Glucosidase. In: BOYER P. D., LARDY H., MYRBÄCK K. (eds.): *The Enzymes*. Vol. 1. New York: Academic Press. 583. p.
- VIC G. & CROUT D. H. G. (1994): Synthesis of glucosidic derivatives with a spacer arm by reverse hydrolysis using almond  $\beta$ -D-glucosidase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 5 (12) 2513-2516. p.
- VIC G. & CROUT D. H. G. (1995): Synthesis of allyl and benzyl  $\beta$ -D-glucopyranosides, and allyl  $\beta$ -D-galaktopiranosid from D-glucose or D-galactose and the corresponding alcohol using almond  $\beta$ -D-Glucosidase. *Carbohydrate Research*, 279 315-319. p.
- 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  $\beta$ -D-glucopiranoside. *Biotechnology and Bioengineering*, 46 (2) 109-116. p.
- VULFSON E. N., PATEL R., BEECHER J. E., ANDREWS A. T., LAW B. A. (1990): Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Biotechnology Letters*, 12 (6) 397-402. p.
- WATANABE T. & KUWAHARA M. (1993): Affinity chromatography of glucosidases on crosslinked methacrylamide copolymer bearing glycamine. *Makuzai Gakkaishi*, 39 (3) 368-373. p.
- 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. *Therapeutic Apheresis*, 5 (5) 433-438. p.

- 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. *Journal of Materials Chemistry*, 10 141-148. p.
- WIESMAN A. (1975): Handbook of enzyme Biotechnology. New York: Halsted Press. 207. p.
- 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 (9) 2039-2041. p.
- WOOD P. J., WEISZ J., MAHN W. (1991): Molecular characterisation of cereal  $\beta$ -glucans. II. Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight. *Cereal Chemistry*, 68 (5) 530-536. p.
- WOOD P. J., WEISZ J., BLACKWELL B. A. (1994): Structural studies of (1-3) (1-4)-b-D-glucans by  $^{13}\text{C}$ -NMR by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry*, 71 (3) 301-307. p.
- WOOD P. J. (2001): Cereal  $\beta$ -glucans: structure, properties and health claims. In: MCCLEARY B. V., PROSKY L. (eds.): *Advanced Dietary Fibre Technology*. London: Blackwell Science. 315-327. p.
- WOODWARD J. (1985): Immobilised Cells and Enzymes. Washington DC: IRL Press Ltd. 98. p.
- WOODWARD J. & CLARKE K. M. (1991): Hydrolysis of cellobiose by immobilized  $\beta$ -glucosidase entrapped in maintenance-free gel spheres. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29 (1) 277-283. p.
- WOODWARD J. & CAPPS K. M. (1992): Cellobiose hydrolysis by glutaraldehyde- treated  $\beta$ -glucosidase entrapped in propylene glycol alginate-bone spheres. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 34-35 (1) 341-347. p.
- WU J. C., LEE S. S., MAHMOOD M. M. B., CHOW Y., TALUKDER M. M. R., CHOI W. J. (2007): Enhanced activity and stability of immobilized lipase by treatment with polar solvents prior to lyophilisation. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 45 (3-4) 108-112. p.
- YOO D. H., LEE B. H., CHANG P. S., LEE H. G., YOO S. H. (2007): Improved quantitative analysis of oligosaccharides from lichenase-hydrolyzed water-soluble barley  $\beta$ -glucans by high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (5) 1656-1662. p.
- ZABORSKY O. R. (1974): Immobilized enzymes. Cleveland: CRC Press. 285. p.

## PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

### **Impakt faktoros folyóiratcikkek**

Radva, D., Knutsen, S.H., Kosáry, J., Ballance, S. (2012) : Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection to compare the kinetic characteristics of  $\beta$ -glucosidase on oligosaccharides derived from lichenase digested barley  $\beta$ -glucan. Carbohydrate Research 358, 56-60. IF<sub>2012</sub>: 2,044

Radva, D., Kosáry, J. (2011) : Production of new immobilized  $\beta$ -glucosidase preparation for food industrial purposes by using kinetic desorption method. Acta Alimentaria 40, 176-187. IF<sub>2011</sub>: 0,444

Radva, D., Spanyol, J., Kosáry, J. (2011) : Testing of the effect of parameters on the enzyme immobilization by adsorption and cross-linking processes with kinetic desorption method. Food Technol. and Biotechnol. 49, 257-262. IF<sub>2011</sub>: 1,195

Kosáry, J., Hitka, G., Kápolna, B., Radva, D. (2008): Studies of biochemical parameters characteristic for oxidative damage in different apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) during storage. Acta Alimentaria 37, 463-470. IF<sub>2008</sub>: 0,441

### **Nem impakt faktoros folyóiratcikkek**

Kápolna B., Radva D., Kosáry, J. (2006): A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 7. A tárolt rezisztens almafajták (*Malus domestica* Borkh.) minőségének vizsgálata biokémiai módszerekkel. Olaj, szappan, kozmetika 55, 99-105.

Kosáry J., Radva D. (2006): A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 6. A fekete ribizli (ribiszke) fajták (*Ribes nigrum* L.) lipoxigenázainak vizsgálata. Olaj, szappan, kozmetika 55, 12-15.

Kosáry J., Kétszeri D., Kereskényi É., Radva D. (2006): A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 5. Az olajtartalom oxidatív károsodását csökkentő tényezők a különböző céklafajtákban (*Beta vulgaris* L. SSP *Esculeta* var. *rubra*). Olaj, szappan, kozmetika 55, 65-67.

## **Konferencia kiadványok**

### **Magyarnyelvű (teljes)**

Radva D., Kosáry J. (konz.): A rezisztens almafajták tárolásának vizsgálata biokémiai módszerekkel. A MÉTE XVI. Országos Diákköri Konferenciája, Budapest, 2006. CD-ROM.

### **Magyarnyelvű összefoglaló**

Radva, D., Kosáry, J.: Élelmiszeripari felhasználásra alkalmas, új rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimmészítmény előállítása. Lippay–Ormos-Vas (LOV) Tudományos Ülésszak, Budapest, 2009. (előadás)

Radva, D., Spanyol, J., Kosáry, J.: Új, Amberlite IRA 900 gyantára rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimmészítmény élelmiszeripari alkalmazhatóságának vizsgálata. Lippay–Ormos-Vas (LOV) Tudományos Ülésszak, Budapest, 2009. (poszter)

Radva D., Kosáry J. (konz.): A rezisztens almafajták tárolásának vizsgálata biokémiai módszerekkel. A MÉTE XVI. Országos Diákköri Konferenciája, Budapest, 2006. (előadás)

Balogh T., Radva D., Kosáry J.: Alkalmas eljárás a tárolt gyümölcsök és zöldségek pektin-metil-észteráz (PME) aktivitásának sorozatmérésére. Lippay–Ormos-Vas (LOV) Tudományos Ülésszak, Budapest, 2005. (poszter)

### **Nemzetközi konferencia (összefoglaló)**

Radva, D., Knutsen, S.H., Kosáry, J., Balance, S.: Application of HPAEC-PAD for the examination of the action of native and immobilized  $\beta$ -glucosidase preparations on barley  $\beta$ -glucan substrate. Aegean Analytical Chemistry Days (AACD 2010), Lesbos Greece, 2010. (abstract)

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek **Dr. Kosáry Judit**nak tartozom, aki időt és energiát nem sajnálva tanított meg a kutatói szakmára és hasznos tanácsaival, észrevételeivel segítette munkámat hallgató koromtól kezdve a doktori munka befejezéséig.

Köszönet illeti **Dr. Fodor Péter** egyetemi tanárt, az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjét, aki lehetővé tette munkámat és hasznos tanácsaival hozzájárult a munka sikeres végrehajtásához.

Köszönettel tartozom a norvégiai **Nofima Mat** kutatóintézetnek, hogy a kint elvégzett méréseimhez a feltételeket biztosították, valamint kinti témavezetőimnek **Simon Ballancenak** és **Svein Halvor Knutsennak**, hogy teendőiken és erejükön felül segítették a munkámat. Itt szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Rezessyné Szabó Judit**nak, aki a norvégokkal kialakított jó kapcsolat alapköveit lerakta és segítette kinti munkámat.

Köszönet illeti diplomázó hallgatómat és barátomat, **Spanyol Jánost**, akivel a doktori munkám elején elvégzett közös munka inspirálólag hatott rám és ezzel adott nagy kezdeti lendületet a dolgozat elkészítéséhez.

Szeretném hálámat kifejezni az Alkalmazott Kémia Tanszék összes volt és jelenlegi munkatársának, hogy a munkabarátaim légkör kialakításával és tanácsaikkal nagyban hozzájárultak a dolgozatom elkészítéséhez.

Utoljára, de nem utolsó sorban mérheterlen köszönettel tartozom **családomnak** és a **barátaimnak**, akik mindig támogattak és mellettem álltak a nehéz pillanatokban is.