

***Thermomyces lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim  
előállítására és jellemzése**

Doktori értekezés

Rezessyné dr. Szabó Judit

Budapest  
2003

## A doktori iskola

**megnevezése:** Élelmiszertudományi  
**tudományága:** Élelmiszertudomány  
**vezetője:** **Dr. Fekete András**, DSc  
egyetemi tanár  
BKÁE, Élelmiszertudományi Kar, Fizika-Automatikai Tanszék

**Témavezető:** **Dr. Hoschke Ágoston**, CSc  
egyetemi tanár  
BKÁE, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszipari Tanszék

A doktor jelölt az Egyetem Doktori Szabályzatának minden pontjának eleget tett és a dolgozata nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

*„Egy ember nem akkor vall kudarcot, amikor legyőzik, hanem akkor, ha feladja”*

**Richard M. Nixon**

*Édesapám és Nagyszüleim emlékének*

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>5</b>
2.1	SZÉLSŐSÉGES ÉLŐHELYEKEN HONOS MIKROORGANIZMUSOK.....	5
2.1.1	Sav- és lúgkedvelő mikrobák.....	5
2.1.2	Halofil mikroorganizmusok.....	5
2.1.3	Pszichrofil mikroorganizmusok.....	6
2.1.4	Termofil mikroorganizmusok.....	6
2.2	TERMOFIL FONALASGOMBÁK.....	7
2.2.1	Tápanyagigény és a szaporodási hőmérsékletek.....	7
2.2.2	Anyagcsere.....	9
2.2.3	Tápanyagok hasznosítása.....	10
2.2.4	Hőtűrés.....	11
2.3	ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM.....	11
2.3.1	Előfordulás.....	11
2.3.2	Az enzimszintézis genetikai háttere.....	12
2.3.2.1	Prokarióta eredetű $\alpha$ -galaktozidáz enzimek.....	12
2.3.2.2	Eukarióta eredetű $\alpha$ -galaktozidáz enzimek.....	13
2.3.3	Az $\alpha$ -galaktozidáz enzim által katalizált reakció.....	15
2.3.4	Szubsztrátumok.....	15
2.3.5	Az $\alpha$ -galaktozidáz enzimek szerkezete.....	16
2.3.6	Hatásmechanizmus.....	23
2.3.7	Az enzim működését meghatározó környezeti tényezők.....	27
2.3.7.1	Hőmérséklet és pH.....	27
2.3.7.2	Aktivátorok, inhibitorok.....	29
2.3.8	Néhány lektin tulajdonságú $\alpha$ -galaktozidáz.....	30
2.4	MIKROBIÁLIS ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIMEK ELŐÁLLÍTÁSA.....	32
2.4.1	Baktérium eredetű enzimek.....	32
2.4.2	Élesztőgomba eredetű enzimek.....	34
2.4.3	Fonalgomba eredetű enzimek.....	34
2.4.4	Heterológ enzimek termelése rekombináns mikroorganizmusokkal.....	36
2.4.4.1	Növényi eredetű enzimek termeltetése.....	36
2.4.4.2	Baktérium eredetű enzimek termeltetése <i>E. coli</i> gazdában.....	37
2.5	AZ ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM BIOTECHNOLÓGIAI HASZNOSÍTHATÓSÁGA.....	37
2.5.1	Cukorgyártásnál a raffinóz tartalom csökkentése.....	38
2.5.2	Növényi eredetű $\alpha$ -galakto-oligoszacharidok hidrolízise.....	38
2.5.3	Transzgalakto-oligoszacharidok szintézise.....	39
<b>3</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>41</b>
3.1	A KÍSÉRLETEKBEN ALKALMAZOTT MIKROBIOLÓGIAI ELJÁRÁSOK.....	41
3.1.1	Az alkalmazott <i>Thermomyces lanuginosus</i> törzsek.....	41
3.1.2	Tápközegek összetételei.....	41
3.1.3	Tenyésztési módszerek.....	42
3.1.3.1	Törzsfenntartás.....	42
3.1.3.2	Inokulum tenyészetek készítése.....	42
3.1.3.3	Enzimfermentációs kísérletek kivitelezése.....	43
3.2	ALKALMAZOTT PUFFEREK ÉS REAGENSEK.....	43
3.3	ANALITIKAI MÓDSZEREK.....	44
3.3.1	$\alpha$ -Galaktozidáz aktivitás meghatározása.....	44
3.3.2	Fehérje meghatározási módszerek.....	44
3.3.2.1	Lowry módszer.....	44
3.3.2.2	Módosított Lowry módszer.....	44
3.3.2.3	Biuret módszer.....	44
3.3.2.4	280 nm-en történő fényelnyelésen alapuló módszer.....	45
3.3.3	Redukálócukor meghatározása.....	45
3.3.3.1	Somogyi-Nelson módszer.....	45
3.3.3.2	Réz-bicinkoninát módszer.....	45
3.3.4	Szénhidrátok mennyiségi és minőségi összetételének meghatározása.....	45
3.3.5	Galaktóz koncentráció meghatározása.....	46

3.4	FEHÉRJE TISZTÍTÁSI MÓDSZEREK.....	46
3.4.1	Fehérje kicsapás .....	46
3.4.2	Ultraszűrés.....	46
3.4.3	Kromatográfias módszerek .....	46
3.5	AZ ENZIM JELLEMZÉSÉNEL ALKALMAZOTT MÓDSZEREK.....	47
3.5.1	Elektroforetikus módszerek.....	47
3.5.2	Glikoprotein jelleg vizsgálata.....	49
3.5.3	Az enzim deglikozilálása.....	49
3.5.4	A hőmérséklet és a pH hatása az enzimstabilitásra .....	49
3.5.5	Ionok hatása az enzimaktivitásra.....	49
3.6	KINETIKAI PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA.....	49
3.7	KÍSÉRLETTERVEZÉS.....	50
<b>4</b>	<b>KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....</b>	<b>51</b>
4.1	ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM ELŐÁLLÍTÁSA FERMENTÁCIÓVAL.....	51
4.1.1	<i>Thermomyces lanuginosus</i> törzsek $\alpha$ -galaktozidáz aktivitása .....	51
4.1.2	Az enzimaktivitás mérés optimális körülményeinek meghatározása.....	53
4.1.2.1	pH optimum .....	53
4.1.2.2	Hőmérséklet optimum .....	54
4.1.3	Az enzimaktivitás alakulása $\alpha$ -galaktozidos kötéseket tartalmazó szubsztrátumokon.....	54
4.1.3.1	Extracelluláris $\alpha$ -galaktozidáz termelés raffinóz szubsztrátumon .....	54
4.1.3.2	$\alpha$ -Galaktozidáz enzimtermelés galaktomannán szubsztrátumokon.....	55
4.1.3.3	Enzimfermentációs kísérletek borsóliszten.....	56
4.1.3.4	Faktoriális kísérletek.....	59
4.1.3.5	Különböző nitrogénforrások alkalmazásának hatása az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásra.....	61
4.1.3.6	Korpakivonatok alkalmazása az $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállításánál.....	63
4.1.4	Különböző szerkezetű szénhidrátok hatása az $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésére.....	65
4.1.4.1	Az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulása több szénhidrát együttes jelenlétében .....	67
4.1.4.2	Az $\alpha$ -galaktozidáz szintézis vizsgálata melibióz szubsztrátum esetén.....	68
4.1.5	<i>T. lanuginosus</i> törzsek $\alpha$ -galaktozidáz termelése raffinóz és szacharóz szénforrásokon.....	69
4.1.6	A tápközeg iontartalma és az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás közti összefüggés.....	71
4.1.7	A szacharóz és az ammónium-acetát koncentráció optimalizálása.....	71
4.1.8	Az enzimaktivitás növelése a fermentáció környezeti paramétereinek változtatásával.....	75
4.1.8.1	A tápközeg elkészítésének módja és az $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelése közti összefüggés.....	75
4.1.8.2	A pH szabályozás hatása az $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelésére.....	76
4.1.9	Az inokulum tenyészet korának hatása az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulására.....	77
4.2	AZ ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM KINYERÉSE ÉS TISZTÍTÁSA .....	78
4.3	THERMOMYCES LANUGINOSUS EREDETŰ ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM JELLEMZÉSE .....	81
4.3.1	Molekulatömeg és izoelektromos pont.....	81
4.3.2	A szénhidrátartalom .....	81
4.3.3	A készítmény pH optimuma .....	82
4.3.4	A hőmérséklet optimum .....	83
4.3.5	Enzimstabilitási vizsgálatok eredményei.....	84
4.3.6	Fémionok hatása az enzim aktivitására .....	88
4.3.7	Enzimkinetikai vizsgálatok eredményei.....	90
4.4	THERMOMYCES LANUGINOSUS CBS 395.62b GOMBATÖRZS ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIMEI.....	91
4.5	ENZIMALKALMAZÁSI KÍSÉRLETEK.....	93
4.5.1	Galakto-oligoszacharidok hidrolízise .....	93
4.5.2	Galaktomannánok hidrolízise .....	97
<b>5</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>FELHASZNÁLT IRODALOM.....</b>	<b>106</b>

# 1 BEVEZETÉS

Az enzimek kiemelkedő szerepet töltenek be a biotechnológiai eljárásokban. A leggyakrabban alkalmazott enzimek a hidrolázok csoportjába tartoznak. Több évtizede alkalmazzák az amilolitikus, a proteolitikus, a pektolitikus, a laktáz, az invertáz és a lipáz enzimeket ipari méretben. Az enzim katalízis nemcsak helyspecifikus, hanem sztereoselektív is, így enzimes biokonverzióval az aszimmetrikus szintézisek és a racém vegyületek elválasztása is megvalósítható. Ennek köszönhetően számos többlépéses kémiai reakció is kiváltható enzimes technológiákkal, mivel e reakciók kíméletes körülmények között mennek végbe és gyakorlatilag veszélytelenek a környezetre.

Az enzimes technológiák bevezetése és megvalósítása különösen dinamikus fejlődést mutat az élelmiszeriparban, az élelmiszer-feldolgozás és az -adalékok gyártása során. Az  $\alpha$ -galaktozidáz (EC 3.2.1.22) enzim széleskörűen hasznosítható az élelmiszergyártásban. Alkalmazásával az élelmiszerek funkcionális tulajdonságai javíthatók. Az enzim hidrolizálja a flatulenciát kiváltó raffinóz családfhoz tartozó galakto-oligoszacharidok lebontását. Felhasználásával a hüvelyesekben lévő antinutritív oligoszacharidok eliminálhatók, így funkcionálissá tehetők és tápértékük is növelhető. A szentjánoskenyér eredetű galaktomannán jó gélképző tulajdonságú élelmiszeradalék, de csak korlátozott mennyiségben hozzáférhető. Ez a termék sikeresen helyettesíthető guar eredetű módosított galaktomannánnal, amely az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim segítségével szintén előállítható. A kedvező mannóz:galaktóz arány létrehozását követően a biokonverzióval előállított termék gélképző képessége fokozható és technofunkcionális tulajdonsága javítható.

Számos olyan  $\alpha$ -galaktozidáz enzim ismert, amely transzferáz aktivitással is rendelkezik, így hasznosítható különböző szerkezetű prebiotikus transzgalakto-oligoszacharidok szintézisére. Beszámoltak olyan speciális  $\alpha$ -galaktozidáz enzimekről is, amelyek ciklodextrinre is képesek átvinni a galaktóz molekulákat, mind oldalláncként, mind a gyűrűbe beépítve. Ezek a heteropolimerek sikeresen alkalmazhatók bioaktív anyagok mikrokapszulázására.

Az ipari enzimek legnagyobb része ma már fermentációval előállított mikroba eredetű termék. A fonalgombák természetes élőhelyei az elhalt növényi részek, amelyek igen változatos összetétellel rendelkező polimereket tartalmaznak. Életben maradásukhoz elengedhetetlenül szükségük van igen sokfajta enzim/enzimrendszer szintézisére és kiválasztására, hogy a szaporodásukhoz szükséges tápanyagokhoz jussanak. A gombák e tulajdonságai igen vonzóak, hogy enzim előállítási technológiában termelő szervezetekként hasznosítsák azokat. A termofil gombák által szintetizált enzimek általában hőstabilisabbak, mint a mezofil eredetű megfelelőik. Biotechnológiai hasznosításuk így számos technológiai előnnyel kecsegtet, pl. rövidebb technológiai idő, jobb kapacitás kihasználás és hosszabb élettud, ugyanakkor nem olyan problematikus az inaktíválásuk, mint az extrém termofil baktériumokból származó enzimeké.

A termofil gombák közül a *Thermomyces lanuginosus* rendelkezik a legnagyobb szaporodási hőmérséklet tartománnyal. A gomba nem patogén, nem termel toxinokat, jó szaporodó képességű és gazdag forrása számos extracelluláris enzimnek. Ilyenek a hemicellulázok, az amilolitikus, a pektolitikus, a lipáz, és a fitáz enzimek. Számos kutató foglalkozik *T. lanuginosus* eredetű amilolitikus enzimek előállításával, tisztításával, jellemzésével és szerkezetük vizsgálatával. A hemicellulázok közül a legtöbb ismeret a xilanáz

enzimről áll rendelkezésre. Az enzim teljes szekvenciáját és kristály szerkezetét is meghatározták. Ezen xilanáz kutatásokat az is inspirálta, hogy a *T. lanuginosus* nem cellulolitikus mikroorganizmus, ezért cellulázmentes termotabilis xilanáz enzimet termel. Mindezen tulajdonságai alapján számot tarthat papír- és sütőipari hasznosításra.

A hemicellulózok lebontásában szerepet játszó *T. lanuginosus* eredetű glikozilhidrolázokra, köztük az  $\alpha$ -galaktozidázra vonatkozó irodalmi adatok igen szűkösek. A szakirodalomban csupán egyetlen közlemény tesz említést *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimről, de e közleménynek sem témája az enzim mennyiségi előállítása. A fenti hiány pótlására kívántam foglalkozni a *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállítási lehetőségeivel, jellemzésével és felhasználhatóságával.

## Célkitűzések

- Enzim előállítási technológia kidolgozása egy meghatározott törzsre vonatkozóan
  - Optimális tápközeg összetétel kidolgozása
  - Inokulum készítés standardizálása
  - Fermentációs technológia kidolgozása
- Eljárás kidolgozása az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim kinyerésére és tisztítására
- Az enzimfehérje jellemzése
  - Molekulatömeg, izoelektromos pont, szénhidrátartalom
  - Optimális működési feltételek meghatározása
- Az enzim katalitikus tulajdonságainak meghatározása

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 SZÉLSŐSÉGES ÉLŐHELYEKEN HONOS MIKROORGANIZMUSOK

Az emberi szervezet számára extrém körülmények számos mikroba számára optimális szaporodási feltételeket jelentenek. Az ebben rejlő lehetőségeket próbálják hasznosítani a biotechnológusok az újonnan létrehozandó technológiák során, mivel e mikroorganizmusok olyan egyedülálló tulajdonságokkal és speciális enzimmérettel rendelkezhetnek, amelyek kiaknázása technológiai és gazdasági előnyökhöz vezethet.

Számos baktérium, cianobaktérium, alga és gombafajt izoláltak ilyen élőhelyekről. Ezek a mikroorganizmusok nemcsak az új biotechnológiai eljárásokban alkalmazhatók, de modellként szolgálnak a szélsőséges környezeti feltételek között működő életfolyamatok tanulmányozásánál is. A biotechnológiai eljárásokban előnyös, illetve szükséges lehet extrém hőmérséklet, nyomás, ionerősség és pH, valamint szerves oldószerek alkalmazása, ezért egyre növekvő igény mutatkozik extrémofil mikrobák tenyésztésének kidolgozására, valamint az általuk szintetizált enzimek izolálására, jellemzésére (Aguilar, 1996; Krahe et al., 1996; Schiraldi & DeRosa, 2002).

#### 2.1.1 Sav- és lúgkedvelő mikrobák

A nagy hidrogénion koncentráció éppúgy, mint az igen kicsi a legtöbb mikroorganizmus számára toxikus, ennek ellenére számos algát, gombát, protozoát és baktériumot izoláltak savas talajokból, szulfidban gazdag bányavizekből, geotermikus forrásokból, gyümölcslevekből, savval tartósított élelmiszerekből. A legextrémebb savtűrők azok a baktériumok, amelyek általában saját maguk hozzák létre a savas környezetet úgy, hogy aerob körülmények között a kénvegyületeket kénsavvá oxidálják. Ezt a képességüket már iparilag is kiaknázzák a különböző fémek bányászatánál (Bridge & Johnson, 1998).

Az alkalofil (lúgkedvelő) mikroorganizmusok által termelt bakteriális eredetű alkalikus proteázok a világ enzintermelésének mintegy 25%-át teszik ki. Szintén jelentős piaca van az élelmiszer- és a gyógyszeriparban használt ciklodextrineknek, amelyeket az alkalofil *Bacillus macerans* eredetű glükanoztransferáz enzim segítségével állítanak elő.

#### 2.1.2 Halofil mikroorganizmusok

A legszélsőségesebb környezetnek számítanak az olyan nagy sótartalmú helyek, mint a Holt-tenger, a Kenyai Rift-völgy szódás és sós tavai. Sótoleranciájának köszönhetően a *Dunaliella* alga minimális befertőződési veszéllyel szaporítható nyitott tavakban. Kémiai összetétele és tápértéke hasonló a szójaliszthez, így takarmányként hasznosítható, valamint a benne lévő  $\beta$ -karotin is felhasználható az élelmiszeriparban. Biomasszájában 30 tömeg százalékban glicerin halmozódik fel, amely alkalmazást nyerhet az élelmiszer-, a kémiai-, a petrolkémiai- és a gyógyszeriparban.



Ígéretesek a Gram<sup>+</sup> és Gram<sup>-</sup> tengeri baktériumok bioaktív komponensei is. Ezek olyan gyógyhatású anyagok lehetnek, mint pl. az antibiotikumok, a vírusellenes vegyületek vagy az antitumor készítmények.

Új termékeket eredményezhetnek az extrém halofilok által termelt bioemulziót képző ágensek és felületaktív anyagok, amelyeket az élelmiszeriparban és a gyógyszeriparban alkalmazhatnak. Ilyen például a *Halobacterium mediterranei* által termelt exopoliszacharid, amely kiváló reológiai tulajdonságokkal rendelkezik. A *Haloferax mediterranei* halofil ősbaktérium szintén termel egy biopolimert, ami hasznosítást nyerhet, mint nem kőolaj eredetű termopolimer. A biopolimer előnye, hogy biológiai úton könnyen lebontható, de előállítására jelenleg jóval drágább, mint a hagyományos műanyagoké (Herbert, 1992).

### 2.1.3 Pszichrofil mikroorganizmusok

A pszichrofil mikroorganizmusok szintén értékes enzimekként szolgálhatnak olyan biotechnológiai folyamatokban, amelyeket kis hőmérsékleti tartományban működtetnek. Természetesen ilyen esetekben a reakciósebesség kisebb, mint nagyobb hőmérsékleteken, de ezt a hátrányt kiegyenlíti az energiaigényben mutatkozó megtakarítás, mivel e folyamatok nem igényelnek drága fűtő/hűtő rendszert.

*Mucor miehei* által termelt enzimek, amelyek Rennilase® és Marzyme® márkaneveken kerülnek forgalomba, a borjú oltó kiváltására alkalmazhatók a sajtgyártásban. A pszichrofil szervezetek legígéretesebb alkalmazási területe a mikrobiális olajok előállítása. Az élesztők, fonalgombák és a mikroalgák számos fajta jelentős mennyiségben felhalmozza a lipideket. Ezek a lipidek kémiai szerkezetük tekintetében trigliceridek, melyek mennyisége elérheti a biomassza tömegének akár 80 %-át is. Egyes pszichrofil fajok ugyanis többszörösen telítetlen  $\omega$ -3 (pl. eikozapentaénsav) és  $\omega$ -6 típusú zsírsavakat termelnek (pl.  $\gamma$ -linolénsav és arachidonsav). Ezek az esszenciális zsírsavak az emberi szervezet számára kiinduló anyagai a rövid élettartamú messenger molekuláknak (az eikozanoid hormonok), ezért étrend kiegészítőként hasznosíthatók. A hidegtűrő mikrobák egy másik lehetséges alkalmazási területe a lúgos proteázok, amilázok és lipázok előállítása, amelyek felhasználhatók mosószerekben és tisztítószerekben. Ezek az enzimek lehetővé teszik az kis hőmérsékleten történő mosást, mely jelentős energia megtakarítást eredményez.

### 2.1.4 Termofil mikroorganizmusok

A termofil mikroorganizmusok csoportjának hasznosításában tapasztalhatjuk a legszembetűnőbb fejlődést. E terület kutatása már több mint 30 éves múltra tekint vissza. A legnagyobb érdeklődést a hipertermofil baktériumok keltették fel, amelyek optimális szaporodási hőmérséklete 100 °C körüli. Ezek a mikrobák nemcsak életképesek maradnak a víz forráspontjánál nagyobb hőmérsékleteken, de maximális szaporodóképességet is mutatnak (Woese & Fox, 1977). Enzimeik harmadlagos szerkezetében a csekély szerkezeti változások, mint például hidrofób kölcsönhatások, hidrogénkötések, kén-kén kötések felelősek a mikroorganizmusokból származó enzimek termotabilitásáért. A termotabilis enzimeket a mosószerekben, az édesítőszer előállításában és a gyógyszergyártásban alkalmazzák. A termotabilis enzimek igazi

lehetőségei nem a mezofil eredetű enzimek helyettesítésében rejlenek, hanem az új alkalmazási területek kifejlesztésében. Erre jó példa az extrém termofil mikrobákból izolált enzimek speciális alkalmazási lehetőségei, mint a *Thermoascus aquaticus* eredetű *Taq* polimeráz hasznosítása a polimeráz láncreakcióban (PCR). A *Pyrococcus furiosus* eredetű enzimről közölték, hogy szignifikánsan kisebb hibagyakorisággal működött, mint a *Taq* polimeráz (Cowan, 1992). A termostabilis enzimek sikeres alkalmazása a PCR technikában rávilágít az ősbaktériumok biotechnológiai hasznosításának lehetőségeire (Adams et al., 1995).

A hipertermofilekből származó enzimek jelentősek még az átészterezési reakciókban, az oligoszacharidok, a peptidok és a foszfolipidek szintézisében is. Ezek az enzimek meghatározó szerepet fognak játszani a jövő biotechnológiai folyamataiban, különösen azokban, ahol a biokatalizátorok hőstabilitása előnyös.

Az eukarióta mikroorganizmusok között csak néhány olyan gombafaj létezik, amely életképes 45-55 °C hőmérsékleti tartományban. Az eukarióták túlnyomó többsége elpusztul, ha hosszabb ideig van kitéve 40-45 °C közötti hőmérsékleteknek. Ezért keresik a kutatók annak magyarázatát, hogy minek köszönhető az, hogy az 50 ezer ismert gombafaj közül kb. 30 faj növekszik e felső hőmérsékleti határ felett. Ezek a gombafajok értékes kísérleti objektumul szolgálnak azon mechanizmusok feltárására, amelyek lehetővé teszik növekedésüket a nagyobb hőmérsékleti tartományban is (60-62 °C) (Tansey & Brock, 1972).

## 2.2 TERMOFIL FONALASGOMBÁK

A termofil fonalaszgombák számos nemzetséghez tartozó faj heterogén fiziológiai csoportját jelentik, amelyeknek nevezékτανát áttekintve számos zavaró tényezővel találkozhatunk. Ez főleg abból ered, hogy néhány fajt többször is leírtak, eltérő nevekkal, és amikor a korábbi nevek előkerültek, fő rendező elvként az időrendiség szolgált. Az elnevezések így időről időre változtak.

A fogalomzavar másik forrása, hogy ugyanannak a gombának ivaros és ivartalan állapotát összecserélik. A termofil gombák jelenlegi neveit és szinonimáit Maheshwari és munkatársai (2000) nyomán az 1. táblázat tartalmazza. A dolgozatomban következetesen azokat az elnevezéseket fogom alkalmazni, amelyek az eredeti közleményben szerepelnek.

### 2.2.1 Tápanyagigény és a szaporodási hőmérsékletek

A termofil gombák megfelelően szaporodnak minimál tápközegben, amennyiben pH=5,5–7,0 tartományban szabályozzák a pH-t. Ez megvalósítható a tápközeg foszfát koncentrációjának növelésével, lúgadolással, beleértve a szilárd kalcium-karbonátot, vagy a szervesetlen nitrogénforrást szerves nitrogénforrással (L-aszparagin) helyettesítve. A citromsav ciklusban található trikarbonsavak nem feltétlenül szükségesek a szaporodásukhoz, mint azt számos szerző (Wali et al., 1978; Gupta & Maheshwari, 1985)

1. táblázat A termofil gombák rendszertani besorolása és jellemző szaporodási hőmérsékleteik  
(Maheswari et al.,2000 nyomán)

Jelenlegi faji besorolása	A gomba Egyéb nevei	T <sub>opt</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)
<i>Canariomyces thermophila</i>		45	
<i>Chaetomium mesopotamicum</i>		45	52
<i>Chaetomium thermophile</i>	<i>C. thermophilum</i> , <i>C. thermophilum</i>	45-55	58-61
<i>Coonemeria aegyptiaca</i>	<i>Thermoascus aegyptiacus</i> <i>Paecilomyces aegyptiaca</i>	40	55
<i>Coonemeria crustacea</i>	<i>Thermoascus crustaceus</i> <i>Dactylomyces crustaceus</i> <i>Paecilomyces crustaceus</i>	40	<60
<i>Coonemaria verrucosa</i>	<i>Thermoascus crustaceus</i>	30-40	55
<i>Corynascus thermophilus</i>	<i>Thielavia thermophila</i> <i>Myceliophthora fergusii</i> <i>Chrysosporium fergusii</i>	50	60
<i>Dactylomyces thermophilus</i>	<i>Thermoascus thermophilus</i> <i>Thermoascus aurantiacus</i>	40-45	
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	<i>Trichothecium cinnamomeum</i> <i>Thermoidium sulfureum</i> <i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>	45	57
<i>Melanocarpus albomyces</i>	<i>Myriococcum albomyces</i> <i>Thielavia albomyces</i>	45	57
<i>Melanocarpus thermophilus</i>	<i>Thielavia minuta</i> var. <i>thermophila</i>	35	50
<i>Myceliophthora hinnulea</i>		40-45	>50
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Sporotrichum thermophilum/thermophile</i> <i>Chrysosporium thermophilum</i> <i>Myceliophthora indica</i> <i>Corynascus heterothallicus</i>	45-50	55
<i>Myriococcum thermophilum</i>		45	53
<i>Pheacilomyces varioti</i>		50	55
<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor miehei</i>	35-45	57
<i>Rhizomucor pusillus</i>	<i>Mucor pusillus</i>	35-45	55
<i>Scytalidium thermophilum</i>	<i>Torula thermophila</i> <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> <i>Humicola insolens</i>	40	58
<i>Stilbella thermophilum</i>		35-50	55
<i>Talaromyces byssochlamydioides</i>	<i>Paecilomyces byssochlamydioides</i>	40-45	>50
<i>Talaromyces emersonii</i>	<i>Geosmithia emersonii</i> <i>Talamyces duponti</i> , <i>Penicillium duponti</i>	40-45	50
<i>Talaromyces thermophilus</i>	<i>Penicillium duponti</i>	45-50	60
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	<i>Thermoascus aurantiacus</i> sensu	49-52	61
<i>Thermomyces ibadanensis</i>		42-47	61
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>	45-50	60
<i>Thermomyces stellatus</i>	<i>Humicola stellata</i>	40	50
<i>Thielavia australiensis</i>		35-40	50
<i>Thielavia pingtungia</i>		40	>50
<i>Thielavia terrestris</i>	<i>Allescheria terrestris</i> <i>Acremonium alabamense</i>	40-45	52

állítja. Ezen összetevők szerepe sokkal inkább a tápközegek pufferolásában van, mint a gombák tényleges tápanyagigényének kielégítésében.

A termofil gombák igen elterjedtek a trópusi és a mérsékelt égövi területeken. A termofil eukarióta mikroorganizmusok minimális szaporodási hőmérsékletét nagymértékben meghatározza az alkalmazott tápközeg összetétele. Komplet tápanyagokat tartalmazó tápközegekben ezek a gombák kisebb hőmérsékleteken is jól nőnek, míg minimál tápközegben 30 °C alatt képtelenek a szaporodásra. Ennek feltehetően az a magyarázata, hogy a komplex tápanyagok olyan összetevőket tartalmaznak, aminek a szintézisére a termofil gombák kis hőmérsékleteken képtelenek. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés (Wright et al., 1983) is, hogy szuboptimális hőmérsékleten (33 °C) a *Talaromyces thermophilus* gomba szaporodását nagymértékben elősegítette a tápközegbe adagolt ergoszterin (5 µg milliliterenként).

A minimális szaporodási hőmérsékletet jelentősen befolyásolja az alkalmazott inokulum fejlődési szakasza is. Kisebb minimális szaporodási hőmérséklet tapasztalható, ha a tenyésztést csírázó spórákkal vagy micéliummal indítjuk, mintha nyugvó spórákkal történik a beoltás. Például a *Mucor miehei* nem szaporodott 25 °C-on sülyesztett tenyészetben, ha spóraszuszpenziót alkalmaztak inokulumként, de ugyanezen a hőmérsékleten jelentős növekedést tapasztaltak, amikor előcsíráztatott spórákkal indították a tenyésztést (Streets & Ingle, 1972). *Thermoascus aurantiacus* esetében a legkisebb hőmérséklet, amelyen még az aszkospórák kihajtottak, 10-12 °C-kal magasabb érték volt a hifa növekedésének hőmérsékleténél (Deploey, 1995). A fenti kísérleti adatok alapján megállapítható, hogy a spóra kihajtásának körülményei meghatározóbbak, mint csupán a micélium növekedésének vizsgálata. A minimális szaporodási hőmérséklet meghatározásának módszertanát át kellene értékelni, ami azt jelenti, hogy meg kell adni az alkalmazott tápközeg pontos összetételét, az inokulum állapotát és az inokulálás módját is. A fenti kísérleti eredmények arra engednek következtetni, hogyha egyszer a spórák csírázásának indukálása már megfelelően magas hőmérsékleten megtörtént, akkor a további szaporodás szempontjából a magas hőmérséklet biztosítása már nem kritikus.

### 2.2.2 Anyagcsere

A termofil gombák metabolizmusának tanulmányozása során felvetődik az a kérdés, hogy a nagyobb szaporodási hőmérsékletek vajon gyorsabb anyagcserét eredményeznek-e. Maheshwari és munkatársai (2000) áttekintő közleményükben szemléletesen bizonyítják, hogy a mezofil- és a termofil gombák növekedési sebességtartománya az optimális szaporodási hőmérsékleteken vizsgálva lényegi eltérést nem mutat (2. táblázat).

A vizsgált termofil gombatörzsek szaporodási sebességei szuboptimális hőmérsékleten történő tenyésztés esetén jelentős mértékben csökkent, ugyanakkor a biomassza hozamokban szignifikáns eltérést nem tapasztaltak (Rajasekaran & Maheshwari, 1990).

2. táblázat

Néhány mezofil- és termofil gomba szaporodási jellemzői (Maheshwari et al., 2000)

Gomba	Típus	Szaporítási hőmérséklet [°C]	Fajlagos szaporodási sebesség [h <sup>-1</sup> ]	Hozamtényező* [g/g]
<i>Neurospora crassa</i>	mezofil	30	0,37	n.a.
<i>Trichoderma reesei</i>	mezofil	30	0,20	0,40
<i>Aspergillus niger</i>	mezofil	30	0,24	0,71
<i>Trichoderma viride</i>	mezofil	30	0,16	0,33
<i>Sporotrichum thermophile</i>	termofil	50	0,23	0,41
		30	0,11	0,36
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	termofil	50	0,23	0,56
		30	0,06	0,48

\*Glükózára vonatkoztatva

n.a.

nincs adat

A termofil gombák (*Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium duponti*) homogén micélium szuszpenzióinak oxigén felvételi sebessége egyenes arányosságot mutatott az alkalmazott hőmérsékletekkel a minimális (30 °C) és az optimális szaporodási hőmérsékletek közötti tartományban. Ezzel ellentétben a vizsgált mezofil mikroorganizmusok (*Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicis* és *Trichoderma viride*) oxigén felvételi sebességei 15-40 °C közötti hőmérsékleti tartományban nem mutattak jelentős változást (Prasad et al., 1979). Amíg a mezofil *Agaricus bisporus* gombában mind a citokróm, mind az alternatív légzési bioszintézis utak, addig a *Scytalidium thermophilum* termofilgombában csupán a citokróm által közvetített légzési utak működnek (Derikx et al., 1990). Mindezek mellett kimutatták azt is, hogy a nagy koncentrációban jelenlévő szén-monoxid és a hidrogén-cianid erőteljesen gátolta az *S. thermophilum* növekedését, de az *A. bisporus* növekedését nem.

### 2.2.3 Tápanyagok hasznosítása

A komposztálás során a termofil gombák akkor indulnak fejlődésnek, amikor a mezofil mikroorganizmusok szaporodása lelassul, illetve leáll a kialakuló nagy hőmérséklet miatt. Ekkorra már a kezdetben jelenlévő könnyen hozzáférhető, oldott szénforrások, mint például a cukrok, aminosavak és szerves savak a mezofil organizmusok tevékenységének eredményeként kimerültek. A termofil gombák szaporodásához már nagyrészt csak a biomasza poliszacharid komponensei állnak rendelkezésre. Ezek között a cellulóz van a legnagyobb mennyiségben jelen. Jó néhány komposztban megtalálható termofil gomba, mint például a *Thermomyces lanuginosus*, nem képes a cellulóz hasznosítására (Puchart et al., 1999). A cellulolitikus aktivitással nem rendelkező mikroorganizmusok, a cellulózbontó aktivitással rendelkező partnerek a hemicellulóz és a cellulóz hidrolíziséből származó termékeken szaporodnak. A celluláz aktivitással nem rendelkező fajok könnyen hasznosítják a sejtfalalkotó xilánt. A termostabilis poliszacharid bontó enzimek szintézise és kiválasztása a termofil gombák jellegzetes és túlélésük szempontjából is fontos sajátossága. A termofil gombák által extracellulárisan szintetizált hidrolizáló enzimek a poliszacharidokból különböző kémiai

szerkezetű cukrok keverékét hozza létre. Ezeket a gomba időben egymás után hasznosíthatja, illetve szimultán is történhet felvételük (Maheshwari & Balasubramanyam, 1988).

#### 2.2.4 Hőtűrés

A mezofil mikroorganizmusok a megemelt hőmérsékleti hatásoknak kitéve hősokk fehérjéket szintetizálnak. A hősokk fehérjék jelenlétével magyarázható a termotolerancia. Trent és munkatársai (1994) kimutatták, hogy a termofil mikroorganizmusok is szintetizálnak hősokk fehérjéket. Megfigyelték, hogy a *T. lanuginosus* konidiumok kihajtanak 50 °C-on, valamint azt, hogy 60 percig 55 °C-os hőmérsékletnek kitéve azokat, jobb túlélést mutattak, mint a hősokk hatást nem szenvedett konidiumok. Ezt a szerzett termotoleranciát nem tapasztalták, ha a fehérjeszintézist a hősokk időtartama alatt cikloheximiddel gátolták.

### 2.3 ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM

A glikozidázok olyan enzimek, amelyek a glikozidos kötések hidrolízisét és képződését katalizálják. Az  $\alpha$ -galaktozidáz a hidrolázok osztályába és azon belül a glikozidázok alosztályába sorolható. Az enzim szisztematikus neve:  $\alpha$ -D-galaktozid-galaktohidroláz, enzimszám: EC 3.2.1.22. Triviális neve a melibiáz, melyet egyik természetes szubsztrátumáról, a melibióz diszacharidról kapott. További szinonímái: galaktozidáz alfa; alfa-galaktozid-galaktohidroláz.

#### 2.3.1 Előfordulás

Az  $\alpha$ -galaktozidázokra vonatkozó első feljegyzések Bau, Fischer és Lindner tollából 1895-ből származnak (Pridham & Dey, 1974). A természetben igen széles körben előfordul és nagy jelentőségű enzim: megtalálható az emberi szervezetben, az állati és növényi szövetekben, valamint számos pro- és eukarióta mikroorganizmus szintetizálja.

A növényvilág azon képviselőinél találkozhatunk vele, melyek a raffinóz-család oligoszacharidjait (raffinóz, sztachióz, verbaszkóz) tartalmazzák. Ilyenek a pillangósok, az ajakosok és a rózsafélék, de egyéb nem hüvelyes növényből - mint édesmandula - is kinyerhető (Colowick & Kaplan, 1955; Malhotra & Dey, 1967).

A hüvelyesek endospermiumában a legnagyobb mennyiségben előforduló tartalék tápanyagok a galaktomannánok. A hüvelyes magvakban szacharóz, raffinóz, sztachióz, valamint nagyobb polimerizációs fokú galakto-oligoszacharidok is raktározódnak. A hüvelyesek csírázása során aktiválódik az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim, amely a magvakban található  $\alpha$ -galaktozidos kötést tartalmazó oligo- és poliszacharidokat hidrolizálja, így tápanyagot és energiát szolgáltat a csíranövény számára.

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim feltételezett élettani funkciói:

- sejtek közötti kommunikáció
- cukor transzport és raktározás
- a glikoprotein enzimeknek összekapcsolása egy multienzim rendszerré
- antitest hatás a talajbaktériumok támadásainak kivédésére, ezáltal védőhatás a bakteriális eredetű  $\alpha$ -galaktozidos kötéseket tartalmazó növénypatogén vegyületekkel szemben (Porter et al., 1992).

A mikroorganizmusok mind intracellulárisan (Pederson & Goodman, 1980; Wong et al., 1986; Garro et al., 1996a; Foda et al., 1995; Leder et al., 1999), mind extracellulárisan (Ríos et al., 1993; Kotwal et al., 1995; Shibuya et al., 1995a; Somiari & Balogh, 1995) termelhetik az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeket. A mikroorganizmusok által szintetizált  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek jelentős eltérést mutatnak szubsztrátum specificitás, enzimaktivitás, szerkezeti felépítés, optimális működési feltételek, termostabilitás és kinetikai tulajdonságok tekintetében. A fentiek alapján a mikrobiális eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek részletes tanulmányozása és megismerése lehetővé teszi egy adott felhasználási célra a legmegfelelőbb enzim kiválasztását és nagy mennyiségben történő előállítását, illetve egy adott enzim biotechnológiai hasznosítási lehetőségeinek feltárását.

### 2.3.2 Az enzimszintézis genetikai háttere

#### 2.3.2.1 Prokarióta eredetű $\alpha$ -galaktozidáz enzimek

Aslanidis munkatársaival (1989) az *Escherichia coli* plazmid eredetű indukálható raffinóz hasznosításáért felelős *raf* operon szerveződését és az abban található struktúr gének méretét, sorrendjét határozta meg. A raffinóz hasznosításához szükséges a raffinóz aktív transzportja (raffinóz permáz), az  $\alpha$ -galaktozidáz és a szacharóz hidroláz enzimek, amelyek a *Raf* represszor negatív szabályozása alatt állnak. E fehérjéket kódoló struktúr gének: *rafA*, *rafB* és *rafD*, egy 5284 bp hosszúságú nukleotid szekvencián található. A nukleotid szekvencia és az adott fehérjék molekulatömegének, valamint *N*-terminális peptidszekvenciájának összehasonlításával megállapították, hogy a *rafA* gén 708 aminosavból álló  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet a *rafB* gén a raffinóz permeázt (425 aminosav) és a *rafD* gén a szacharóz hidroláz enzimet (476 aminosav) kódolja.

A hipertermofil *Thermotoga maritima* MSB8 törzsének az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet kódoló kromoszómális *galA* génje 552 aminosavból felépülő polipeptidet kódol, amelynek számított molekulatömege 53653 Da. Ez a gén egy olyan génklaszterben található, ahol a gének nagyon közel helyezkednek el egymáshoz, sőt néha átfedésben vannak és azonos orientációjúak. A *galA* géntől upstream található a  $\beta$ -galaktozidáz enzimet kódoló *lacZ* gén, míg downstream a galaktóz katabolizmusban szerepet játszó enzimeket –galaktóz-1-foszfát uridiltranszferáz és a galaktokináz– kódoló gének vannak. Ezek összessége alkotja a galaktozid hasznosítási operont (Liebl et al., 1998).

### 2.3.2.2 Eukarióta eredetű $\alpha$ -galaktozidáz enzimek

A *Saccharomyces cerevisiae* galaktóz és melibióz hasznosításáért felelős génjei egy regulonban helyezkednek el. Ez a regulon 5 indukálható struktúr génből –*MEL1*, *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10*– és legalább 4 szabályozásban szerepet játszó génből –*GAL3*, *GAL4*, *GAL11* és *GAL80*– áll. A *GAL* struktúr gének a galaktóz felvételért és hasznosításért felelősek, míg a *MEL1* gén terméke az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim (Korhola et al., 1987). A *MEL1* gén nyitott leolvasási keretű 1413 bp hosszúságú szekvencia, mely 471 aminosavból álló fehérjét kódol. Összehasonlítva ezt a kiválasztott enzim *N*-terminális aminosav szekvenciájával kiderült, hogy az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim prekurzorként szintetizálódik, amely az *N*-terminális végén 18 aminosavból álló szignál szekvenciát tartalmaz. Az 5' végen található szabályozó régió nukleotid szekvenciája azonos mindazon élesztő génekével, amelyek kifejeződését a *GAL4*-fehérje szabályozza (Liljeström, 1985). Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézise elsődlegesen a transzkripció szinten szabályozódik. Glükózon szaporított kultúrákban nincs detektálható transzkripció. Indukciós körülmények között  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás mind a periplazmatikus térben, mind a tenyészlében mérhető. Mindkét helyen előforduló enzim molekulatömege 76 kDa, amely endoglikozidáz H enzimmal történő kezelést követően 53 kDa-ra csökkent (Ruohola et al., 1986). A natív  $\alpha$ -galaktozidáz enzim 300 kDa molekulatömeggel rendelkező oligomer glikoprotein (Lazo et al., 1978), amely a plazmamembránon kívülre választódik ki (Lazo et al., 1977).

Egy hőérzékeny *Saccharomyces cerevisiae* törzsnél az RNS szintézis 37°C-on gátlódik, de normálisan zajlik 23 °C-on galaktóz, melibióz vagy L-arabinóz szénforrásokon. Ezt a törzset egyidejűleg galaktóz és glükóz jelenlétében 23 °C-on tenyésztve, az  $\alpha$ -galaktozidáz mRNS szintézise gátlódik (Martinez et al., 1982).

A *Saccharomyces* spp. törzsek melibióz hasznosítási képessége az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet kódoló *MEL* gén jelenlététől függ. Két *MEL* gént klónoztak, hogy próbaként alkalmazzák ipari és vad *Mel*<sup>+</sup> *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* és *Saccharomyces bayanus* törzseknél a *MEL* gének fizikai szerkezetének és kromoszómális elhelyezkedésének jellemzésére. Az elektrokariotipizálás eredményei azt mutatták, hogy az összes megvizsgált *S. pastorianus* és a legtöbb *S. bayanus* törzs egyetlen *MEL* lokuszt tartalmaz, míg a *Mel*<sup>+</sup> *S. cerevisiae* törzsekben a *MEL* lokuszok száma egytől hétig változhat (Turakainen et al., 1993). Naumova és munkatársai (1996) a *MEL* géncsaládok analízisével modell rendszert állítottak fel, amely alkalmas az egyes *Saccharomyces* fajok fejlődésrendszertani rokonságának meghatározására.

A *Zygosaccharomyces* nemzetség fajainak törzseiből származó *MEL* gének hibridizációs próbái feltárták a *MEL* gének polimorfizmusát. Számos *Zygosaccharomyces* törzsből a *MEL* gének kifejeződése galaktózzal indukálható (Turakainen et al., 1994a).

Fonalgombák esetében az  $\alpha$ -galaktozidázok termelésének szabályozásáról még fehérje szinten is nagyon kevés ismeret áll rendelkezésre. Margolles-Clark és munkatársai (1997) *Trichoderma reesei* hemicellulázokat –köztük az *agl1*, *agl2* és *agl3*  $\alpha$ -galaktozidázokat– kódoló génjeinek mRNS szintű kifejeződését tanulmányozva megállapították, hogy a szoforóz valódi expressziót kiváltó vegyület. Az *agl1* és



az *agl2* gének galaktózt tartalmazó tápközegeken kifejeződtek jelezve, hogy a galaktóz az egyetlen szignifikáns kifejeződést indukáló monoszacharid. Cellulózt vagy szoforózt tartalmazó tápközegekben az *agl3* gén kifejeződése igen gyenge a *T. reesei* QM9414 törzsnél, míg erőteljes Rut-C30 törzs esetében. Az *agl1* és az *agl2* gének alapszintű kifejeződése szinte minden körülmények között tapasztalható volt. Az L-arabít erőteljes induktora volt két  $\alpha$ -galaktozidáznak (*agl1*, *agl2*), míg a xilit gyenge expressziót okozott, amelyet a xilit arabittá történő metabolikus konverziója eredményezhetett. Nem tapasztaltak expressziót a könnyen metabolizálható glükóz szénforrás jelenlétében, hasonlóan más extracelluláris hidroláz enzimekhez.

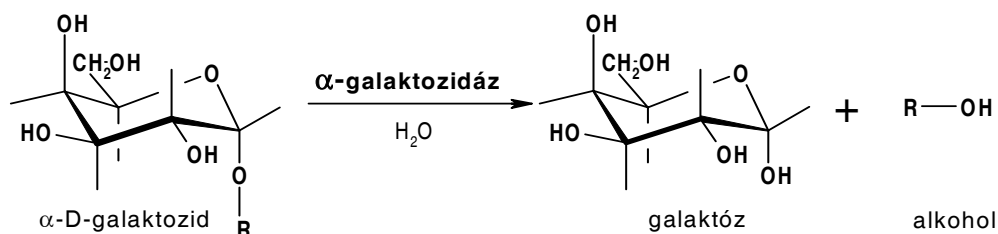
De Vries munkatársaival (1999) három *Aspergillus niger* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz (AglA, AglB és AglC) enzimet kódoló gén (*aglA*, *aglB* és *aglC*) kifejeződését tanulmányozta különböző monomer, oligomer és polimer vegyületeket alkalmazva növekedési szubsztrátumként. Az *aglA* kifejeződése erőteljes galaktózon és galaktóz tartalmú oligoszacharidokon, mérsékelt galaktomannánokon, s glükóz jelenlétében teljesen gátolt. Más szénforrásokon nem tapasztaltak kifejeződést, kivéve arabinózon és glükuronsavon. Az *aglB* gén minden vizsgált szénforráson kifejeződött, galaktózon, xilózon és bükkfa xilánon erőteljesen, ezzel szemben galaktóz tartalmú oligo- és polisacharidokon (kivéve a xilán) ez nem figyelhető meg. Az *aglB* promotor nem tartalmaz CreA kötőhelyet, vagy csak nagyon rövidet, amely nem elegendő a CreA által közvetített gén expressziójának gátlására (de Vries et al., 1999). Az *aglB* gén magas szinten kifejeződött az összes vizsgált szénforráson. Ennek a génnek a terméke talán azért fontos, mert más  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek indukálását biztosítja a polimerekből történő kis mennyiségű galaktóz felszabadításával. A xilánon történő magas szintű enzimtermelés arra utal, hogy a XlnR xilanolitikus aktivátornak szerepe van az *aglB* gén kifejeződésében. Az XlnR- mutánsokkal végzett kísérletek eredményei bizonyították, hogy XlnR fehérje szerepet játszik az *aglB* gén kifejeződésében, de ez különbözik attól a hatástól, amely a xilanolitikus gének esetében figyelhető meg (van Peij et al., 1998). Ezek a gének csak xilóz jelenlétében indukálódtak és az XlnR- mutánsoknál ez az indukációs hatás elmaradt. Az *aglB* gén expressziója xilózon az XlnR- mutánsnál csökkent mértékű volt, de nem szűnt meg teljesen. Ez arra utal, hogy az *aglB* kifejeződése nem kizárólagosan az XlnR regulációs faktortól függ. Az, hogy XlnR hatással van az AglB enzim szintézisére, jelzi, hogy ez az enzim részt vesz a xilán gerinchez  $\alpha$ -galaktozidos kötéssel kapcsolódó galaktóz molekulák hidrolízisében. Ez is bizonyítja jelentőségét a hemicellulóz lebontásban.

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet kódoló *algC* gén kifejeződése csupán glükózon, fruktózon, és olyan szénforrás kombinációkon figyelhető meg, amelyek glükózt is tartalmaznak. Hasonló eredményeket kaptak *T. reesei* *agl3* gén esetében, amikor is az utóbbit és számos más hemicelluláz gén kifejeződését tanulmányozták különböző szénforrásokon (Margolles-Clark et al., 1996). Az enzimszintézist csupán cellulózon, szorbiton és glükózon figyelték meg, de nem tapasztalták galaktózon, xilózon, vagy egyéb monomer vagy polimer vegyületen. Az *A. niger* *aglC* gén egy olyan  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet kódol, amely aktív p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid, raffinóz, és sztachióz szubsztrátumokon, de nem mutatott aktivitást guar

gumin. Ez azt jelzi, hogy az AlgC aktivitása specifikus a glükózhoz, illetve fruktózhoz kapcsolódó galaktóz molekulákra.

Nyilvánvaló, hogy a gének expressziójában megmutatkozó különbségeknek megfelelően, az összetett szubsztrátumok jelenlétében speciális enzim spektrumot kaphatunk.

### 2.3.3 Az $\alpha$ -galaktozidáz enzim által katalizált reakció



A legtöbb enzim esetében az „R” funkciós csoport alkil-, aril-, monoglikozid, illetve poliglikozid csoportokat jelent. Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim az O-glikozidos kötéseket hidrolizálja. Az enzim a hidrolízis során olyan szubsztrátumokat támad, melyek a láncvégen nem redukáló galaktóz molekulát tartalmaznak. A galakto-oligoszacharidokból, a galaktomannánokból és a galakto-lipidekből az  $\alpha$ -D-glikozidos kötéssel kapcsolódó galaktóz molekulákat hasítja le (Schomburg & Salzman, 1991).

Egyes  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek jelentős transzglykozidáz aktivitással is rendelkeznek. Ez azt jelenti, hogy az adott  $\alpha$ -galaktozidáz meghatározott körülmények között oligoszacharidok szintézisére képes. Számos karbohidroláz enzimről bizonyították, hogy transzglykozilálási képessége is van a hidrolizáló tulajdonságán kívül (Scigelova et al., 1999). Ez úgy értelmezhető, hogy a szubsztrátum glikozil része nem víz molekulára, hanem más hidroxil-csoportot tartalmazó vegyületre szállítódik (Eneyskaya et al., 1998).

### 2.3.4 Szubsztrátumok

Az  $\alpha$ -galaktozidázoknál szubsztrátum specifitásuk alapján két csoport különböztethető meg. Az első csoportba sorolhatók a kis polimerizációs fokkal rendelkező szubsztrátumokon (melibióz, raffinóz, sztachióz és a galaktomannánok rövid fragmentumai) aktív  $\alpha$ -galaktozidázok. Ezek az enzimek általában nagyon aktívak az alkil- és aril- $\alpha$ -galaktozid típusú mesterséges szubsztrátumokon. Az  $\alpha$ -galaktozidázok másik csoportját olyan  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek alkotják, amelyek polimer szubsztrátumokon fejtik ki hatásukat. Hasonlóan az első csoportba tartozó enzimekhez, szintén megtámadják a rövid szénláncú oligoszacharidokat, főleg a degradált polimerek fragmentumait, valamint a mesterséges  $\alpha$ -galaktozidokat is (Dey et al., 1993).

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek tehát az  $\alpha$ -galaktozidos kötéseket tartalmazó szubsztrátumok széles skáláján kifejthetik aktivitásukat, mint a természetes és a mesterséges galakto-oligoszacharidok, a

galaktomannánok és fragmentumaik, valamint a vörösvérsejtekhez kapcsolódó  $\alpha$ -galaktozidos kötést tartalmazó oligoszacharidok (McCleary, 1988).

A különböző forrásokból, de sok esetben még azonos szervezetekből, izolált  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek is nagyon eltérő szubsztrátum specifitással rendelkezhetnek. Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek döntő többsége a galakto-oligoszacharidokon aktív (Dey & Wallenfels, 1974; Talbot & Sygusch, 1990; Guimaraes et al., 2001). Azok az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek, amelyek intakt galaktomannánokon is aktívak, leginkább növényi magvából izolálhatók, mint pl. a *Cyamopsis tetragonobola* (guar) (Bulpin et al., 1990), a *Medicago sativa* (lucerna) (McCleary, 1988), a *Phaseolus vulgaris* (zöldbab) és a *Vigna radiata* (bab) (Dey, 1984). *Trifolium repens* (lóhere) magjából négy eltérő tulajdonságú  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet izoláltak. Mind a négy enzim galaktomannánokból a galaktózt tesz szabaddá, függetlenül azok mannóz és galaktóz arányától (Williams et al., 1977; Williams et al., 1978).

A növényi eredetű  $\alpha$ -galaktozidázok mellett a fonalgombákból eredetű enzimek lehetnek hatékonyak a galaktomannánokban lévő galaktóz felszabadításában. Ilyen enzimeket szintézisére az alábbi fajok szintetizálnak: *Aspergillus tamarii* (Civas et al., 1984b), *Aspergillus niger* (Adya & Elbein, 1977; Kaneko et al., 1991), *Trichoderma reesei* (Zeilinger et al., 1993). Figyelemre méltó az, hogy a *Penicillium ochrochloron* olyan  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet termel, amely nagyobb affinitást mutat a polimer galaktomannánokkal szemben, mint az oligomer  $\alpha$ -galaktozidokra (Dey et al., 1993). A vizsgált enzimek nagy része azonban képtelen -feltehetően sztérikus okok miatt- a galaktomannánokon hatásukat közvetlenül kifejteni, noha az endo-1,4- $\beta$ -mannanáz segítségével előállított galaktomanno-oligoszacharidokban található galaktóz teljes mennyiségét szabaddá teszik. Néhány fonalgomba szubsztrátum specifitására vonatkozó adatait foglaltam össze a 3. táblázatban. Megállapítható, hogy az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek általában  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6-os kötéssel kapcsolódó galaktóz egységeket hasítanak le a szubsztrátumokról. A kutatóknak néhány esetben ettől eltérő specifitással rendelkező enzimeket is sikerült találniuk. A *Mortierella vinacea* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktívnek bizonyult az  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 kötésekkel tartalmazó galaktozidokon is. Leder és munkatársai (1999) a prokarióta *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 jelzésű törzsből nyert  $\alpha$ -galaktozidáz enzim esetében azt tapasztalták, hogy az  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 kötésekkel kapcsolódó galaktóz molekulákon aktívabbak, mint az  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 kötésekkel rendelkező galakto-oligoszacharidokon.

Bár számos publikáció foglalkozik a különböző eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek szubsztrátum specifitásával, még ezen a területen is nagyon sok a tisztázásra váró kérdés.

### 2.3.5 Az $\alpha$ -galaktozidáz enzimek szerkezete

Számos  $\alpha$ -galaktozidáz enzim biokémiai és fizikai tulajdonságait részletesen tanulmányozták és aminosav szekvenciájuk is megtalálható a különböző adatbázisokban (<http://afmb.cnrs-mrs.fr>, <http://au.expsasy.org>, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Az enzimek aminosav sorrendjének összevetése során megállapítható a

3. táblázat

Fonalasgomba eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek szubsztrátum specifikitása

Eredet	$\alpha$ -Galaktozidáz	Szubsztrát specifikitás	Hivatkozás
<i>Aspergillus nidulans</i>		p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid, melibióz, raffinóz	Ríos et al. (1993)
<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ -galaktozidáz 1 $\alpha$ -galaktozidáz 2 $\alpha$ -galaktozidáz 3	$\alpha$ -galakto-oligoszacharidok galaktomannánok	Manzanares et al. (1998)
<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ -galaktozidáz AgIA $\alpha$ -galaktozidáz AgIB  $\alpha$ -galaktozidáz AglC	$\alpha$ -galakto-oligoszacharidok kis mennyiségű galaktózt szabadít fel polimer vegyületekből specifikus oligoszacharidokra, de nem aktív galaktomannánokon	de Vries et al. (1999)
<i>Aspergillus niger</i>		raffinóz, sztachióz, melibit, p-nitro-fenil- $\alpha$ -D- galaktozid, guar liszt, szentjánoskenyér eredetű galaktomannán	Adya & Elbein (1977)
<i>Aspergillus niger</i>		metil- $\alpha$ -D-galaktozid; melibióz, raffinóz, sztachióz; galaktomannán (guar, szentjánoskenyér)	Bahl & Agrawal (1969)
<i>Aspergillus tamarii</i> (IP 1017-10)	intracelluláris: $\alpha$ -galaktozidáz I $\alpha$ -galaktozidáz II extracelluláris $\alpha$ -galaktozidáz III	} o-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid melibióz, raffinóz, sztachióz  galakto-oligo- és poliszacharidok, galaktomannánok	Civas et al. (1984a)
			Civas et al. (1984b)
<i>Monascus pilosus</i>	intracelluláris	p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid, melibióz, raffinóz, sztachióz	Wong et al. (1986)
<i>Mortierella vinacea</i>	intracelluláris	o- és p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid, metil- $\alpha$ -D-galaktozid; galaktin, melibióz, raffinóz, sztachióz; (metil- $\beta$ -arabinozid), Gal <sup>3</sup> Man <sub>3</sub>	Suzuki et al. (1970)
			Shibuya et al. (1995b)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	extracelluláris	Gal <sup>3</sup> Man <sub>4</sub>	Shibuya et al. (1995a)
<i>Penicillium ochrochloron</i>			Dey et al. (1993)
<i>Penicillium simplicissimum</i> VTT-D-78090	ALG I	melibióz, raffinóz család oligoszacharidjai; galaktomanno-oligoszacharidok; galaktomannánok melibióz, raffinóz család oligoszacharidjai galaktomanno diszacharid melibióz, raffinóz család oligoszacharidjai; galaktomannánok	Luonteri et al. (1998b)
	ALG II		
	ALG III		
<i>Thermomyces lanuginosus</i> IMI 158749	extracelluláris	p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid, 4-metilumbelliferil- $\alpha$ -D-galaktozid; melibióz, raffinóz, sztachióz; galaktozil' mannotrióz	Puchart et al. (2000)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 ATCC 56765		p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid, melibióz, raffinóz család oligoszacharidjai, szentjánoskenyér eredetű galaktomannán	Zeilinger et al. (1993)
<i>Trichoderma reesei</i>		o- és p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid, metil- $\alpha$ -D-galaktozid; melibióz, raffinóz, sztachióz	Savel'ev et al. (1996)

különböző szekvenciák azonossága, illetve homológiája, feltérképezhetők a konzervatív szekvenciák, amelyek feltételezhetően a katalízis szempontjából is lényeges szerepet töltenek be, illetve feltárhatók a fejlődéstörténeti szempontból fontos rokonsági kapcsolatok, összefüggések.

Néhány közlemény beszámol eukarióta eredetű enzimek kristályosításáról (Suzuki et al., 1970; Mitsutomi & Ohtakara, 1984; Golubev & Neustroev, 1993; Murali et al., 1994) és röntgen analízisükről, de szerkezetük és részletes katalitikus mechanizmusuk még feltáratlan. Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek másodlagos és harmadlagos szerkezetére vonatkozó adatok még nem állnak rendelkezésre, de a különböző forrásokból izolált enzimek eltérő felépítésűek. Vannak olyan enzimek, amelyek egyetlen fehérjemolekulából állnak, de léteznek több alegységből felépülők, illetve ennél bonyolultabb szerkezetűek, pl. monomer-dimer-tetramer komplexek (Schomburg & Salzman, 1991).

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek többsége glikoprotein. Az oligoszacharidok kapcsolódása általában N-acetil-glükózaminon keresztül aszparagin molekulákhoz történik (Adya & Elbein, 1977). Az enzimekben található szénhidrátoknak számos biológiai funkciót tulajdonítanak. Szerepük lehet a glikoproteinek külső környezetbe történő kiválasztásában (Civas et al., 1984b). *Saccharomyces cerevisiae*-ben két fajta invertáz enzim létezik, az egyik a sejt külső felületén helyezkedik el és szénhidrátartalma 50 (m/m) %-ot tesz ki, míg a másik, nem glikozált forma, a sejten belül található (Reddy et al., 1988). Ha tunikamicinnel gátolták a glikozilációt, akkor az invertáz enzim sejten belüli felhalmozódását tapasztalták (Gallili & Lampen, 1977). A glikoproteinek ellenállóbbak a proteáz támadásokkal szemben, így a szénhidrátoknak védő hatást tulajdonítanak a nem specifikus proteolízissel szemben (Wilcke et al., 1979; Speake et al., 1981). A glikozilálás stabilizálja az enzim háromdimenziós szerkezetét, ezáltal védelmet nyújthat a hődenaturációval szemben. *Mortierella vinacea*  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeit ( $\alpha$ -Gal I. és  $\alpha$ -Gal II) klónozva és kifejeztetve *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel, azt tapasztalták, hogy a kiválasztott rekombináns enzimek több szénhidrátot tartalmaztak, mint a *Mortierella vinacea* által szintetizált natív enzimek. A rekombináns enzim pH és hőmérséklet optimuma, valamint pH stabilitása megegyezett a natív  $\alpha$ -galaktozidázokéval. A rekombináns  $\alpha$ -Gal II enzim hőmérséklet stabilitása azonban jelentős mértékben eltért a natív enzimétől. A natív  $\alpha$ -Gal II enzim pH=5,0-ön 30 percig inkubálva instabil volt 25 °C felett, ezzel szemben ugyanilyen körülmények mellett a rekombináns termék stabil volt egészen 50°C-ig. Ez a hőstabilitásban tapasztalt kedvező változás a megnövekedett szénhidráttartalomnak tulajdonítható (Shibuya et al., 1999). *Aspergillus tamarii* által kiválasztott  $\alpha$ -galaktozidáz enzimben N-acetil-glükózamint, mannózt és galaktózt találtak 1:6:1,5 moláris arányban (Civas et al., 1984b). *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szénhidrátartalma 8 (m/m) % és a monoszacharidok aránya mannóz, galaktóz, glükóz, N-acetil-glükózamin 10:1:0,5:1 (Kachurin et al., 1995), ezzel ellentétben Zeilinger és munkatársai (1993) arról számolnak be, hogy egy *Trichoderma reesei* (RUT C-30) törzsből olyan  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet izoláltak, amely egyáltalán nem tartalmazott szénhidrátot.

Henrissat (1991) javaslata alapján az aminosav szekvenciák hasonlósága szerint a glikozilhidrolázokat családokba sorolják. Ez az osztályozás azon az ideológián alapszik, hogy az enzimek

szekvenciáiból kiindulva felvilágosítást adjon azok szerkezetére vonatkozóan, feltárja a fejlődéstörténeti rokonságot az egyes enzimek között, valamint használható eszközt biztosítson a hatásmechanizmus igazolására (Henrissat & Romeu, 1995). Tehát a glikozilhidrolázok családkba sorolása a fehérjék elsődleges szerkezetének hasonlósága és hidrofób klaszter analízisük alapján történik. Ennek megfelelően az eddig ismert  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeket három családba sorolták. A 4. családban prokarióta eredetű enzimek, a 27. családban eukarióta eredetűek, míg a 36. családban mind eukarióta, mind prokarióta eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek találhatók. A legtöbb eddig ismert eukarióta eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim jelentős homológiát mutat aminosav szekvenciájukban és ezért a glikozilhidrolázok 27. családba sorolták azokat. Kivételként kell megemlíteni a gomba eredetű  $\alpha$ -galaktozidázok közül a *Trichoderma reesei* AGLII (Margolles-Clark et al., 1996) és az *Aspergillus niger* AgIB (de Vries et al., 1999) enzimeit, amelyek a 36. osztályba sorolt bakteriális  $\alpha$ -galaktozidáz enzimekkel mutatnak rokonságot. Néhány  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet, mint pl. az *E. coli* MeIA-t a glikozilhidrolázok 4. családjába sorolták (Liljeström & Liljeström, 1987). Ez az enzim  $\text{NAD}^+$  és  $\text{Mn}^{2+}$  ionokat igényel a maximális aktivitáshoz és nem mutat szerkezeti rokonságot a 27. és a 36. osztályba tartozó  $\alpha$ -galaktozidáz enzimekkel. Az előbbi két osztály jelentős szerkezeti hasonlóságot mutat, ezért Dagnall és munkatársai (1995) egy DAG [(izomalto)dextranáz/alfa-galaktozidáz] elnevezésű szupercsaládba történő összevonásukat javasolták. Ezzel egyetértésben Henrissat és Bairoch (1996) a fenti két családot a glikohidrolázok GH-D nemzetségébe sorolta. A 27. családba tartozó  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek alegységei kisebb molekulatömeggel (~62 kDa) rendelkeznek, mint a 36. családba sorolt 80 kDa alegységű enzimek (4. táblázat).

A különböző eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek molekulatömege jelentős variabilitást mutat és 33-325 kDa-os tartományban található. Az egyes  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek felépítését mutatja az 5. táblázat. Egyes szervezetekben egymás mellett előfordulhatnak monomer és multimer felépítésű enzimek is. Ezekre példa a lencse és a szójabab  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeit. A lencsében található  $\alpha$ -galaktozidáz II-nek nevezett monomer maga is aktív enzimforma, amely könnyen aggregálódik létrehozva a tetramer  $\alpha$ -galaktozidáz I enzimet. A két enzimforma azonban jelentős eltérést mutat optimális pH értékekben (Dey et al., 1983). A szója eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim pH=7,0-nél monomer formájú, míg pH=4,0 értéken tetramer szerkezetet mutat. A tetramer szerkezetű enzim a hődenaturációval (70°C-on történő kezelés) szemben megvédhető galaktózzal, míg a monomer forma azonos időtartam alatt elveszíti aktivitásának 99 %-át. Az egér szöveti  $\alpha$ -galaktozidázainál is kimutatták, hogy a pH és az ionerősség függvényében átalakulhatnak egymásba a különböző enzimformák. Ennek megfelelően kimutattak 320 kDa, 150 kDa és 70 kDa molekulatömeggel rendelkező enzim módosulatokat (Lusis & Paigen, 1976). A *Bifidobacterium adolescentis*  $\alpha$ -galaktozidáz enzime 79 kDa alegységekből felépülő tetramer, de a dimerszerkezetű enzim is mutat  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást (Leder et al., 1999).

4. táblázat

Különböző eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek polipeptidjeinek jellemzői

Eredet	Enzim			Család	Letéti szám	Hivatkozás
	jelölés	aminosavak száma	mol-tömeg			
<i>Bacillus halodurans</i>		434	49761	4	Tr EMBL Q9KAQ9	Takami et al. (2000)
<i>Escherichia coli</i> K-12	MeLA	451	50657	4	Sp P06720	Liljeström & Liljeström (1987)
<i>Aspergillus niger</i>	AGLA	545	60148	27	Sp P28351	den Herder et al. (1992)
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> (guar)		411	45135	27	Sp P14749	Overbeeke et al. (1989)
<i>Glycine max</i> (szójabab)		422	46395	27	Tr EMBL Q39811	
<i>Human</i>		429	48766	27	Sp P06280	Kornreich et al. (1989)
<i>Mortierella vinacea</i>		396	43326	27		Shibuya et al. (1997)
<i>Mortierella vinacea</i>		417	46392	27		Shibuya et al. (1995b)
<i>Penicillium purpurogenum</i>		439	48236	27		Shibuya et al. (1998)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	AGLI	435	47630	27	Sp P04824	Luonteri et al. (1998a)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (vesebab)		425	47047	27	Tr EMBL Q41100	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MEL2	471	52230	27	Sp P41945	Turakainen et al. (1994b)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MEL5	471	52088	27	Sp P41946	Turakainen et al. (1994b)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MEL6	471	52113	27	Sp P41947	Turakainen et al. (1994b)
<i>Torulaspota delbrueckii</i> IFO 1255		474	52360	27		Oda & Fukunaga (1999)
<i>Trichoderma reesei</i>	AGLI	444	45700	27		Margolles-Clark et al. (1996)
<i>Trichoderma reesei</i>	AGLIII	624	68455	27	Tr EMBL Q92451	Margolles-Clark et al. (1996)
<i>Zygosaccharomyces cidri</i>		469	51736	27	Tr EMBL Q99172	Turakainen et al. (1994a)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	AgaN	730	80300	36		Fridjonsson et al. (1999a)
<i>Escherichia coli</i>	RAFA	708	81188	36	Sp P16551	Aslanidis et al. (1989)
<i>Thermotoga neapolitana</i>		522	61000	36		King et al. (1998)
<i>Thermus brockianus</i> ITI360	AgaT	476	53810	36	Sp Q9X6C7	Fridjonsson et al. (1999b)
<i>Trichoderma reesei</i>	AGLII	746	79500	36		Margolles-Clark et al. (1996)

5. táblázat

Példák különböző szerkezetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek előfordulására

Szerkezet	Példa		Hivatkozás
	Az $\alpha$ -galaktozidáz eredete	molekulatömeg	
<b>Monomer</b>	<i>Thermotoga neapolitana</i> 5068	1 x 61000 Da	Duffaud et al. (1997)
	<i>Aspergillus niger</i>	1 x 45000 Da	Adya & Elbein (1977) Bahl & Agrawal (1969)
	<i>Aspergillus ficuum</i> NRRL 3135	1 x 71000 Da	Zapater et al. (1990)
	<i>Trichoderma reesei</i>	1 x 50000 Da	Zeilinger et al. (1993)
	<i>Trifolium repens</i> (fehérhere)	1 x 42000 Da	Williams et al. (1977)
	<i>Glycine max</i> (szójabab)	1 x 40000 Da	Porter et al. (1992)
	<i>Lens culinaris</i> $\alpha$ -galaktozidáz II	1 x 40000 Da	Dey et al. (1983)
<b>Dimer</b>	Humán $\alpha$ -galaktozidáz A, Humán $\alpha$ -galaktozidáz B	2 x 49800 Da 2 x 45700 Da	Schiffmann et al. (2000)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MEL5	homodimer	
<b>Trimer</b>	<i>Bacteroides ovatus</i> $\alpha$ -galaktozidáz I	3 x 85000 Da	Gherardini et al. (1985)
	<i>Bacteroides ovatus</i> $\alpha$ -galaktozidáz II	3 x 80500 Da	
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 266	3 X 82000	Talbot & Sygusch (1990)
<b>Tetramer</b>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> $\alpha$ -galaktozidáz I	4 x 81000 Da	Pederson & Goodman (1980)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> $\alpha$ -galaktozidáz II	4 x 84000 Da	
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083	4 x 83000 Da	Van Laere et al. (1999)
	<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL251	4 x 45000 Da	Garro et al. (1996b)
	<i>Glycine max</i> (szójabab)	4 x 40000 Da	Porter et al. (1992)
	<i>Lens culinaris</i> (lencse) $\alpha$ -galaktozidáz I	4 x 40000 Da	Dey et al. (1983)
<b>Oktamer</b>	<i>Bifidobacterium breve</i> 203	8 x 39000 Da	Sakai et al. (1987)

Az aktívcentrum kutatásban különböző fizikai, fizikai-kémiai, kémiai és molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával határozzák meg az enzimek katalitikus helyének felépítését és az aktivitás szempontjából létfontosságú aminosavakat és funkciós csoportokat. Dey (1969) a katalitikus csoportok feltérképezéséhez fémionok hatásainak vizsgálatát és fotooxidációs eljárást alkalmazva arra a következtetésre jutott, hogy az édes mandulából származó  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktivitásában fontos szerepe van egy karboxilcsoportnak és egy hisztidin eredetű iminocsoportnak. Ez utóbbit fotooxidációval tönkretéve az enzim teljesen elveszítette aktivitását. A funkciós csoportok felderítésére kémiai módosításokat alkalmazva megállapították, hogy a kókuszdióból származó  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktívcentrumában két karboxil-csoport, valamint egy triptofán és egy tirozin molekula található (Mathew & Balsubramian, 1987). A kávébabban 2 tirozin (tyr 108 és a tyr 154) molekuláról mutatták ki, hogy katalitikus szerepük van az enzimaktivitás kialakításában. A 154. tirozin cseréje az enzimaktivitást 80 %-ra csökkentette, míg a 108. tirozin cseréje szinte teljesen megszüntette az aktivitást (Zhu et al., 1995). A kávébabban található tirozin 108-nak megfelelő aminosav nagyon konzervatív a 27. családhoz tartozó  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek szekvenciájában (Margolles-Clark et al., 1996). Fábry betegségben szenvedő emberekből izolált lizozóma eredetű mutáns gének, olyan  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet kódolnak, amelyeknek nincs vagy nagyon csökkent az aktivitásuk (Okumiya et al.,



1995). Sok ezek közül a gének közül olyan pontmutációkat hordoz, amelyek egyetlen konzervatív aminosav cseréjét idézik elő. Hasonlóan konzervatív aminosavakat találtak a megfelelő helyeken a *Trichoderma reesei* AGLI és AGLIII enzimeinél. Ezek legnagyobb része szabad karboxil-csoportokat és aromás oldalláncokat tartalmaz. A *Penicillium simplicissimum* (VTT-D-78090) AGLI enzimének aminosav szekvenciája 73 %-os hasonlóságot mutat a *Trichoderma reesei* aminosav szekvenciájával (Luonteri et al., 1998a), továbbá 57-58 %-os hasonlóságot a *Saccharomyces cerevisiae* és a növényi eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek, mint például a *Cyamopsis tetragonobola* (Overbeeke et al., 1989) és a *Coffea arabica* (Zhu & Goldstein, 1994) eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek aminosav szekvenciáival. *Coffea arabica*  $\alpha$ -galaktozidáz enziménél a 108-as tirozin molekula mellett szintén fontos szerepet tulajdonítanak katalitikus aktivitás szempontjából a 272-es aszparaginsavnak. A fentiekben említett két aminosav megtalálható a *Penicillium simplicissimum* AGLI enzimének szekvenciájában. *Penicillium simplicissimum* AGLIII enzimének N-terminális aminosav sorrendje nagy hasonlóságot mutat a *Mortierella vinacea* (Shibuya et al., 1995b), a *Saccharomyces cerevisiae* MELI (Liljeström, 1987) és a *Cyamopsis tetragonobola* (Overbeeke et al., 1989)  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeinek N-terminális aminosav sorrendjével. A *Penicillium simplicissimum* AGLI és AGLIII enzimeinek aminosav szekvenciái is jelentős rokonságot mutatnak. Az AGLII enzim jelentősen eltért a másik két  $\alpha$ -galaktozidáz enzimtől, mivel ennek molekula tömege nagyobb volt és sokkal több hasonlóságot mutatott a baktérium, élesztő és *Aspergillus* eredetű enzimekkel, mint más *Penicillium* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimekkel (Luonteri et al., 1998a).

Számos szerző bizonyította, hogy a higany vegyületek, mint például a p-klór-merkuribenzoát, a p-hidroxi-merkuribenzoát és a p-hidroxi-merkuri-benzolszulfonsav gátolják az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek aktivitását (Pedersen & Goodmann; 1980; Garro et al., 1993;). E megfigyelések valószínűsítik, hogy a tiol csoportoknak szerepe kell hogy legyen az enzimaktivitás létrejöttében.

Az enzimek aktívcentrum kutatásában gyakran alkalmaznak oxidáló ágenseket, mint például hidrogén-peroxid, kálium-permanganát, kálium-tioszulfát, nátrium-jodát. A hidrogén-peroxid olyan oxidáló vegyület, amely reakcióba lép a tioéter, az indol, a tiol, az imidazol és a fenol funkciós csoportokkal. Az oxidációs érzékenység tekintetében az alábbi sorrendet határozták meg az oxidálható aminosavak esetében: metionin, cisztein, triptofán, cisztin, hisztidin és tirozin (Neumann, 1972). Kachurin és munkatársai (1995) hidrogén-peroxidot alkalmaztak az enzim módosításához abból a célból, hogy meghatározzák az aminosav összetételben az oxidáció által okozott változást. Az eredmények értékelése szempontjából lényeges oxidálható aminosavak változásait mutatja a 6. táblázat, amelyből kiténik, hogy csak a metionin konverziója adott statisztikailag szignifikáns eredményt.

A metionin először metionin-szulfoxiddá, majd hosszú idejű kezelés, illetve agresszívebb reakció körülmények között metionin-szulfonná alakul az oxidáció során (Yamasaki et al., 1982). Kachurin munkatársaival (1995) csupán a metionin-szulfoxid jelenlétét mutatták ki a reakcióelegyből. A metionin oxidációja megnövekedett aktivitást eredményezett. A mechanizmus, amely a megváltozott enzimaktivitást

idézte elő, még tisztázatlan. Az azonban tény, hogy a metionin metionin-szulfoxiddá történő oxidációja növeli a polaritást és ezáltal hidrofílebbé teszi az adott fehérjérszt. Ez a jelenség konformáció változást idézhet elő az aktívcentrum közelében, ily módon az aktívcentrum könnyebben hozzáférhetőbbé válik nemcsak a szubsztrátumok, hanem az inhibitorok és az enzimmérgek számára is.

**6. táblázat** Az oxidálható aminosavak konverziója hidrogén-peroxidos kezelést követően *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -galaktozidáz enzimében (Kachurin et al., 1995) nyomán

Aminosav	Összetétel [mol/mol enzim]				
	Natív	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + +20 mM glükóz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + +20 mM galaktóz	Denaturálás: HCl+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Denaturálás: 7 mM guanidin.HCl + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Tirozin	15,32	14,94	15,58	15,12	14,40
Cisztein	6,93	6,88	7,12	-	-
Hisztidin	9,90	10,25	10,05	9,75	10,05
Metionin*	5,06	3,94	4,31	1,89	0,95
Metionin-szulfoxid*	0,00	0,95	0,62	2,94	4,22

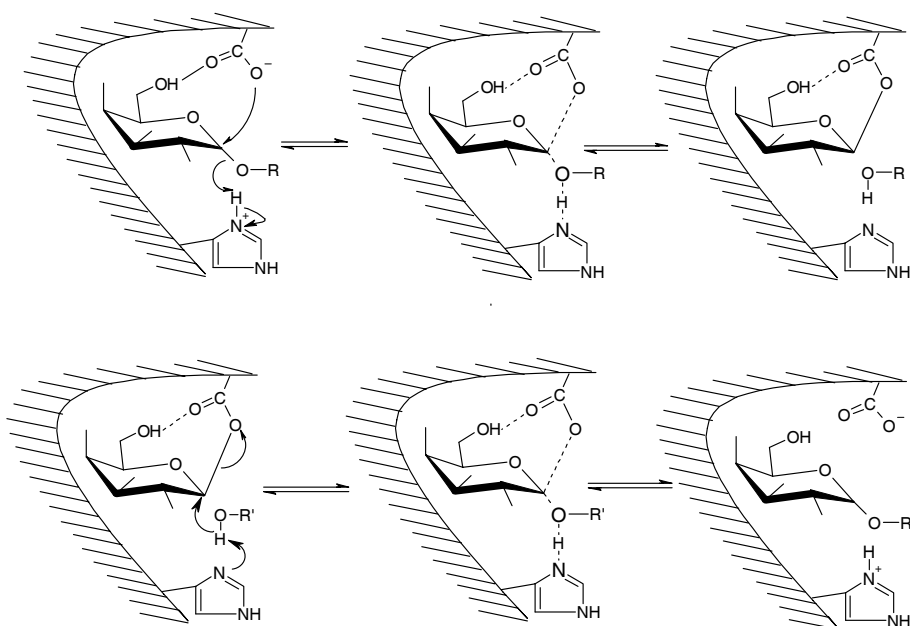
0,5 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM pH=6,4 foszfát pufferben, reakció körülményei: 20°C és 1,5 órás időtartam

### 2.3.6 Hatásmechanizmus

A glikohidrolázok 4. családjába tartozó prokarióta eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek hatásmechanizmusa még ismeretlen. A közelebbi szerkezeti rokonságot mutató 27. és 36. családba tartozó enzimek konfiguráció megtartó hidrolízist katalizálnak. Ezt a tényt támasztotta alá kísérletesen Puchart munkatársaival (2000), akik a *Thermomyces lanuginosus*  $\alpha$ -galaktozidáza által katalizált hidrolízis során vizsgálták a keletkező termék konformációját. Két szubsztrátum: a p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktozid és a galaktozil<sup>1</sup>-mannotrióz hidrolízisének sztereokémiai átalakulását <sup>1</sup>H NMR spektroszkópiával követve kimutatták, hogy a hidrolízis elsődleges terméke a D-galaktoz  $\alpha$ -anomer formájú volt, amelyből mutarotációval jött létre a  $\beta$ -anomer. *Phenerocate chrysosporium*  $\alpha$ -galaktozidáz enzime által katalizált hidrolízisnél is szerkezet megtartó kettős eltolódású mechanizmusról számoltak be (BrumerIII et al., 1999).

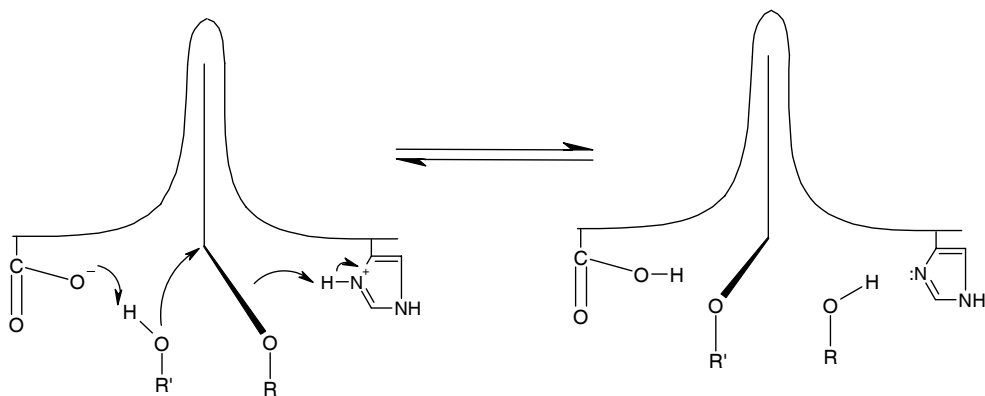
Sinnott (1990) az enzimek transzferáz és a hidroláz aktivitása közti kapcsolatot elemezve megállapította, hogy a konfiguráció megtartó glikozidázok közül sok képes glikozil csoportokat átvinni kis molekulatömegű alkoholokra (pl. metanolra) a vízmolekulához hasonlóan. Ezzel a tulajdonsággal az invertáló glikozidázok nem rendelkeznek. A konformáció megtartó glikozidázok egy kovalens kötésű glikozil-enzim intermediert képeznek. Ha a szubsztrátum és az akceptor koncentrációk a reakció elegyben a K<sub>m</sub> értéke felett vannak, akkor ezeknek a glikozil-enzim intermediereknek transzfer reakciói kinetikailag szabályozottak és ebből következik, hogy elvileg az összes lehetséges transzfer termék képződésére is megvan a lehetőség. Ezek a termékek mind létrejöhetnek, de le is bomlanak mielőtt a termodinamikai egyensúly beáll. Dey (1969) kimutatta, hogy az édes mandulából kinyert  $\alpha$ -galaktozidáz enzim által katalizált hidrolízis és transzferáz reakciók egy azon aktívcentrumban mennek végbe. A lehetséges hatásmechanizmusra két hipotézist állít fel:

egy kétlépéses mechanizmust (1. ábra), valamint egy egylépésből álló alternatív mechnizmust (2. ábra). Kísérleti eredményei alapján feltételezi, hogy az enzim aktívcentrumában egy karboxil és egy imidazol csoport található. A két lépésből álló mechanizmus a következőképpen írható le: először a szubsztrátum molekula aglikon része a karboxil és az imidazol csoportok együttes hatásának eredményeként leválik. Ezt követi az akceptor molekula felvétele, amely lehet víz vagy cukor. A termékképződés egy átmeneti állapotot követően történik. Ebben az esetben feltételezhető, hogy két egymást követő inverzió megy végbe a C-1 szénatomon, mivel csak ilyen módon jöhet létre konformáció megtartó katalízis (Dey, 1969).



**1. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim által katalizált reakció kétlépéses mechanizmusa**

Kimutatták, hogy a PNPG szubsztrátum alkalmazása során a reakció sebesség pH=4,5 alatt sem lesz zéro, ami azt jelenti, hogy a deprotonált karboxilcsoport jelenléte az aktívcentrumban kevésbé fontos, mint a protonált imidazol csoporté. Legvalószínűbb, hogy az imidazol csoport által okozott elektrofil támadás elegendő a glikozil-oxigén kötés hasításához.

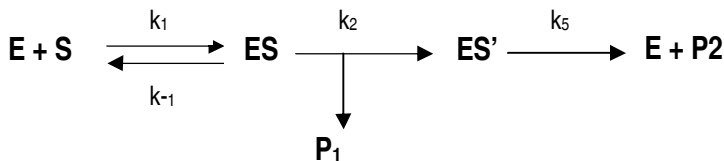


**2. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz által katalizált reakció egy lépéses mechanizmusa**

Az alternatív egy lépéses hatásmechanizmusnál egy hármasszubsztrátum-akceptor komplex létrejöttének feltételezéséből indulnak ki. A karboxil és az imidazol csoportok szerepe azonos az előzőekben leírtakkal. Ez a mechanizmus a karbonium ion képződése miatt csak egyoldali támadást tesz lehetővé, amely konfiguráció megőrző termékképződést eredményez.

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek által katalizált reakciók kinetikai megközelítése is segíthet a lejátszódó folyamatok értelmezésében (Segel, 1975). Számos szerző ilyen alapokon kívánja feltárni az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim működési mechanizmusát (Savel'ev et al., 1996; Eneyskaya et al., 1998; Brumer III et al., 1999). Savel'ev és munkatársai (1996) *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -galaktozidáz enzimét használták kinetikai tanulmányaikhoz. A fenti enzim számos természetes és szintetikus szubsztrátum hidrolízisét katalizálja. A szubsztrátum felesleg által okozott gátlás jellemző az o-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (ONPG), a p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (PNPG), a 4-metilumbelliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid (MUG) és a metil- $\alpha$ -D-galaktopiranozil (MG) szintetikus szubsztrátumoknál. A természetes szubsztrátumok, mint a melibióz, a raffinóz és a sztachióz esetében ezt a jelenséget nem tapasztalták. Általában az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek a legnagyobb affinitást a PNPG szubsztrátummal szemben mutatják és ezt hidrolizálják a leggyorsabban (Guimaraes et al., 2001; Fridjonsson et al., 1999a,b; Kotwal et al., 1995; Zeilinger et al., 1993; Sakai et al., 1987). *Trichoderma reesei* eredetű enzim esetében is egy nagyságrenddel nagyobb a reakció sebességi állandója, mint más szubsztrátumok megfelelő értékei. A D-galaktóz kompetitív módon gátolja a PNPG hidrolízisét, bizonyítva nagy affinitását az enzim aktív centrumához. A galaktóz kötőhely minden kétséget kizáróan a legfontosabb kötőhely az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim összes szubsztrátuma számára. Egyfelől a reakció gátlása galaktózzal, másfelől a szubsztrátum gátlás azt jelenti, hogy a kinetikai állandók meghatározása csak kis szubsztrátum koncentrációknál történhet, amely kismértékű termékképzést eredményez. E megközelítés szerint a folyamatok leírásánál megkülönböztetnek ún. „gyors” (PNPG) és „lassú” (az összes többi) szubsztrátumokat. A

PNPG szubsztrátumra meghatározott Michaelis állandó ( $K_m$ ) jelentősen kisebb, mint a többi szubsztrátumé. A tanulmányozott reakciók steady-state kinetikájának ezeket a jellemzőit egy olyan modellel lehet leírni, amelyben egy átmeneti galaktozil-enzim komplex keletkezik. Kis szubsztrátum koncentrációknál és a D-galaktóz gátlás figyelmen kívül hagyásával a reakció kinetikai sémáját a 3. ábra mutatja.

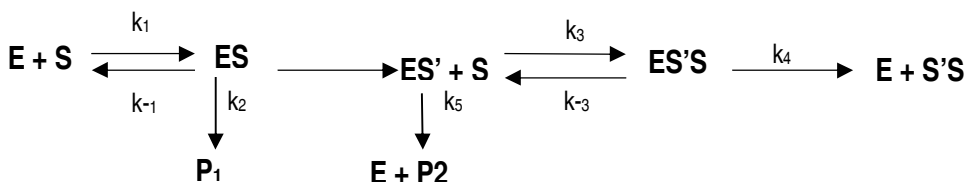


**3. ábra  $\alpha$ -galaktozidáz katalizált hidrolízis általános kinetikai vázlat**

E = enzim, S = szubsztrátum, ES = enzim-szubsztrátum komplex, ES' = galaktozil-enzimkomplex  
 $P_1$  = a szubsztrátum aglikon részéből képződő termék,  $P_2$  = D-galaktóz,  $k_1, k_{-1}, k_2, k_5$  reakció sebességi állandók

A „lassú” szubsztrátumok esetében a kinetikailag meghatározott  $K_m$  értéknek azonosnak kellene lennie az enzim-szubsztrátum komplex tényleges disszociációs állandójával. A „gyors” szubsztrátumok esetében a kísérletileg meghatározott  $K_m$  értéke egyenlő a PNPG disszociációs állandó és a  $k_5/k_2$  érték szorzatával.

A transzglykozilálás számos karbohidroláz esetében jellegzetes tulajdonság, beleértve a lóhere (Williams et al., 1977), a *Bifidobacterium adolescentis* (van den Broek et al., 1999), a *Bacillus stearothermophilus*, a *Thermus brockianus* (Spangenberg et al., 2000), a *Candida guilliermondii* (Hashimoto et al., 1995) és az *Aspergillus niger* (Scigelova & Crout, 2000) eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeket. A *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -galaktozidáz enzime is jelentős transzferáz aktivitással rendelkezik. Transzglykozilációs termékeket kaptak PNPG, ONPG, MUG és MG szubsztrátumokon, amelyek nagy koncentrációkban gátolták a hidrolitikus aktivitást. Ezzel ellentétben a melibióz, a raffinóz és a sztachióz nem gátolta a hidrolízist, még nagy koncentrációknál sem, és nem adtak transzglykozilációs termékeket sem. Ez újabb bizonyíték arra nézve, hogy az átmeneti galaktozil-enzimkomplex képződése kiemelt fontosságú a szubsztrát felesleg által okozott gátlás és a transzglykozilálás szempontjából. A glikozil-enzimkomplex kölcsönhatása egy újabb szubsztrátum molekulával egy hármass komplex létrejöttét eredményezi. A 4. ábra mutatja a *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -galaktozidáz enzime által katalizált reakció kinetikai sémáját.



**4. ábra *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -galaktozidáz enzime által katalizált reakció kinetikai sémája**

E = enzim, S = szubsztrátum, ES = enzim-szubsztrátum komplex, ES' = galaktozil-enzimkomplex  
 $ES'S$  = hármass komplex,  $P_1$  = a szubsztrátum aglikon részéből képződő termék,  $P_2$  = D-galaktóz,  
 $S'S$  = a szubsztrátum transzglykozilációs terméke,  $k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-3}, k_4, k_5$  reakció sebességi állandók

A hármas komplex, az ES<sup>2</sup>S, képződésének legvalószínűbb magyarázata az, hogy létezik egy második szubsztrátum kötőhely is az aktívcentrumban. Ez a hely azonban kisebb affinitást mutat a szubsztrátumra, mint az elsődleges kötőhely és csak viszonylag nagy szubsztrátum koncentráció mellett telítődik.

Mathew és Balasubramaniam (1987) kókuszdió eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet vizsgálva kémiai módosítások eredményeire és kinetikai vizsgálatokra alapozva állították fel a hatásmechanizmusra vonatkozó hipotézisüket. Vizsgálataik szerint az enzim aktívcentrumában két karboxil csoport, egy triptofán és egy tirozin található. A javasolt mechanizmus szerint a 3,8 disszociációs állandóval rendelkező csoport egy karboxil csoport, amely ionizált formában van jelen, hogy stabilizálja az átmeneti karbonium iont és megvédje az egy oldali nukleofil támadástól. Ennek eredményeképpen a termék ugyanolyan konfigurációjú lesz, mint a szubsztrátum. A galaktóz molekula deformált szék konfigurációt mutat a karbonium ion keletkezése során. A 6,5 disszociációs állandóval rendelkező protondonor egy perturbált állapotú karboxil csoport, amely protonált. A glikozilhidrolázok 27. családjához tartozó  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeknél aszparaginsavak biztosítják a katalízisben résztvevő karboxil csoportokat.

### **2.3.7 Az enzim működését meghatározó környezeti tényezők**

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek jellemző tulajdonságainak és optimális működési feltételeinek meghatározása bonyolult feladat, mivel a különböző forrásokból származó enzimek igen eltérő tulajdonságokkal és működési jellemzőkkel rendelkeznek.

#### **2.3.7.1 Hőmérséklet és pH**

Az enzim reakciók esetében a hőmérsékletnek kettős hatása van, egyrészt a hőmérséklet emelése a reakció sebesség növekedését eredményezi, másrészt az enzim fehérje természetéből következően denaturációt idéz elő. Ezek alapján az enzimkatalizált reakció esetében meghatározható egy optimális hőmérséklet vagy hőmérsékleti tartomány, ahol az enzim maximális sebességgel katalizálja az adott reakciót. Sok esetben az optimális hőmérsékleteken az enzimek hődenaturációt szenvednek, ezért a felhasználás szempontjából nagyon fontos meghatározni az enzimek stabilitását is. Ez a tulajdonság szoros összefüggésben van az adott enzimfehérje szerkezetével. A különböző szervezetekből származó  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek igen eltérő hőmérséklet optimummal és stabilitással rendelkeznek. A fenti jellemzők nagymértékben függenek egyéb környezeti tényezőktől, mint például a pH, az ionerősség, a redoxpotenciál, a szubsztrátumok kémiai szerkezete és az egyéb fehérjék jelenléte. Különösen a hőmérséklet és a pH kölcsönhatása kiemelkedő jelentőségű az enzimek stabilitása szempontjából, mivel mindkét paraméter közvetlenül hat az enzimfehérjék konformációjára. A 7. táblázatban néhány mikrobiális forrásból izolált  $\alpha$ -galaktozidáz optimális pH és hőmérséklet adatai, valamint stabilitásukra vonatkozó információk kerültek összefoglalásra. Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek pH és hőmérséklet optimum értékei általában PNPg szubsztrátumra vonatkoznak. Olyan mikrobiális  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek bemutatására törekedtem, amelyek

7. táblázat Mikrobiális  $\alpha$ -galaktozidáz enzim enzimaktivitásának optimális paraméterei és stabilitási adatai

Eredet	$\alpha$ -Galaktozidáz	pH opt.	Hőm. opt.	Hőmérséklet-stabilitás	Hivatkozás
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083	intracelluláris $\alpha$ -galaktozidáz $\alpha$ -galaktozidáz rekombináns termék	5,5 6,0 6,5	55°C 45°C 45°C	Ezen a hőmérsékleten gyors inaktiválódás, 6°C-on féléletidő: 2-3 hónap	Leder et al. (1999) Van Laere et al. (1999) Van den Broek et al. (1999)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> AT-7	intracelluláris $\alpha$ -galaktozidáz I $\alpha$ -galaktozidáz II	6,0 7,0	73°C 69°C	félélet idő: 65°C-on > 2óra 65°C-on 3 perc	Pederson & Goodman (1980)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 226	extracelluláris	7,0-7,5		60°C, 24 óra 100% aktivitás	Talbot & Sygusch (1990)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NUB3621	AgaN rekombináns termék		75°C	félélet idő: 70°C-on 19 óra	Fridjonsson et al. (1999a)
<i>Thermotoga neapolitana</i> 5068	intracelluláris extracelluláris		100- 103°C	félélet idő: 85°C-on 9 óra 90°C-on 2 óra 100°C-on 3 perc	Duffaud et al. (1997) McCutchen et al. (1996)
<i>Thermotoga neapolitana</i> NS-E	rekombináns AglA		93°C		King et al. (1998)
<i>Candida guilliermondii</i> 404	galaktozidáz I galaktozidáz II	4,5 4,5	75°C 75°C	15 perc inkubálás <70°C <45°C	Hashimoto et al. (1993)
<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ -galaktozidáz A	4,0-4,5	60°C	50 °C-ig	Scigelova & Crout (2000)
<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ -galaktozidáz 1 $\alpha$ -galaktozidáz 2 $\alpha$ -galaktozidáz 3	4,5	50-55 °C	pH=5,5-6,0-nél kevésbé stabilis, mint pH=4,5-ön	Manzanares et al. (1998)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM* 839		4,5	60°C	hőlabilis	Srinivas et al. (1993)
<i>Aspergillus niger</i>		5,0	50°C	35-50°C-on 1óra	Somiari & Balogh (1995)
<i>Mortierella vinacea</i>	intracelluláris	4,5	55°C	pH=4,0-6,0 40°C alatt	Suzuki et al. (1970)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	extracelluláris	4,5	55°C	pH=6,5-10,5 55°C alatt	Shibuya et al. (1995a)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 ATCC 56765	extracelluláris	4,0	60°C	60 perc 50°C-on pH=4,0-6,0, 70%-os maradék aktivitás	Zeilinger et al. (1993)
<i>Monascus pilosus</i>	intracelluláris	4,5-5,0	55°C	20 perc 55°C pH=4,5	Wong et al. (1986)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> IMI 158749	extracelluláris	4,5-5,0	65-70°C	6 óra 60°C-on pH=4,5	Puchart et al. (2000)

hőmérséklet optimuma legalább 45 °C. Mezofil forrásból származó mikrobiális  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek között is találhatunk 55-60 °C-os hőmérséklet optimummal rendelkező enzimeket. Míg a termofil forrásból származó enzimeknél ezen értékek általában nagyobbak és 65 °C-tól 103 °C-ig terjedő tartományban találhatóak. A

mikrobiális  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek pH optimum értékeit vizsgálva megállapítható, hogy a bakteriális eredetű enzimek a gyengén savas és a semleges tartományban találhatók, míg a gomba eredetű enzimek pH optimumai a pH=4,0-5,0 tartományban mérhetők.

Az enzim stabilitási adatok összehasonlító értékelése szinte lehetetlen, mivel eltérő szempontok és körülmények között történtek a meghatározások. Kevés olyan adat található az irodalomban, amely gyakorlati alkalmazás szempontjából is iránymutató lehet. Sok esetben egy adott pH és hőmérséklet értéknél meghatározott idejű expozíciós időtartamot alkalmazva adják meg a maradék aktivitás értékeket (Zeilinger et al., 1993; Wong et al., 1986). E vizsgálatoknál az inkubáció időtartama változhat néhány perctől több óráig, ami lehetetlenné teszi az objektív összehasonlításokat. Előfordul, hogy nagyon rövid inkubációs időket alkalmazva adják meg azt a hőmérsékleti tartományt, amelyben a kiindulási enzimaktivitás visszamérhető (Hashimoto et al., 1993; Scigelova & Crout, 2000). Az alkalmazástechnikai szempontokat figyelembe véve a legjobban értékelhető adatokat az adott körülmények között meghatározott féléletidők szolgáltatják (Pederson & Goodman, 1980; Fridjonsson et al., 1999a; McCutchen et al., 1996). Ebben a tekintetben Nguyen munkatársaival (2002) ajánl egy komplex vizsgálati és értékelési módszert, amely a pH és a hőmérséklet közötti interakciók figyelembe vételével vizsgálja az enzimaktivitások félélet idejének alakulását. Ezen adatok birtokában az egyes enzimek stabilitásának összehasonlítása objektívvé tehető.

Egyes közleményekben az enzim stabilitási vizsgálatok nem a működési körülmények közötti aktivitások változásaira vonatkoznak, hanem sokkal inkább a tárolási tulajdonságokat méri fel, azaz az enzimfehérje viselkedését nézik fagyasztás és felengedtetés hatására, illetve alacsony hőmérsékleteken (0-6°C) hosszabb tárolási időtartamoknál vizsgálják a maradék aktivitásokat (Dey & Wallenfels, 1974; van den Broek et al., 1999).

### **2.3.7.2 Aktivátorok, inhibitorok**

A különböző ionok és vegyületek enzimaktivitásra gyakorolt hatásuk alapján lehetnek aktivátorok, inhibitorok, illetve közömbös hatásúak. Természetesen az ilyen hatások vizsgálatánál fontos az adott elem, ion vagy vegyület koncentrációját is figyelembe venni. Még a kofaktorok esetében is, ha az optimálisnál nagyobb koncentrációkat alkalmaznak, olyan konformáció változások jöhetnek létre, amelyek az aktivitás csökkenését idézhetik elő.

A glikozilhidrolázok 4. családjába sorolt enzimek gyakran igényelnek aktivitásukhoz mind NAD<sup>+</sup> koenzimet, mind valamilyen kétértékű fémiont (Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, vagy Ni<sup>2+</sup>) (Thompson et al., 1995).

*Vicia faba* (lóbab) eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim esetében kimutatták, hogy a K<sup>+</sup> ionoknak aktivátor szerepük van és nem helyettesíthetők Na<sup>+</sup> ionokkal, ugyanakkor az ammónium ionok jelenlétében is tapasztaltak csekély mértékű aktiválást (Pridham & Dey, 1974).

A hüvelyesekből (Dey & Pridham, 1972), a cukornádból származó (Chinen et al., 1981) és a fonalgomba eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek aktivitásának erőteljes gátlása idézhető elő ezüst és higany ionokkal, és bizonyos mértékű gátlást a réz ionok is okoznak (Suzuki et al., 1970; Ohtakara et al., 1984; Wong



et al., 1986; Zapater et al., 1990; Hashimoto et al., 1993). Az ezüst ionok által okozott gátlás a karboxil csoporttal illetve a hisztidinnel történő reakció következménye, míg a higany ionok a tiol csoportokkal reagálva eredményezik az enzimaktivitás gátlását (Church et al., 1980). A bakteriális eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek esetében a cink, a kobalt, a vas és a kadmium ionok jelenlétében is az aktivitás gátlását figyelték meg (Ulezlo & Zaprometova, 1982; Sakai et al., 1987).

A szulfhidril reagensek, mint például a p-klór-merkuribenzoát, az N-etil-maleinamid és a jódcetamid számos  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktivitását gátolják. E vegyületek az édesmandula  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének részleges inaktiválását okozzák (Dey, 1969). A p-klór-merkuribenzoát gátolja a *Lactobacillus fermentum* (Garro et al., 1993; Garro et al., 1996b), a *Bacillus stearothermophilus* (Pederson & Goodman, 1980) és a *Pycnopus cinnabarinus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim működését (Ohtakara et al., 1984). A szulfhidril reagensek ugyanakkor nem gátolják a *Bifidobacterium longum* (Garro et al., 1994), a *Mortierella vinacea* (Suzuki et al., 1970) és a *Vicia faba* (Dey & Pridham, 1969)  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeit. Ebből arra lehet következtetni, hogy nem mindegyik  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktivitásához szükséges a –SH csoportok jelenléte.

A fotooxidáció metilénkék jelenlétében inaktiválja az édesmandula (Dey, 1969) és a *Vicia faba* (Dey & Pridham, 1969) eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeket. Ilyen körülmények között a fotooxidáció a hisztidin molekulákra specifikus, azonban nem zárható ki a triptofán, a tirozin és a tiol-csoportok oxidációja sem.

Általában az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek aktivitását a p-nitro-fenil- $\alpha$ -galaktozid nagy koncentrációi gátolják, ezzel ellentétben a melibióz és a raffinóz nagy koncentrációinak nincs gátló hatása (Ulezlo & Zaprometova, 1982). A galaktóz általában erőteljesen gátolja a különböző szervezetekből származó  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek aktivitását (Brumer III et al., 1999; Savel'ev et al., 1996; Zeilinger et al., 1993; Civas et al., 1984a; Suzuki et al., 1970).

### 2.3.8 Néhány lektin tulajdonságú $\alpha$ -galaktozidáz

Az 1970-es évektől kezdődően a lektinek definíciójával, előfordulásával és tulajdonságaival számos közlemény foglalkozik (Sharon, 1974; Goldstein et al., 1980; Nomenclature Committee of the IUB, 1981; Kocourek & Hořejší, 1982; Rüdiger, 1997; van Damme et al., 1998a; van Damme et al., 1998b). Jelen ismereteink alapján Kocourek és Hořejší (1982) által javasolt általánosan elfogadott meghatározás szerint a lektinek nem immunológiai eredetű fehérjék vagy glikoproteinek, amelyek bizonyos szénhidrátok szelektív megkötésére képesek anélkül, hogy enzimesen bontanák azokat.

Olyan szénhidrátkötő fehérjék, amelyek agglutinálják a vörösvérsejteket, nagyon gyakoriak a növényi szövetekben. A hüvelyes magvak igen gazdagok lektinekben, amelyek szerkezeti homológiát mutatnak. Ez a tény fejlődéstörténeti rokonságukra utalhat. Néhány olyan hüvelyes eredetű enzimről is beszámol a szakirodalom, amelyek lektin tulajdonsággal is bírnak. Többek között a *Vigna radiata*  $\alpha$ -galaktozidáz tetramer enziméről kimutatták, hogy hemagglutinációs tulajdonságú és D-galaktóz specifitással rendelkezik (Campillo et al., 1981). Ez a 160 kDa molekulatömegű tetramer oldott formában pH=7-es vagy ennél magasabb pH-jú

körülmények között 40 kDa molekulatömegű monomerekre disszociál. Az alegységek asszociációja-disszociációja elsődlegesen pH függő reverzibilis folyamat. Mindegyik monomer egyetlen gyengén bázikus polipeptid láncból áll. A disszociáció az izoelektromos pont közelében történik, az aggregátum létrejöttében az elektrosztatikus erők játszhatnak szerepet. A szójabab eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz esetében, a tetramer szerkezetű fehérje monomerekké történő disszociációja a hemagglutinációs tulajdonság elvesztésével jár együtt (Harpaz et al., 1977). Ennek magyarázata az, hogy a monomerek már nem rendelkeznek több szénhidrát-kötő hellyel, ami elengedhetetlen feltétele az agglutináció létrejöttének. A tetramer és a monomer szerkezetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimformáknál a legfeltűnőbb különbség aktivitásaiknak pH függése. A disszociáció jelentős változást idéz elő az aktivitás pH optimumában, amely pH=7-ről pH=5,6-ra csökken. A kisebb molekulatömegű forma egyáltalán nem mutat aktivitást pH=7-en vagy ennél nagyobb pH-án, ugyanakkor a tetramer szerkezetű enzim még pH=5,5-ön vagy ennél alacsonyabb pH-kon sem veszíti el aktivitását. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy magas pH értékek mellett a fehérje teljes disszociációja megtörténik, míg alacsony pH értékek esetében sem megy végbe a teljes asszociáció.

A lóbab (*Vicia faba*) magjaiból izolált  $\alpha$ -galaktozidáz enzimnek mind monomer, mind tetramer formája ismert. Az  $\alpha$ -galaktozidáz I enzim tetramer szerkezetű (Ms: 160 kDa), amely azonos alegységekből épül fel. Mindkét szerkezeti forma rendelkezik glükóz/mannóz specifikitást mutató lektin aktivitással. Az  $\alpha$ -galaktozidáz I enzim tisztításánál alkalmazott eljárások, az affinitás kromatográfiás tanulmányok és a molekulatömegben tapasztalt különbségek alapján nem valószínű, hogy az enzimmészítmény két fehérje molekulából, egy  $\alpha$ -galaktozidázból és egy *Vicia faba* lektinből áll. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy mind az  $\alpha$ -galaktozidáz, mind a lektin aktivitás azonos fehérje molekula különböző helyein található (Dey et al., 1982).

*Pleurotus ostreatus* gombából izolált lektinnél is kimutattak  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást. Ezen aktivitásokat nem lehetett egymástól elválasztani sem nem-denaturáló elektroforézissel, sem affinitás kromatográfiával. A lektin szénhidrát-kötőhelye és az enzim szénhidrát bontó aktivitása azonban nem történhet a fehérje molekula azonos helyén, mivel

- a lektin aktivitás mind  $\alpha$ -, mind  $\beta$ -glikozidokon tapasztalható, míg az enzimaktivitás csak az  $\alpha$ -anomereken érvényesül,
- a vörösvérsejtekkel történő kölcsönhatás eredményeként stabil agglutináció jön létre és nem tapasztalható a flokkulum feloldódása
- az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást a galaktóz gátolja, míg a  $\beta$ -galaktozidok nem.

Ezért a lektin és az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásnak, vagy két szoros kapcsolatban lévő fehérje molekulán, vagy azonos molekulán kell elhelyezkednie (Brechtel et al., 2001).

## 2.4 MIKROBIÁLIS ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIMEK ELŐÁLLÍTÁSA

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimrel kapcsolatos kutatások előrehaladtával nyilvánvalóvá vált, hogy a növényekből történő kivonásnál lényegesen hatékonyabb enzim előállítási módszerek is léteznek. Ezek a mikroorganizmusok felhasználásával történő biotechnológiai eljárások. A mikroorganizmusok sokféleségének és változékonyságának köszönhetően igen speciális tulajdonságokkal rendelkező enzimmészítmények állíthatók elő, melyek az enzimek gyártásában iparilag is kiaknázhatók.

Az 1970-es évek elején végezték *Mortierella vinacea* fonalgombával az első  $\alpha$ -galaktozidáz előállítási kísérleteket (Suzuki et al., 1970). Ettől kezdve számos mikroorganizmust vizsgáltak meg, mint lehetséges enzimforrást.

### 2.4.1 Baktérium eredetű enzimek

A raffinóz, mint szelektív szénforrás alkalmazható a bifidobaktériumok detektálására és szaporítására, (Hartemink et al., 1996) ezért feltételezték, hogy jelentős mennyiségű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet termelnek.

Szójatejen szaporítva a *Bifidobacterium breve* 203 jelű törzset 24 órás tenyésztést követően  $2 \times 10^9$  sejt/ml koncentráció érhető el. Sakai és munkatársai (1987) a baktérium nyers extraktumából 330 kDa molmassájú homo-oktamer szerkezetű és  $pI=3,7$  izoelektromos ponttal rendelkező  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet tisztítottak.

Garro és munkatársai (1994) a logaritmikus növekedési fázis végén leválasztott *Bifidobacterium longum* sejttömeg mechanikai feltárását követően nyert sejt extraktum  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitását vizsgálták. Maximális  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást figyeltek meg 40-45 °C hőmérséklet tartományban pH=5,8-nál.

Leder és munkatársai (1999) *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 törzset  $\alpha$ -D-galaktozid tartalmú tápközegen anaerob körülmények között szaporítottak. A sejtekből az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet ultrahangos feltárással szabadították ki, majd ultraszűréssel, ammónium-szulfátos kicsapással, anioncserélő kromatográfiával és gélszűréssel tisztították. Elektroforetikusan tiszta készítményt elektroelúciót követően kaptak. Az így nyert enzim látszólagos molmassája gélszűréssel 344 kDa és SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel 79 kDa adódott, ennek alapján feltételezhető a tetramer szerkezet.

Garro és munkatársai közlemény sorozatban számoltak be a *Lactobacillus fermentum*  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésére vonatkozó tanulmányaikról. A szénhidrátok hatását vizsgálva megállapították, hogy a leghatékonyabb enzim induktornak a sztachióz bizonyult, ezt követte a melibióz, a raffinóz és csupán elenyésző aktivitást mértek glükózon. A galaktózon szaporított *L. fermentum* tenyészethez glükózt adagolva, az az  $\alpha$ -galaktozidáz szintézisének gátlását eredményezte. Ezzel ellentétes hatást figyeltek meg cAMP adagolás esetén, amely jelenség bizonyította, hogy ez a vegyület részt vesz az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézisének szabályozásában. Kísérleteikkel bizonyították, hogy az indukálható  $\alpha$ -galaktozidáz enzim

szintézise katabolit represszió alatt áll (Garro et al., 1996a). Az enzimsztítási protokoll első lépését a sejtfeltárás jelentette a sejtmentes nyers extraktum előállítására, majd ammónium-szulfátos fehérje kicsapás következett és végül kromatográfias eljárásokkal (gélszűrés-Sephadex G-200; ioncserélő kromatográfia-DEAE-Sepharose) homogenitásig tisztították az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet. A *L. fermentum* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz sajátos jellemzőket mutat, az enzim négy 45 kDa-os monomerből felépülő 194,5 kDa moltömegű fehérje molekula.

A *Bacteroides ovatus* törzsei guar eredetű galaktomannánon tenyésztve  $\alpha$ -galaktozidáz I enzimet termelnek, amely különbözik attól az  $\alpha$ -galaktozidáz II enzimtől, amelyet galaktóz, melibióz, raffinóz, illetve sztachióz növekedési szubsztátumon szintetizálnak.

Li és munkatársai (1997) a *Bacillus* sp. JF<sub>2</sub> törzs intracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésénél a legjobb enzim indukornak a melibiózt találták, de hatékony volt a raffinóz is. Kismértékű indukciót tapasztaltak abban az esetben, amikor galaktózt alkalmaztak egyedüli növekedési szubsztátumként. A szacharóz az  $\alpha$ -galaktozidáz termelés teljes gátlását okozta. Enzimtermelés szempontjából kedvezőbbnek találták a szerves nitrogénforrások alkalmazását. Ezek közül is a legjobb eredményeket a marhahús kivonat és a tripton alkalmazásával kapták. Az enzimtermelés szempontjából legkedvezőbb hőmérséklet az 55 °C.

*Bacillus stearothermophilus* AT-7 törzsét komplett tápközegen szaporítva, annak sejtmentes extraktumából két eltérő tulajdonságokkal rendelkező  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet tisztítottak. Mindkét enzim konstitutív módon szintetizálódott, de az  $\alpha$ -galaktozidáz II enzim termelése jelentősen elmaradt az  $\alpha$ -galaktozidáz I mennyiségétől. A két enzim határozottan eltérő elúciós tulajdonságot mutatott DEAE-cellulóz és hidroxipatit tölteteken. Mindkét enzimforma tetramer szerkezettel és hasonló molekulatömegeggyel rendelkezik. A szerzők több érvvel is alátámasztották, hogy a kisebb molekulatömegű  $\alpha$ -galaktozidáz I nem az  $\alpha$ -galaktozidáz II enzimből proteolízis eredményeként keletkezett műtermék (Pederson & Goodman, 1980).

Talbot és Sygusch (1990) arról számoltak be, hogy a termofil *Bacillus stearothermophilus* egyik törzse (ATCC 206) szentjánoskenyér eredetű galaktomannánon tenyésztve egy trimer szerkezettel rendelkező, 82 kDa monomerekből felépülő 247 kDa moltömegű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet termelt.

Talajból izolált *Pseudomonas fluorescens* H-601 jelzésű törzs melibióz tartalmú komplett tápközegen  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet választott ki a tenyészlébe. Az enzim 390 kDa molekulatömegű homotetramer. Az enzim jelentős transzferáz aktivitással és széles akceptor specifitással rendelkezik (Hashimoto et al., 1991).

Hipertermofil *Thermotoga neapolitana* 5068 jelzésű törzse hemicelluláz enzimkomplexet szintetizál. Ennek az egyik komponense az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim, amely a sejt extraktumban található. Ez az enzim 61 kDa-os monomer szerkezetével különbözik más bakteriális eredetű enzimektől. Az enzim maximális aktivitást pH=7,3-nál mutatott és hőmérséklet optimuma 100-103 °C tartományban volt. Az eddig vizsgált  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek közül ez rendelkezik a legnagyobb hőstabilitással, amely 85 °C-on 9 órás, 90 °C-on 2 órás és 100 °C-on három perces felezési idővel jellemezhető (McCutchen et al., 1996; Duffaud et al., 1997).

#### 2.4.2 Élesztőgomba eredetű enzimek

A *Candida guilliermondii* élesztőgomba melibióz tartalmú komplett tápközegen sejthez kötött, termostabilis  $\alpha$ -galaktozidázt termel. A gélkromatográfiával elválasztott két enzimet  $\alpha$ -galaktozidáz I-nek, illetve  $\alpha$ -galaktozidáz II-nek nevezték el. A homotetramer szerkezetű  $\alpha$ -galaktozidáz I és II izoelektromos pontjait 6,16 illetve 6,21-nek állapították meg. Mindkét enzim aktivitására nézve az optimális pH=4,5 és a hőmérséklet optimum 75 °C volt. A fémionok gátló hatásának vizsgálatakor eltérő eredményeket kaptak az  $\alpha$ -galaktozidáz I és II esetében. Az  $\alpha$ -galaktozidáz II több ionra érzékeny, mint az  $\alpha$ -galaktozidáz I.  $\text{AgNO}_3$  és  $\text{HgCl}_2$  jelenlétében mindkét enzim majdnem teljesen elvesztette aktivitását.  $\text{FeSO}_4$  és  $\text{CuSO}_4$  hatására a II enzim esetén jelentős aktivitáscsökkenés mutatkozott, míg az I enzim aktivitása nem csökkent. Az enzimek szubsztrátum specifikása azonosnak bizonyult (Hashimoto et al., 1993).

$\alpha$ -Galaktozidáz enzim előállítása céljából egy olyan *Saccharomyces carlsbergensis* törzset választottak, amely képes a melibiózt, mint egyedüli szénforrást hasznosítani és a galaktózt lassan metabolizálja, valamint auxotróf pantoténra, inozitra és piridoxinra. A fenti élesztőtörzset 1% galaktózzal és a szükséges kofaktorokkal kiegészített élesztő/nitrogén alaptápközegen tenyésztették. A *S. carlsbergensis*  $\alpha$ -galaktozidáza indukálható enzim, amely a sejtmembrán külső felületén lokalizálódik és a szaporodás előrehaladtával kiválasztódik a tenyészlébe. A sejtekben található  $\alpha$ -galaktozidáz enzim azonos tulajdonságokat mutat, mint a sejtmembránhoz kötött forma (Lazo et al., 1977). *S. carlsbergensis*  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének molekulatömege 300 kDa, amely 57 %-nyi szénhidrátot tartalmaz. A szénhidráttartalom túlnyomó többsége (90-95%) mannóz, ezenkívül mintegy 7 % glükózt és 1 % glükózamint tartalmaz. Az aminosav tartalomnak 35%-át a treonin, a szerin és az aszparaginsav teszi ki (Lazo et al., 1978).

Egy  $\beta$ -fruktofuranozidáz negatív *Candida javanica* törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelését vizsgálták ásványi sókat, melibiózt és raffinózt tartalmazó tápközegen. A kiválasztott  $\alpha$ -galaktozidáz enzim glikoproteinek bizonyult, míg a sejthez kötött enzim nem tartalmazott szénhidrátot (Cavazzoni et al., 1987). Eltérően más mikrobiális  $\alpha$ -galaktozidáz enzimektől az aktivitásnál nem tapasztaltak termékgátlást (McGhee et al., 1978). A galaktóz nem gátolta a *Candida javanica* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitását, ugyanakkor a glükóz jelenléte aktiváló hatást gyakorolt arra.

#### 2.4.3 Fonalasgomba eredetű enzimek

A fonalagombák sokfélesége és természetes élőhelyeik biztosítékai annak, hogy számos hidroláz enzimet, köztük karbohidrolázokat is szintetizálnak. Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeiknek mind intracelluláris, mind extracelluláris formája, valamint több enzim módosulata ismert.

Egy talajból izolált *Monascus* faj intracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésének optimalizálása során megállapították, hogy a galaktóz, a melibióz, a raffinóz és a sztachióz indukálja az enzim szintézisét, valamint az ammónium-nitrát megfelelő nitrogénforrás számukra (Imanaka et al., 1972). Wong munkatársaival

(1986) is hasonló eredményekre jutott, amikor száznégyszáz *Monascus* spp. törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelését vizsgálták. Megállapították továbbá, hogy a laktóz, amely az aszkomicetákban az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim induktora, nem hatékony a *Monascus* fajok esetében. Az intracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézisére kiválasztott *Monascus pilosus* törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének gélzsűrűséssel meghatározott molekula tömege 150 kDa.

Intracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást mutattak ki *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vr. gombában. Egy termofil gomba a *Penicillium duponti* ATCC 10518 törzsében egy intracelluláris, 500 kDa molekula tömegű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet detektáltak, amely hidrolizálja a raffinózt, a sztachiózt és a verbaszkózt. Az enzim különféle szubsztrátumokra vonatkoztatott pH optimuma nagyobb volt, mint más forrásokból származó enzimeké és még pH=12-nél is mutatott aktivitást (Arnaud et al., 1976). 38 különböző gombafaj törzseit szelektálták  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelés alapján. Kvalitatív vizsgálatok alapján csupán 5 törzs mutatott értékelhető aktivitást. *Penicillium janthinelum* NRRL 5576 jelzésű törzsnél  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésre nézve a galaktóz bizonyult a legjobb induktornak, majd ezt követte a melibióz. Maximális enzimtermelést tapasztaltak 4 napos 30 °C-on vezetett fermentációt követően, amikor a tápközeg pH-ját 5,0-re állították. Az enzimtermelésre jelentős hatással volt a levegőztetés mértéke (Foda et al., 1995). Raffinózon nevelt *Aspergillus tamarii* két intracelluláris, trimer szerkezetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet is szintetizált, amelyeknek molekulatömege  $265\pm 5$  kDa, illetve  $254\pm 5$  kDa és glikoprotein jellegűek (Civas et al., 1984a). Galaktomannanon tenyésztve az *Aspergillus tamarii* egy harmadik fajta, 56 kDa molekulatömeggel rendelkező monomer szerkezetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet választ ki a tenyészlebe (Civas et al., 1984b).

Számos közlemény foglalkozik búza- és rizskorpa alapú szilárd szubsztrátumú fermentációval megvalósított *Aspergillus* fajok –*Aspergillus niger* (Somari & Balogh, 1995), *Aspergillus awamori* (McGhee et al., 1978) és *Aspergillus oryzae* (Annunziato et al., 1986)– extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelésének leírásával. Az *Aspergillus oryzae* QM 6737 törzs, amely élelmiszer minőségű  $\alpha$ -galaktozidázt szintetizál, enzimtermelését növelte a tápközeg glükózzal, szacharózzal, illetve melibiózzal történő kiegészítése. A legjobb enzimtermelést szójaliszten, illetve szójadarán tapasztalták (Annunziato et al., 1986).

A poligalakturonát egy összetett szénhidrát, amelynek főlánc galakturonsav és ramnóz molekulákból épül fel és ehhez oldalláncként kapcsolódnak semleges cukrok, mint például galaktóz, arabinóz, és xilóz (Rombouts & Pilnik, 1980). A fonalgombák poligalakturonát lebontása során olyan oligoszacharid keverék jön létre, amely számos extracelluláris szacharolitikus enzim kiválasztását indukálhatja. Fonalgombák (*Aspergillus oryzae*, *Scopulariopsis* sp., *Penicillium brevicompactum*) és egy élesztőszerű gomba (*Aureobasidium pullulans*) poligalakturonát tartalmú tápközegen tenyésztve  $\alpha$ -glükózidáz és  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeket választ ki. Ezeket az extracelluláris enzimeket a gombák nem termelték cellobióz és melibióz szubsztrátumokon (McKay, 1991).

## 2.4.4 Heterológ enzimek termelése rekombináns mikroorganizmusokkal

### 2.4.4.1 Növényi eredetű enzimek termelése

A rekombináns DNS technológia kifejlesztése lehetővé tette, hogy különböző prokarióta és eukarióta gazdaszervezetekbe idegen eredetű géneket vigyenek be, ott kifejeztessék azokat és ily módon heterológ fehérjéket termeljenek. A *Cyamopsis tetragonobola* (guar)  $\alpha$ -galaktozidáz enzime ipari szempontból is kedvező tulajdonságú, mivel a guar eredetű galaktomannánokból galaktózt tesz szabaddá, miközben a keletkező galaktomannán gélképző tulajdonsága jelentősen megnövekedik (Critchley, 1987). Overbeeke és munkatársai (1990) elsőként számolnak be növényi eredetű (guar)  $\alpha$ -galaktozidáz *Bacillus* faj általi szintéziséről és kiválasztásáról. A termelt enzim nem volt glikoprotein, mint a növényi termék, de hasonló aktivitást mutatott (Overbeeke, 1995). Az exponenciális növekedési szakaszban elért enzimaktivitásban proteáz tevékenység okozta jelentős csökkenést tapasztaltak. *Lactococcus lactis* gazdaszervezet esetében nem tapasztalták a heterológ géntermékek proteolízis eredményeként létrejövő aktivitás csökkenését. Tekintve, hogy az *L. lactis* könnyen tenyészthető és kidolgozottak a genetikai módosításra alkalmas technikák Leenhouts és munkatársai (1995) ezt a mikrobát választották heterológ  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésére. Az enzim konstitutív módon szintetizálódott és nem degradálódott az állandósult növekedési fázis során. Az enzimtermelés elmaradt a kívánatos értéktől, amelynek magyarázata az alacsony biomassza hozam volt, ennek növelésére a folyamatos fermentációs technológiát javasolják.

Az élesztők eukarióta mikroorganizmusok lévén képesek a fehérjék glikolizálására és a biológiai aktivitásukhoz szükséges térszerkezet kialakítására, valamint a szintetizált fehérjék kiválasztására is, amely egyszerűsíti a termék kinyerését.

Hensing és munkatársai (1995) a *Kluyveromyces lactis* MSK110 (**a** *uraA trp1::URA3*) törzset (Stark & Milner, 1989) alkalmazták gazdaszervezetként. A törzset MIRY (Multiple Integration in Ribosomal DNA of Yeast) típusú plazmiddal transzformálták. A transzformáló plazmid *K. lactis* riboszómába integrálódó szekvenciát, *S. cerevisiae* GAL7 promoter és a *SUC2* (invertáz) szignál szekvenciákat, valamint a *C. tetragonoloba*  $\alpha$ -galaktozidáz génjének és a *PGK1* terminátor régiójának szekvenciáit tartalmazta. Egy *TRP1-d* marker gén szolgált a többszörös integrációs események követésére. Kemosztát tenyészetben teszteltek egy olyan *K. lactis* törzset, amely 15 kópiában tartalmazta az  $\alpha$ -galaktozidáz gént hordozó expressziós kazettát. Pepton tartalmú komplex tápközegen érték el a legkedvezőbb specifikus termékképződési sebességet, amely 2,3 mg  $\alpha$ -galaktozidáz / g biomassza szárazanyag \* óra értéknek adódott.

A *Hansenula polymorpha* egy olyan élesztő, amely metanol tartalmú ipari tápközegen nagy biomassza hozamokat biztosít. Egy homológ erős indukálható metanol-oxidáz promoter és egy *S. cerevisiae* eredetű invertáz szignál szekvencia beépítésével hozták létre az expressziós vektort. Az  $\alpha$ -galaktozidáz gén kifejeződése hatékonynak bizonyult. A létrehozott törzs termelékenysége tovább

fokozható a fermentációs eljárás optimalizálásával és hatékony technológia fejleszhető ki guar eredetű enzim fermentációs előállítására (Fellinger et al., 1991). Összehasonlító vizsgálatokat végeztek guar eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz gént hordozó *Saccharomyces cerevisiae* SU50B és *Hansenula polymorpha* 8/2 törzsek alkalmazásával. A tenyésztések különböző szénforrások és környezeti paraméterek mellett, folyamatos fermentációs technikával történtek. Több mint 500 órás tenyésztés során mindkét törzs genetikailag stabilnak bizonyult és nagy mennyiségű extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet termelt. Az expressziós rendszerek erős indukálható promotereket tartalmaztak. A SU50B törzsnél GAL7 promotert alkalmaztak, ahol az  $\alpha$ -galaktozidáz szintézis indukcióját korlátozta a kis mértékű galaktóz felvétel és még nagy hígítási sebességek mellett is jelentős glükóz gátlás lépett fel. A maximális expressziónál 28,6 mg extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelődött 1 g biomassza szárazanyagra vonatkoztatva. *H. polymorpha* törzs esetében a formaldehid nagyon hatékony induktornak bizonyult és metanol-oxidáz szintézis mellett 42 mg extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet választott ki 1 g biomassza szárazanyagra vonatkoztatva. Az elért produktivitások alapján *S. cerevisiae* SU50B törzsnél 3,25 és *H. polymorpha* törzsnél 5,5 mg  $\alpha$ -galaktozidáz/ g szárazanyag \* liter \* óra- a legjobb termelő törzsek közé sorolandók (Giuseppin et al., 1993).

#### **2.4.4.2 Baktérium eredetű enzimek termeltetése *E. coli* gazdában**

Sikeresen klónoztak és fejeztettek ki *E. coli* törzsekkel *Bacillus stearothermophilus* (Fridjonsson et al., 1999) és *Thermotoga neapolitana* (King et al., 1998) eredetű termostabilis  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet kódoló géneket. A nyers sejtextraktumban lévő egyéb enzimek 75-80 °C-on történő inaktiválását követően közvetlenül hasznosítható preparátum készíthető, illetve a sejtmentes extraktumból kinyerhető az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim.

A *Bifidobacterium adolescentis*  $\alpha$ -galaktozidáz enzime transzferáz aktivitással is rendelkezik, mely tulajdonság kiaknázzható oligoszacharidok bioszintézisének. A nagymennyiségű enzim előállításnál problémát jelent az, hogy a bifidobaktériumok szigorúan anaerob szervezetek, valamint alacsony szintű az enzimtermelésük. Ezért a bifidobaktérium eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet kódoló gént klónozták és kifejeztették *E. coli* gazdában. A rekombináns enzim hozama százszorosa volt az eredeti *B. adolescentis* hozamának.

## **2.5 AZ ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM BIOTECHNOLÓGIAI HASZNOSÍTHATÓSÁGA**

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek széles szubsztrátum specifikitásuknak köszönhetően, valamint annak, hogy több enzim közülük a hidrolitikus aktivitás mellett transzgalaktozilálási képességgel is rendelkezik, számos biokonverzióban alkalmazhatók.



### 2.5.1 Cukorgyártásnál a raffinóz tartalom csökkentése

A répacukorgyártásnál a raffinóz gátolja a szacharóz kikristályosítását, ezért az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim alkalmazása hasznos lehet a cukorhozam növelésénél. Linden (1982) *Mortierella vinacea* pelletben található  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmel hidrolizálta a cukorszirupban lévő raffinózt, ezáltal növelve annak szacharóz tartalmát. A folyamat hatékonyabbá tehető immobilizált enzimeket alkalmazó folyamatos technológiával. *Pynoporus cinnabarius* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet rögzítettek keresztkötött kitozán gyöngyökön és 50 °C-on folytonos rendszerben 30 napon keresztül alkalmazták melaszban lévő raffinóz hidrolízisére, melynek során annak 85 %-át bontották el (Mitsutomi et al., 1985, Ohtakara & Mitsutomi, 1987). A Hokkaido Sugar Co. (Tokió, Japán) cég a cukorfinomítás során a raffinóz hidrolízisére kereskedelmi forgalomban kapható Mellibia D® *Mortierella vinacea* micéliumot tartalmazó készítményt alkalmaz.

### 2.5.2 Növényi eredetű $\alpha$ -galakto-oligoszacharidok hidrolízise

A szacharóz  $\alpha$ -D-galaktozidjai számos növényben megtalálhatók, mint tartaléktápanyagok. Különösen nagy mennyiségben raktározódnak a hüvelyesek magjaiban. A galakto-oligoszacharidok nem bomlanak le az egygyomrú szervezetek vékonybelében, de a vastagbélben növekedési szubsztrátumként szolgálnak az ott honos mikroorganizmusoknak. Az enterobaktériumok gázképződés közben hasznosítják azokat, ezáltal flatulenciát okozva (Price et al., 1988). A flatulenciát gyakran kísérik egyéb kellemetlen tünetek, mint fejfájás, szédülés és emésztési zavarok. A hüvelyesek e tulajdonsága korlátozza széleskörű felhasználásukat a táplálkozásban (Castillo et al., 1990). A galakto-oligoszacharidok szintjének csökkentésével a fent említett problémák kiküszöbölhetők és javítható e nyersanyagok tápértéke. Mikrobiális eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek alkalmazhatók a hüvelyesek raffinóz családban tartozó galakto-oligoszacharidjainak a hidrolízisére (Mulimani & Ramalingam, 1997; Somiari & Balogh, 1992; McGhee et al., 1978).

A szóját egyre növekvő mennyiségben alkalmazzák, mint olcsó és jó minőségű fehérje kiegészítést az élelmiszerekben és takarmányokban. A szójatej alkalmazható a tehéntej, illetve az anyatej kiváltására olyan csecsemők és felnőttek étrendjében, akik allergiásak a tehéntejre, illetve súlyos laktáz hiányban szenvednek. A gomba eredetű és ezek közül az *Aspergillus oryzae* által termelt  $\alpha$ -galaktozidáz enzim is alkalmasnak bizonyult a szójatej, flatulencia faktorként is ismert, galakto-oligoszacharidjainak lebontására (Cruz et al., 1981; Cruz & Park, 1982). Thananunkul munkatársaival (1976) olyan technológiákat fejlesztett ki, amelyekben a szója galakto-oligoszacharidok lebontására *M. vinacea* eredetű rögzített  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet alkalmaztak fluidizációs reaktorban. Kereskedelmi forgalomban lévő  $\alpha$ -galaktozidázt is tartalmazó enzimmészítményeket teszteltek, mint lehetséges takarmány kiegészítőket baromfitápok beltartalmi értékének növelésére. Megállapították, hogy további módosítások szükségesek a célnak megfelelő speciális készítmények kifejlesztésére (Slominski, 1994).

Porter és munkatársai (1990) egy integrált kinetikai megközelítést dolgoztak ki a galakto-oligoszacharidok hidrolízisének követésére. A módszer alkalmas lehet a mikrobiális  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek értékelésére a hüvelyesekben található galakto-oligoszacharidok konverziójának meghatározásával.

Az élelmiszeriparban galaktomannánokat is alkalmaznak állományjavítóként. A szentjánoskenyér eredetű termék kedvezőbb reológiai tulajdonságokat mutat, mint a jóval olcsóbb és nagyobb galaktóz tartalmú guar gumi, azonban az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmal történő módosítást követően előállított 22-24 % galaktóz tartalmú termék ugyanolyan reológiai és stabilizálási tulajdonságokat mutatott, mint a szentjánoskenyér gumi. Ez a felismerés új biotechnológiai eljárás kidolgozását alapozhatja meg a guar gumi technofunkcionális tulajdonságainak javítására (Bulpin et al., 1990).

Számos  $\alpha$ -galaktozidáz enzim képes a B vörösvérsejtek O vércsoportúvá konvertálására (Harpaz et al., 1977; Goldstein et al., 1982; Goldstein, 1989). Ez a tulajdonság felhasználható a gyógyításban, az univerzálisan alkalmazható O típusú vérhiány kielégítésére, a feleslegben lévő B típusú vérmennyiség hasznosításával.  $\alpha$ -Galaktozidázos hidrolízissel a B típusú vércsoportra jellemző B antigén a O típusú vércsoportra jellemző H antigénné alakítható (Ginsburg, 1972). Klinikai tanulmányok bizonyítják, hogy az enzimesen konvertált O típusú vörösvérsejtek biztonságosan és hatékonyan alkalmazhatók a transzfúziós gyakorlatban (Lenny et al., 1994).

### 2.5.3 Transzgalakto-oligoszacharidok szintézise

Az élelmiszergyártásban az egyszerű oligoszacharidokat, mint a frukto-, a malto-, a galakto- és a xilooligoszacharidokat bifidofaktorként alkalmazzák (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001). A komplex oligoszacharidok, mint versengő receptorok meggátolják a patogének bélhámsejtjeihez történő kötődését. Az oligoszacharidok helyspecifikus szintézise kémiai reakciókkal is megvalósítható, de ezek többlépcsős, bonyolult reakciósorozatot igényelnek. Az enzim katalizált reakciók versenyképes alternatívát jelentenek az oligoszacharidok szintézisének, mivel a glikozidázok a glikozidos kötések nemcsak reverz reakció által, hanem transzferáz aktivitásuk révén is létrehozzák. Stabilitásuknak, olcsóságuknak és nagy sztereospecifitásuknak köszönhetően ezeknek az enzimek az alkalmazása igen ígéretes (Nilsson, 1987). A transzglykozilálási reakciókban leggyakrabban alkalmazott nagy hatékonyságú, régiószelektív  $\alpha$ -galaktozidáz enzim a kávébabból származik (Koizumi et al., 1995; Spangenberg et al., 2002). Egyre több mikroba eredetű enzimekről bizonyították, hogy transzferáz aktivitással is rendelkeznek (van Laere et al., 1999; Spangenberg et al., 2000). Ezek közül is a gombák: *Pynoporus cinnabarinus* (Mitsutomi & Ohtakara, 1988), *Mortierella vinacea* (Kaneko et al., 1990), *Candida guilliermondii* (Hashimoto et al., 1993; Hashimoto et al., 1995), *Trichoderma reesei* (Savel'ev et al., 1996), *Penicillium multicolor* (Scigelova et al., 1999), *Aspergillus niger* (Scigelova & Crout, 2000)  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeik tarthatnak számot széleskörű alkalmazásra.

A ciklodextrinek és az oldalláncot tartalmazó ciklodextrinszármazékok glükózból felépülő homogén oligoszacharidok, amelyek alkalmasak a bomlékony vegyületek stabilizálására, illókomponensek megkötésére

és viszkózus, illetve olajszerű anyagok porszerűvé tételére. Új típusú heterogén ciklodextrinek létrehozásához kávébab és *Mortierella vinacea* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimekkel sikeresen galaktoziláltak ciklodextrineket. A kávébab eredetű enzim a ciklodextrin gyűrűbe is beépítette a galaktózt, míg a *M. vinacea* csupán az oldallánc galaktozilálására volt képes (Hara et al., 1994).

Az utóbbi idők kutatásai bizonyították, hogy a sertés eredetű szervek a legjobbak a xenotranszplantációra. A legnagyobb probléma a sertés-ember transzplantáció esetén a rendkívül gyors, humán antitestek által közvetített hiperkritikus kilökődési folyamat. Kimutatták, hogy ezek a humán anti-Gal antitestek megköthetők és semlegesíthetők  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNacp triszachariddal. *Penicillium multicolor* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim transzferáz aktivitása nagyon specifikus  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) kötés kialakításra, amely a xenotranszplantációknál jelentős előre lépést jelenthet (Singh et al., 1999).

### 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 A KÍSÉRLETEKBEN ALKALMAZOTT MIKROBIOLÓGIAI ELJÁRÁSOK

##### 3.1.1 Az alkalmazott *Thermomyces lanuginosus* törzsek

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállítására a fermentációknál enzimmorrásként az alábbi, különböző törzsgyűjteményekből származó, *Thermomyces lanuginosus* fonalagomba törzseket alkalmaztam: ATCC (American Type Culture Collections) 16455, ATCC 28083, ATCC 34626, ATCC 36350, ATCC 44008, ATCC 46882, ATCC 84400, CBS (Centraalbureau voor Schimmelculture) 218.34, CBS 224.63, CBS 288.54, CBS 395.62a, CBS 395.62b, DSM (Deutsche Sammlung Microorganismen und Zellkulturen GmbH) 5826, IMI (International Mycological Institute) 096218, IMI 110803, IMI 131010, IMI 140524.

##### 3.1.2 Tápközegek összetételei

###### **A fenntartáshoz alkalmazott tápközeg**

ATCC 336 (ATCC, 1984)

Burgonya-glükóz-agar (PDA, Potato Dextrose Agar)

Burgonya	500 g
Glükóz	20 g
Agar-agar	15 g
Desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve
pH	6,6

###### **Inokulum tápközeg**

Glükóz-aszparagin tápleves (Hassum et al., 1991)

Glükóz	20 g
L-aszparagin	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Vogel-féle nyomelem oldat	1 ml
Desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve

Vogel-féle nyomelem oldat (Vogel, 1964):

Citromsav. H <sub>2</sub> O	5 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,25 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (anhidrid)	0,05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Desztillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve.

### **Fermentációs tápközeg**

A szén- és a nitrogénforrás nélküli alapösszetevők

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Vogel-féle nyomelem oldat	1 ml
Deszillált vízzel	1000 ml-re kiegészítve

A kísérletek során alkalmazott szén- és nitrogénforrásokat és azoknak mennyiségeit a KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK részben fogom ismertetni.

### **Korpakivonatok készítése**

100 g búzakupát 1000 ml deszillált vízben 30 percig forraltam, majd leszűrtem (K<sub>E</sub>) és az így nyert extraktumot 2000 ml-re (K<sub>2</sub>), illetve 1000 ml-re egészítettem ki (K<sub>1</sub>).

### **Optimalizált tápközeg az enzim előállításához**

#### Szacharózos tápközeg (F1)

Szacharóz	30 g
Ammónium-acetát	9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1 g
Vogel-féle nyomelem oldat	1 ml
Mcllvaine puffer (pH=7,5)-ral	1000 ml-re kiegészítve

#### Galaktomannános tápközeg (F2)

Locust bean gum (SIGMA)	10 g
Élesztőkivonat	15 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,1 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3 g
CaCl <sub>2</sub>	0,23 g
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g
Mcllvaine puffer (pH=7,5)-ral	1000 ml-re kiegészítve

### **3.1.3 Tenyésztési módszerek**

#### **3.1.3.1 Törzsfenntartás**

Mivel a törzsek csak kb. 6 hónapig tárolhatók ferde agaros (PDA) kémcsótenyészetben, ezért időközönként átoltásuk szükséges. A törzs spórás tenyészetéből steril szikével kb. 0,25 cm<sup>2</sup> agardarabot helyeztem a Petri csészében lévő steril tápagar felületére, majd 50 °C-on 10 napig inkubáltam. A spórás tenyészeteket 4 °C-on hűtőszekrényben tároltam felhasználásig.

#### **3.1.3.2 Inokulum tenyészetek készítése**

A bespórázott tenyészetekből szikével kivágtam egy 0,25 cm<sup>2</sup> felületű agardarabot és 7 ml steril 0,1 % Triton X-100 oldatot tartalmazó kémcsőbe helyeztem. Intenzív rázással biztosítottam a konidiumok

leemosását. Ezt követően 4 ml konidium-szuszpenzióval oltottam be az 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban lévő 150 ml steril glükóz-aszparagin táptalajt (pH=7,0). A tenyésztés Gallenkamp rázógépből 47°C-on és 220 fordulat/perc sebességen, 24-48 órán át történt.

### 3.1.3.3 *Enzimfermentációs kísérletek kivitelezése*

Az enzimfermentációkat rázatott lombikos technikával 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban 150 ml tápközegekben valósítottam meg. A fermentációkat meghatározott mennyiségű és korú inokulum tenyészettel indítottam. A fermentáció 47 °C-on, 220 fordulat/perc rázás mellett, 7-10 napig történt. A fermentációs folyamatot naponkénti mintavételezéssel és enzimaktivitás meghatározással követtem.

## 3.2 ALKALMAZOTT PUFFEREK ÉS REAGENSEK

A puffereket Rauert (1964) által szerkesztett kézikönyvben megadott receptek alapján készítettem. A felhasznált került törzsoldatok összetételeit az alábbiakban adom meg.

### **Mcllvaine puffer (citrát-foszfát puffer)**

0,1 M citromsav (21,008 g citromsav-monohidrát, 1000 ml desztillált vízben oldva)

0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfát (71,66 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1000 ml desztillált vízben oldva)

### **Glicin/HCl puffer**

A-oldat: (0,1 M glicin (7,505 g/l) + 0,1 M NaCl (5,85 g/l))-törzsoldat

B-oldat: 0,1 N HCl-törzsoldat

### **TRIS/HCl puffer:**

0,2 M TRIS-törzsoldat (24,2 g/l)

0,1 N HCl-törzsoldat

## **Reagensek**

### ***FOLIN reagensek***

FOLIN 1: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1M NaOH-oldatban oldva

FOLIN 2a: 1%-os  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

FOLIN 2b: 2%-os KNa-tartarát

FOLIN 3: 50 ml FOLIN 1 + 0,5 ml FOLIN 2a + 0,5 ml FOLIN 2b

FOLIN 4: Kétszeresére hígított gyári FOLIN CIOCALTEUS fenol reagens (MERCK)

### ***Biuret reagens***

0,8 g NaOH-ot 100 ml kiforralt desztillált vízben oldottam, majd 2,25 g KNa-tartarátot, 0,75 g  $\text{CuSO}_4$ -ot és 1,25 g KI-ot oldottam benne. A vegyületek feloldódása után 250 ml-re állítottam be a térfogatot.

## Nelson reagens

100 g ammónium-molibdenátot 1800 ml desztillált vízben feloldottam, hozzáadtam 84 ml tömény kénsavat és 12 g dinátrium-hidrogén-arsenátot, melyet előzőleg 100 ml desztillált vízben feloldottam. Az oldatot 24-48 órán keresztül barna üvegben 37 °C-on, ezt követően szobahőmérsékleten tároltam.

## 3.3 ANALITIKAI MÓDSZEREK

### 3.3.1 $\alpha$ -Galaktozidáz aktivitás meghatározása

A 0,3 ml McIlvaine pufferből (pH=4,2) és 0,5 ml 15 mM-os szubsztrátumból (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid) álló elegyet 5 percig 58 °C-on, illetve a vizsgálat hőmérsékletén előinkubáltam, majd ezután a megfelelően hígított mintából 0,2 ml-t adtam hozzá. Az enzimelekciót 5 perc elteltével 5 ml 0,1 M-os nátrium-karbonát oldat adagolásával leállítottam. A felszabadult p-nitro-fenol mennyiségét 405 nm-en fotometriásan határoztam meg. Egy egységnyi  $\alpha$ -galaktozidáz (NE) az az enzimmennyiség, mely 1  $\mu$ mol p-nitro-fenolt szabadít fel percenként az enzimelekció körülményei (pH=4,2 és T=58 °C) között.

### 3.3.2 Fehérje meghatározási módszerek

#### 3.3.2.1 Lowry módszer

0,5 ml mintához 4 ml FOLIN 3 reagenst adtam. 10 perc várakozás után 0,5 ml FOLIN 4-et mértem be, majd azonnal jól összekevertem és 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Ezt követően 750 nm-en megmértem az abszorbanciát. A fehérjekoncentrációt marha szérumalbumin felhasználásával készített kalibrációs egyenes segítségével határoztam meg. A módszer 2-100  $\mu$ g fehérjekoncentráció tartományban alkalmazható megbízhatóan.

#### 3.3.2.2 Módosított Lowry módszer

A módosított Lowry módszerhez a „Protein Assay Kit”-et (Sigma Kat. No.: P-5656) használtam. A mintához 1 ml Lowry reagenst adtam, majd összekevertem és 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. 0,5 ml FOLIN CIOCALTEUS fenol reagens hozzáadása után ismét jól összekevertem és 30 percig állni hagytam, hogy a színreakció kialakuljon. Az abszorbancia értékeket 750 nm-en határoztam meg. A fehérjetartalom kiszámítása standard görbe segítségével történt.

#### 3.3.2.3 Biuret módszer

3 ml reagenshez 0,3 ml mintát adtam, majd a reakcióelegyet 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Az abszorbanciát 550 nm-en olvastam le. A fehérjekoncentrációt marha szérumalbuminnal készített standard egyenes segítségével határoztam meg. A Biuret módszer méréstartománya 0,5-5 mg/ml fehérjekoncentráció.

### **3.3.2.4 280 nm-en történő fényelnyelésen alapuló módszer**

A 280 nm-en történő fehérjekoncentráció meghatározást alkalmaztam a fehérjefrakciók elválasztása során abban az esetben, amikor nem a pontos fehérjekoncentrációt akartam megtudni, hanem az egyes frakciók helyét és hozzávetőleges mennyiségét. A szeparációs technikánál már nem kell tartani nukleinsavak vagy kofaktorok zavaró jelenlététől sem.

### **3.3.3 Redukálócukor meghatározása**

#### **3.3.3.1 Somogyi-Nelson módszer**

2 ml megfelelően hígított mintához 2 ml Somogyi reagenst adtam, majd az elegyet 15 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem. A reakcióelegy lehűlése után hozzáadtam 2 ml Nelson reagenst és jól megkevertem, végül hozzáadtam 4 ml desztillált vizet. A kapott reakcióelegy abszorbanciáját 520 nm-en mértem és standard egyenes segítségével határoztam meg a mintában lévő redukálócukor tartalmát (Somogyi 1945; Somogyi 1952; Nelson 1944).

#### **3.3.3.2 Réz-bicinkoninát módszer**

A Waffenschmidt és Jaenicke (1987), valamint Fox és Robyt (1991) szerzők által leírt módszert alkalmaztam kisebb módosításokkal. Két törzsoldatot (A és B) készítettem. Az A oldat 150 mg 4,4'-dikarboxil-2,2'-bikinolin 100 ml desztillált vízben oldva. A teljes feloldódás után hozzáadtam 7,16 g vízmentes nátrium-karbonátot majd 115 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel. A B oldat készítésénél 3,5 g L-aszparaginsavat és 1,09 g réz-szulfátot 140 ml desztillált vízben oldottam fel. Utána hozzáadtam 5 g nátrium-karbonátot és végül 150 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel. A mérőreagens 23 ml A, 1 ml B oldatot és 6 ml 96 (v/v) % etanol tartalmaz, amelyet mindig a felhasználása előtt 2 órával kell készíteni és sötét üvegben tárolandó.

40 µl meghatározandó mintát pipettáztam a mikrolemez mintatartójába és hozzáadtam 160 µl mérőreagenst. A lemezt lefedtem és 80 °C-on 30 percig termosztáltam. A szobahőmérsékletre hűtött minták abszorbanciáit 540 nm-en a BioRAD 550 típusú mikrotiterlemez leolvasóval mértem. A minta redukálócukor tartalmát a standard egyenes segítségével határoztam meg.

### **3.3.4 Szénhidrátok mennyiségi és minőségi összetételének meghatározása**

Az enzimalkalmazási kísérletek során a szénhidrátok mennyiségi meghatározásához az alábbi jellemzőkkel leírható HPLC (High Performance Liquid Chromatography) technikát alkalmaztam.

Készülék:           pumpa: Waters 600  
                          detektor: Refraktív index  
                          integrátor program: Millenium 2.0 for Windows  
Oszlop: Supercol Carbohydrate Column C-610  
Mozgófázis: víz



Áramlási sebesség: 0,5 ml/perc

Minta térfogat: 20  $\mu$ l

Oszlop hőmérséklet: 80 °C

Detektor hőmérséklet: 44 °C

Az injektálás előtt a minták tisztítására 0,45  $\mu$ m pórus átmérőjű membránon történő szűrést alkalmaztam. Az egyes komponensek mennyiségi meghatározását a csúcs alatti területek alapján és standard egyenesek segítségével végeztem.

### **3.3.5 Galaktóz koncentráció meghatározása**

Az  $\alpha$ -D-galaktóz mennyiségének meghatározásához a Roche cég (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) által gyártott diagnosztikai készletet használtam. A módszer kivitelezése a gyártó által megadott útmutató szerint történt.

## **3.4 FEHÉRJE TISZTÍTÁSI MÓDSZEREK**

### **3.4.1 Fehérje kicsapás**

A fermentlében levő fehérjék kicsapására ammónium-szulfátot illetve izo-propanolt használtam. A lehűtött fermentléhez folyamatos keverés mellett adagoltam a kicsapószert, majd egy éjszakán át hűtőben állni hagytam, hogy a csapadék kiválás teljessé váljon.

A csapadékot centrifugálással (10 perc, 2 °C, 10000 rpm) összegyűjtöttem, majd a fehérjét minimális mennyiségű 20 mM-os Mcllvaine pufferben (pH=5,6) oldottam vissza. A fel nem oldódott maradékot centrifugálással (10 perc, 2 °C, 10000 rpm) távolítottam el.

### **3.4.2 Ultraszűrés**

A fehérjék koncentrálására, tisztítására és sóatlanítására ultraszűrést alkalmaztam. A fehérjetisztítási lépéseknél 10 kDa vágási értékű Amicon ultraszűrőt használtam. A fehérjeoldatot felülről 3 bar túlnyomás biztosítása mellett vittem a membránra. Az ultraszűrés 0 °C-on történt.

### **3.4.3 Kromatográfias módszerek**

Minden tisztítási lépés 4 °C-on történt, FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) berendezéshez (Pharmacia, Uppsala, Sweeden) csatlakoztatott különböző töltetű oszlopokon.

## **Alkalmazott töltetek** (Pharmacia, Uppsala, Sweden)

### Ioncserélők

#### DEAE Sepharose

gyenge anion-cserélő  
összes ionkapacitás: 0,11-0,16 mmol/ml gél  
maximális lineáris térfogatáram: 750 cm/h (25 °C, 100 kPa)  
pH stabilitás: 3-12

#### Q Sepharose

kvaterner amin erős anion-cserélő  
összes ionkapacitás: 0,18-0,25 mmol/ml gél  
mátrix típusa: 6 % keresztkötésű agaróz  
maximális lineáris térfogatáram: 750 cm/h  
pH stabilitás: 2-12

### Molekulaszűrők

#### Sepharose CL-6B

mátrix típusa: 6 % agaróz  
optimális molekulatömeg elválasztási tartomány:  $10^3$ - $4 \cdot 10^6$   
ajánlott lineáris térfogatáram: 30 cm/h  
pH stabilitás: 3-13

#### Superose 12

optimális molekulatömeg elválasztási tartomány:  $1000$ - $3 \cdot 10^5$   
mátrix típusa: keresztkötésű agaróz  
maximális térfogatáram: 1 ml/perc  
pH stabilitás: 3-12

### Hidrofób kölcsönhatású töltet

#### Phenyl Sepharose

Mátrix típusa: 6 % térhálósított agaróz  
Maximális térfogatáram: 3-4 ml/perc  
Maximális nyomás: 3 bar  
Kapacitás: 40  $\mu$ mol fehérje/ml gél  
pH stabilitás: 3-13

## **3.5 AZ ENZIM JELLEMZÉSÉNÉL ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

### **3.5.1 Elektroforetikus módszerek**

Gélelektroforézist Laemmli (1970) módszere alapján végeztem.

#### Az alsógél (7,5%) összetevői:

30 % akrilamid – 10 % bis-akrilamid-oldat	2,50 ml
10 % SDS (nátrium-dodecil-szulfát) oldat	0,10 ml
1,5 M TRIS puffer (pH=8,8)	2,50 ml
deszillált víz	4,79 ml
10 % APS (ammónium-perszulfát) oldat	0,10 ml
TEMED (N,N,N,N'-tetrametil-etilén-diamin oldat)	0,01 ml

Az alsógél feltöltése után a gélfelületre izo-butil-alkoholt rétegeztem. A művelet célja az volt, hogy a poliakrilamid gél felületét egyenletesre formázza, és elzárja a gélt a levegőtől. A gél kb. 60 perc alatt dermedt meg, ekkor az alkoholt leöntöttem róla, és az alsógélre rétegeztem a gyűjtőgél. A gyűjtőgél is hagytam megdermedni.

A gyűjtőgél (4,1 %) összetevői:

30 % akrilamid – 10 % bis-akrilamid-oldat	0,66 ml
10 % SDS	0,05 ml
0,5 M TRIS puffer (pH=6,8)	1,25 ml
desztillált víz	2,98 ml
10 % APS oldat	0,05 ml
TEMED oldat	0,01 ml

A mintákból kis mennyiséget Eppendorf csőbe tettem, majd liofilizáltam. Az így előkészített mintákat kis mennyiségű mintakezelő pufferben feloldottam, majd 5 percig 95 °C-on vízfürdőben tartottam.

Mintakezelő törzsoldat összetétele:

Desztillált víz	4,8 ml
0,5 M TRIS-HCl puffer (pH=6,8)	1,2 ml
glicerin	1,0 ml
10%(m/v) SDS oldat	2,0 ml
0,1%(m/v) brómfenolkék	0,5 ml

Mintakezelő puffer:

mintakezelő törzsoldat	475 µl
β-merkaptóetanol	25 µl

Ezután a megszilárdult, fésűvel készített gél zsebeit feltöltöttem a futtatni kívánt mintával és a fehérjekeveréket tartalmazó standarddal, majd futtató pufferbe (3,03 g TRIS + 14,4 g glicin +1g SDS, 1 liter desztillált vízben oldva) helyeztem. A futtatás 20 mA állandó áramerősség mellett történt.

A fehérje keveréket tartalmazó standard előkészítése:

A standardot 1:20 arányban hígítottam a mintakezelő pufferral, majd 5 percig 95°C-on melegítettem. Utána lehűtöttem és 10 µl mennyiséget vittem fel a géltre.

A molekula markerekben (BioRad, Pharmacia) lévő kalibráló fehérjék:

miozin	200 kDa
β-galaktozidáz	116 kDa
foszforiláz B	97 kDa
marha szérum albumin	66 kDa
ovalbumin	45 kDa
karbon-anhidráz	31 kDa
lizozim	14 kDa

A futtatás után a gélt 20%-os TCA (triklór-ecetsav) oldatban 10 percig fixáltam. Utána többször átmostam 96 % etanol : 96 % ecetsav : desztillált víz = 40:10:50 arányú keverékével. A mosás után a fehérjék festésére 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R 250-et használtam.

### 3.5.2 Glikoprotein jelleg vizsgálata

A 280  $\mu$ l térfogban oldott 440  $\mu$ g tiszta enzimmészítményt és 120  $\mu$ l trikloroecetsavat tartalmazó reakcióelegyet 100 °C-on 4 órán át inkubáltam. A szobahőmérsékletű reakció keveréket vákuum evaporátorban szárazra pároltam. A pelletet desztillált vízzel háromszor átmostam a szénhidrát analízis előtt. A csapadékot 100  $\mu$ l HPLC minőségű vízzel oldottam fel. A cukrok mennyiségi meghatározása redukálócukor tartalom alapján és nagynyomású anion cserélő kromatográfiával (HPAEC) történt. A szénhidrátok elválasztására CarboPack 10 (5 mm x 250 mm) oszlop szolgált, amely amperometriás detektorhoz kapcsolódott (PAD) (DIONEX rendszer) és az eluáláshoz 0,1 N nátrium-hidroxidot használtam.

### 3.5.3 Az enzim deglikozilálása

2 mg enzimfehérjét 200  $\mu$ l vízben oldottam fel, az oldhatatlan részeket centrifugálással távolítottam el. 20  $\mu$ l 1% nátrium-dodecil-szulfátot, 0,5 M  $\beta$ -merkaptotetanolt és 0,1 M EDTA-t tartalmazó mintához 200 mM nátrium-foszfátban (pH=8,5) + TritonX100 (Jackson, 1994) oldott 1 egységnyi N-glikozidáz F vagy N-glikozidáz H enzimet adtam. A kezelés 37 °C-on 17 órán át történt.

### 3.5.4 A hőmérséklet és a pH hatása az enzimstabilitásra

A tisztított  $\alpha$ -galaktozidáz enzim stabilitását vizsgáltam különböző pH értéknél és különböző hőmérsékleten. A McIlvaine puffereket pH=3 és pH=7,8, valamint a TRIS/HCL puffereket pH=7,2 és pH=9 közötti tartományban alkalmaztam. Az enzimet 30 °C és 70 °C közötti hőmérsékleteken inkubáltam a különböző pH értékű pufferben. Meghatározott időközönként mintákat vettem és standard körülmények között megmértem az enzimaktivitásukat.

### 3.5.5 Ionok hatása az enzimaktivásra

Az ionok  $\alpha$ -galaktozidázra gyakorolt hatását enzimaktivitás méréssel vizsgáltam 65 °C-on 50 mM McIlvaine pufferben (pH=5,5) 5 perces reakcióidő alkalmazásával. A méréshez 10 mM-os oldatokat készítettem McIlvaine pufferben (pH=5,5) a következő vegyületek felhasználásával:  $MnSO_4$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , KCl,  $AgNO_3$ ,  $CuSO_4$ ,  $HgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ .

## 3.6 KINETIKAI PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA

A *T. lanuginosus* CBS 395.62b eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim kinetikai paramétereit p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid, raffinóz és sztachióz szubsztrátumokon határoztam meg. A különböző koncentrációjú

szubsztrátum oldatok pH=4,2 Mcllvaine pufferral készültek és az enzimreakciókat 55 °C-on hajtottam végre. Para-nitrofenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid szubsztrátum esetében 0,1 NE (55 ng fehérje) enzimet alkalmaztam és a felszabaduló p-nitrofenol mennyiségét hasonlóan határoztam meg, mint az aktivitás méréseknél. A raffinóz és a sztachióz esetében 0,15 NE (82,5 ng fehérje) enzimet használtam és a hidrolízis folyamatát redukálócukor tartalom meghatározásával követtem. Az adatok kiértékelése Hanes-Woolf (Segel, 1975) módszerével történt

az alábbi egyenlet alapján:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{\max}} [S] + \frac{K_M}{V_{\max}}$$

### 3.7 KÍSÉRLETTERVEZÉS

A tápközeg összetétel meghatározásánál a kísérletes optimalizásra ortogonális elrendezésű kétszintű faktoriális terveket készítettem.  $2^p$  típusú teljes faktoriális kísérleteket valósítottam meg, ahol „p” a vizsgálatba bevont faktorok számát, azaz az optimalizálandó paramétereket jelenti. Mind mennyiségi, mind minőségi faktorok hatásai vizsgálhatók. Mindegyik faktort két szinten vizsgáljuk. Legyen a j-edik faktor  $z_j$  és a vizsgálati szintek  $z_j^{\min}$  és  $z_j^{\max}$ , akkor az adott paraméter alapszintje ( $z_j^0$ ) és variációs intervalluma ( $\Delta z_j$ ) az alábbiak szerint definiálható:

$$z_j^0 = \frac{z_j^{\max} + z_j^{\min}}{2}, \quad \Delta z_j = \frac{z_j^{\max} - z_j^{\min}}{2}$$

A számítások egyszerűsítésére a faktorokat a következőképpen célszerű transzformálni:  $x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j}$ .

A táptalaj optimalizációs kísérletek értékelésére modellt állítottam fel. A paraméterek meghatározásához többváltozós lineáris regressziót alkalmaztam az SPSS 10.0 for Windows programcsomag segítségével. Varianciaanalízis segítségével megállapítottam a feltételezett modell adekvát voltát (Kemény & Deák, 1993).

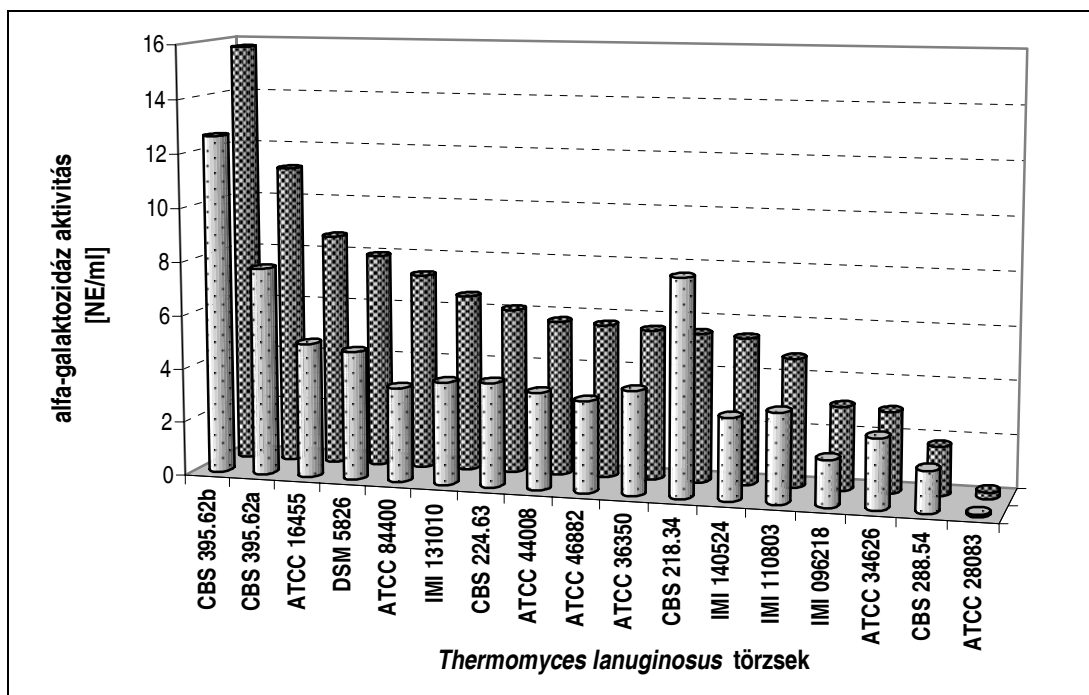
## 4 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1 ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM ELŐÁLLÍTÁSA FERMENTÁCIÓVAL

Az extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintéziséhez egy termofil gombát, a *Thermomyces lanuginosus* fajt választottam, melynek növekedési hőmérséklet optimuma 45-50°C között található. Ennek alapján a fermentációs kísérletekhez 47°C-os tenyésztési hőmérsékletet alkalmaztam.

#### 4.1.1 *Thermomyces lanuginosus* törzsek $\alpha$ -galaktozidáz aktivitása

Az extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz szintézis indukálásához 1 (m/v) % raffinózt és nitrogénforrásként 0,4 (m/v) % L-aszparagint alkalmaztam. Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulását 8 napig tartó fermentáció során vizsgáltam. Az enzimaktivitás méréseket pH=4,2-nél (McIlvaine puffer) és 50, valamint 58 °C-on is elvégeztem. A legmagasabb aktivitás értékeket a fermentáció 6. napján vagy ezt követően tapasztaltam. Az egyes törzsek maximális enzimaktivitásait az 5. ábra mutatja.

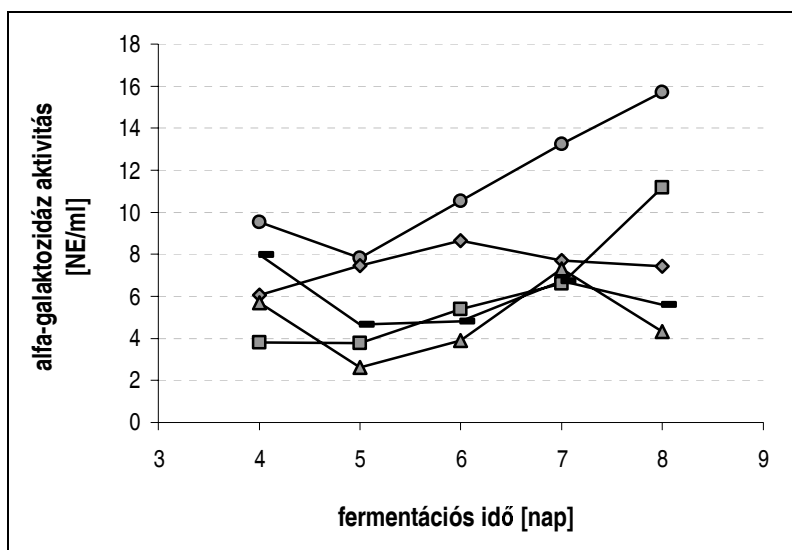


5. ábra *Thermomyces lanuginosus* törzsek maximális extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitása szubmerz fermentációknál

1 (m/v) % raffinóz, 0,4 (m/v) % L-aszparagin; a meghatározás hőmérséklete: 50°C □, 58°C ▨

A szkrinelés eredményeként megállapítottam, hogy a CBS 218.34-es törzs kivételével valamennyi törzs enzim aktivitása 58 °C-on magasabb volt, mint 50 °C-on.

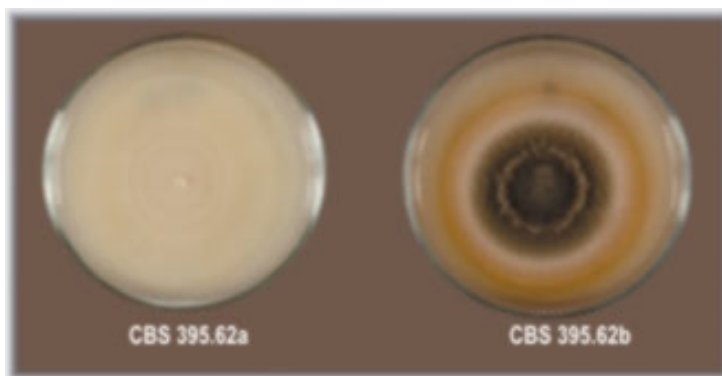
50 °C-on az enzimaktivitás értékek 0 és 13 NE/ml között váltakoztak. A törzsek túlnyomó többsége alacsony aktivitás értékeket mutatott, amelyek az adott törzsre jellemzően 0 és 4 NE/ml enzimaktivitás tartományban voltak. Az ATCC 28083-as törzs a mérések során nem mutatott  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást. Az enzimtermelés szempontjából legígéretesebbnek a CBS 395.62b, a CBS 395.62a, az ATCC 16455, a DSM 5826 és az ATCC 84400 jelzésű törzsek bizonyultak. E törzsek 58 °C-on mért aktivitás értékeinek időbeni alakulását szemlélteti a 6. ábra. Az ATCC 16455 és 84400, valamint a DSM 5826 jelzésű törzs maximális  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás értékei 6-8 NE/ml tartományban voltak. A legmagasabb aktivitást minden vizsgálati időpontban a CBS 395.62b törzs biztosította, amely a 8. napon 15,73 NE/ml értékű volt. Az aktivitási görbe monoton növekedett. Hasonlóan monoton növekedő enzimaktivitásokat tapasztaltam a CBS 395.62a jelzésű törzs esetében, de ennek legnagyobb aktivitása csupán 11,2 NE/ml volt. A legjobb termelőképeséggel rendelkező CBS 395.62a és CBS 395.62b törzsvonalak az eredeti törzsből szegregálódott eltérő fruktifikációs tulajdonságot mutató izolátumok (7. ábra).



6. ábra A potenciális  $\alpha$ -galaktozidáz termelő törzsek aktivitási görbéi az idő függvényében

1 (m/v) % raffinóz, 0,4 (m/v) % L-aszparagin

CBS 395.62a —■—, CBS 395.62b —●—, ATCC 16455 —◆—, ATCC 84400 —▲—, DSM 5826 —■—



**7. ábra** *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62 jelű törzsből izolált morfológiai mutánsok

Zaprometova & Ulezlo (1988) hasonló átfogó szelektációs kísérleteket végzett penész eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézisére vonatkozóan különböző indukciós tápközegek alkalmazásával. Vizsgálataikban *Alterneria*, *Aposphaeria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cephalosporium/Acremonium*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Spicaria*, *Trichoderma*, *Verticillium* nemzetséghez tartozó fajok törzseinek extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásait vizsgálták. Eredményeik is alátámasztják, hogy egy adott fajhoz tartozó törzsek is jelentős különbségeket mutathatnak az enzimaktivitások tekintetében. Az *Aspergillus niger* törzsek  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásai 5-15 NE/ml, míg a *Penicillium canescens* 2-21 NE/ml és a *Penicillium frequentans* 1-17 NE/ml értékek között változtak.

További kísérleteimet elsődlegesen a legígéretesebbnek tartott *T. lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzs vizsgálatára összpontosítottam. Az enzim fermentációk hatékonyságának maximalizálása előtt, fontosnak ítéltém adatokat gyűjteni az adott gombából származó enzim aktivitásának optimális paramétereire vonatkozóan.

#### **4.1.2 Az enzimaktivitás mérés optimális körülményeinek meghatározása**

Az enzim fermentációk értékeléséhez először meghatároztam az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásmérés azon környezeti paramétereit, amelyek mellett maximális aktivitás mérhető. A meghatározásokhoz a *T. lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzs 1 % raffinóz, 0,1 % glükóz valamint 0,4 % L-aszparagin tartalmú fermentációs tápközegen előállított 4 napos tenyészetének szűrlését alkalmaztam.

##### **4.1.2.1 pH optimum**

Az enzimaktivitás szempontjából optimális pH érték meghatározásához McIlvaine puffereket (pH=3,0–7,8) alkalmaztam. Az aktivitás mérés eredményeit a 8. ábra szemlélteti. A maximális enzimaktivitások a savas pH tartományban mérhetőek. A pH=3,8-4,4 közötti tartományban az aktivitás értékek csupán 5 %-os eltéréseket mutattak. Az aktivitás a savasabb pH értékek irányában gyorsabban csökken, míg a lúgos

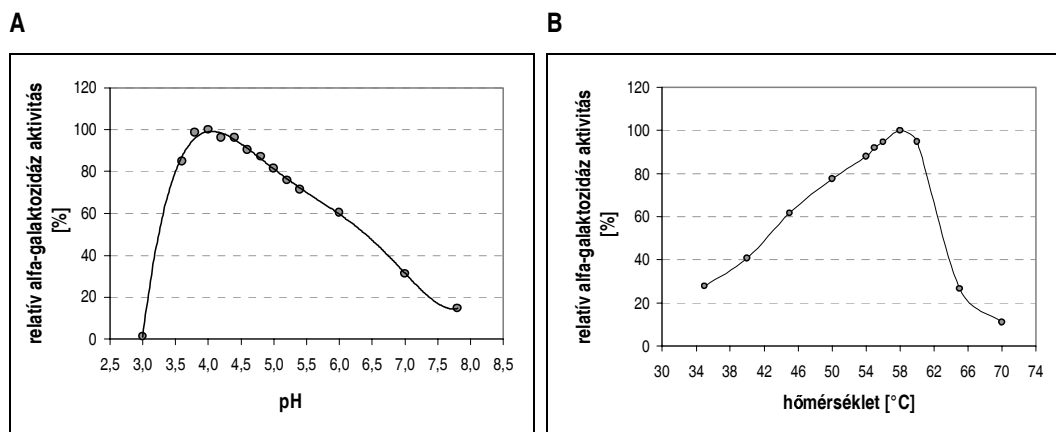


tartomány felé haladva a csökkenés lassúbb ütemű. A fenti megfontolásból az aktivitásmérésekhez pH=4,2 értéket választottam.

#### 4.1.2.2 *Hőmérséklet optimum*

A hőmérséklet optimum meghatározása szintén aktivitásméréseken keresztül történt 35 °C-tól 70 °C-ig terjedő hőmérsékleti tartományban. A mérési adatok a 8.B ábrán kerültek összefoglalásra.

A maximális  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást 58 °C-on mértem. Az aktivitás értékek a nagyobb hőmérsékleteken meredeken csökkentek és 70 °C-on az 58 °C-on tapasztalt aktivitás értéknek már csak 11 %-át lehetett mérni.



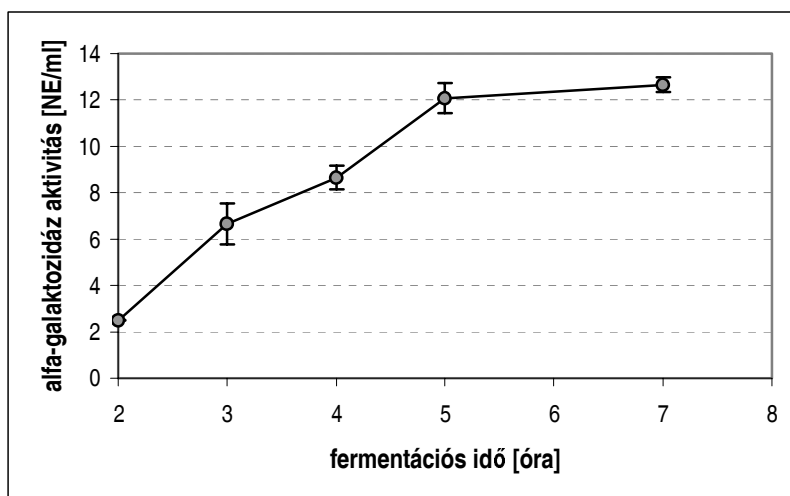
8. ábra Az extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás pH és hőmérséklet függése a tenyészlé szűrlésében vizsgálva

#### 4.1.3 Az enzimaktivitás alakulása $\alpha$ -galaktozidos kötéseket tartalmazó szubsztrátumokon

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelést megalapozó kísérletek során növekedési szubsztrátumként olyan vegyületeket alkalmaztam, amelyek  $\alpha$ -galaktozidos kötéseket tartalmaznak, illetve olyan mezőgazdasági eredetű összetett anyagokat választottam, amelyekben ilyen komponensek találhatóak.

##### 4.1.3.1 *Extracelluláris $\alpha$ -galaktozidáz termelés raffinóz szubsztrátumon*

A maximális  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás elérése érdekében az optimális tápközeg összetétel meghatározásához első lépésként 1 (m/v) % raffinóz és 0,1 (m/v) % glükóz szénforrásokon, valamint 0,4 (m/v) % L-aszparagin nitrogénforráson történő enzimtermelést kívántam megismerni abból a célból, hogy a továbbiakban eredményeimet ehhez viszonyíthassam. A fermentációs kísérletet három ismétlésben hajtottam végre, amely vizsgálatoknak átlagait mutatom be a 9. ábrán.



9. ábra A *T. lanuginosus* CBS 395.62b gombatörzs extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásának alakulása 1 (m/v) % raffinóz szubsztrátumon

0,1 (m/v) % glükóz, 0,4 (m/v) % L-aszparagin

Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás a fermentációs idő függvényében monoton növekedést mutatott, amely a fermentáció 5. napjára elérte a 12 NE/ml értéket, de a fermentáció 7. napján is csupán 12,66 NE/ml értéket mutatott.

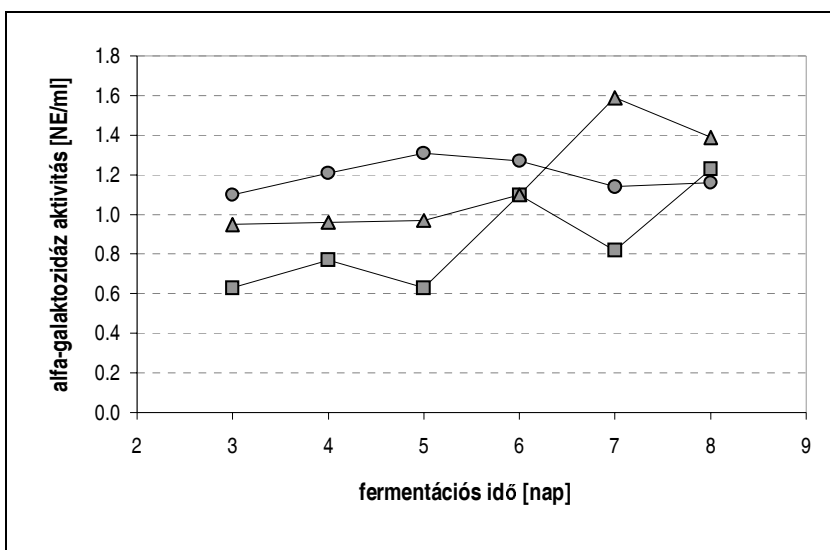
Zapater és munkatársai (1990) *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 törzs  $\alpha$ -galaktozidáz termelésére szintén raffinózzal történő indukciót alkalmazott. Az indukció hatása csak azután jutott érvényre, amikor a tápközegből már elfogyott a glükóz. Ezt követően az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás monoton növekedett, de a fermentáció 7. napján mért legnagyobb aktivitás is egy nagyságrenddel kisebb volt, mint a *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs által kiválasztott enzimé.

#### 4.1.3.2 $\alpha$ -Galaktozidáz enzimtermelés galaktomannán szubsztrátumokon

Az  $\alpha$ -galaktozidos kötést tartalmazó oligoszacharidok mellett megvizsgáltam a galaktomannánok alkalmazhatóságát extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállítására. Ezen vegyületekben a mannán gerinchez oldallánként  $\alpha$ -galaktozidos kötéssel kapcsolódnak a galaktóz molekulák. Vizsgálataimban az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim indukálására guar és szentjánoskenyér eredetű galaktomannánt alkalmaztam, mint fő növekedési szubsztrátumot.

#### Fermentációs kísérletek guar gumi tartalmú tápközegeken

A fermentációs alapösszetevőket 0,1 (m/v) % glükózzal, 0,4 (m/v) % L-aszparaginnal és különböző koncentrációban guar gumival egészítettem ki. A 8 napig vezetett fermentáció folyamán az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulását szemlélteti a 10. ábra.



10. ábra Extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulása különböző mennyiségű guar gumit tartalmazó tápközegeken

Guar gumi koncentráció (m/v) %: 0,5  $\square$ , 1,0  $\triangle$ , 1,5  $\circ$

A mért aktivitások a fermentáció során 0,63 és 1,59 NE/ml értékek között változtak. Ezek az értékek egy nagyságrenddel alacsonyabbak voltak, mint a raffinóz szubsztrátum alkalmazásánál, így nem bizonyulhat alternatívának az enzimtermeltetésre. 1,5 % guar gumi növekedési szubsztrátumként való alkalmazásánál a viszkozitás növekedésének és ezáltal az elégtelen levegőellátás eredményeként, az enzimaktivitás már alacsonyabb szinten maradt, mint 1 % guar gumi esetében.

#### Fermentációs kísérletek szentjánoskenyér gumit tartalmazó tápközegeken

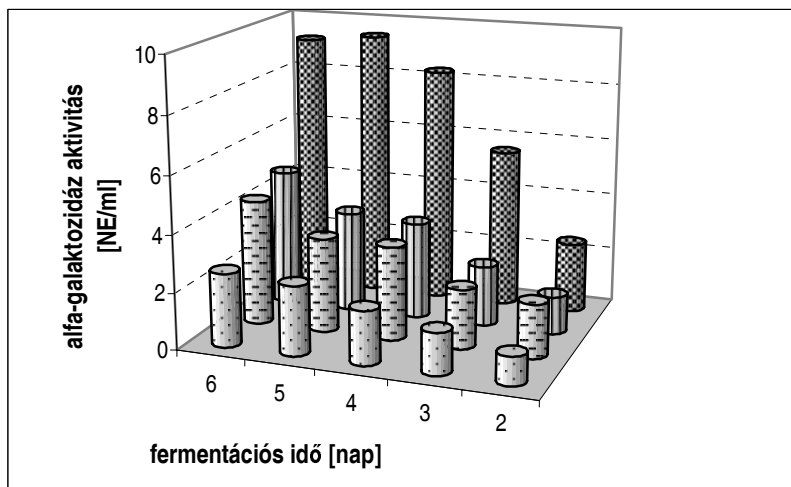
A fermentációs alapösszetevőket 0,1 (m/v) % glükózzal, 0,4 (m/v) % L-aszparaginnal és különböző koncentrációban szentjánoskenyér gumival egészítettem ki. A 6 napig vezetett fermentáció során az aktivitások 1,83 és 3,39 NE/ml értékek között voltak. Az aktivitások csupán egy ötödét, illetve negyedét mutatták az 1 % raffinóz szubsztrátumon tapasztalt titereknek. Figyelembe véve az adott tápkomponens beszerezhetőségét és az árát, nem bizonyulhat versenyképes szubsztrátumnak az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállításához.

#### **4.1.3.3 Enzimfermentációs kísérletek borsóliszten**





A kísérletekben fajtaazonos (UM-1103, Hunor 1997) borsóliszteket alkalmaztam. Előkísérletek során meggyőződtem arról, hogy a borsó fajtája nincs szignifikáns hatással az enzimaktivitás alakulására.

A fermentációknál 0,4 (m/v) % L-aszparagint tartalmazó tápközegeket használtam és a raffinózos kísérletekben 1 (m/v) % raffinózt és 0,1 (m/v) % glükózt tettem a táplevesbe. A borsóliszttel készített tápközegek 0,1 (m/v) % raffinóz és 0,5 (m/v) % glükóz kiegészítést is tartalmaztak. Az enzimfermentációk

során a kiemelkedően jó teljesítményt mutató CBS 395.62b, valamint a közepes aktivitással rendelkező DSM 5826 jelzésű törzsek termelőképességét is megvizsgáltam. A két párhuzamos vizsgálatban megvalósított kísérletek eredményeinek átlag értékeit a 11. ábra mutatja.

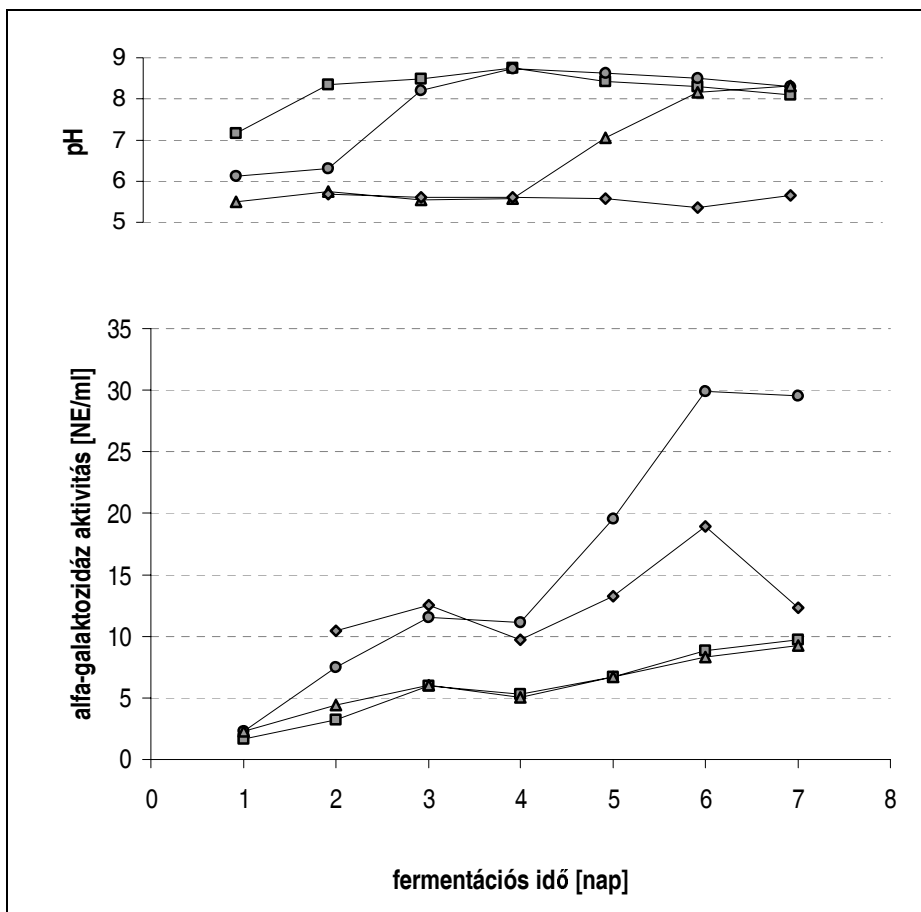


**11. ábra** Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások alakulása különböző szubsztrátumokon az idő függvényében

DSM 5826-2 (m/v) % borsóliszt , DSM 5826-1 (m/v) % raffinóz ,  
 CBS 395.62b-2 (m/v) % borsóliszt , CBS 395.62b-1 (m/v) % raffinóz 

Ebben az esetben is a CBS 395.62b törzs mutatta a kedvezőbb  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokat. E törzs esetében 1 (m/v) % raffinóz induló koncentrációnál a fermentáció 5. napján az aktivitás megközelítette a 10 NE/ml értéket, míg 2 (m/v) % borsólisztet tartalmazó tápközegen csupán 4,8 NE/ml aktivitást tapasztaltam. Ez utóbbihoz hasonló aktivitási görbét kaptam a DSM 5826 jelzésű törzs alkalmazásával raffinóz szubsztrátumon. Ettől elmaradt a borsólisztet tartalmazó tápközegen tapasztalt aktivitás, ahol a maximális aktivitás 2,5 NE/ml volt.

Az enzimaktivitások fokozása céljából mind a raffinóz, mind a borsóliszt (Hunor 1997) koncentrációkat megnöveltem és a tápközegben nitrogénforrásként továbbra is L-aszparagint alkalmaztam, de a glükóz kiegészítést elhagytam. A 32 (m/v) % borsólisztet tartalmazó tápközeg igen sűrű volt, a gomba csupán a felületén növekedett, így szubmerz fermentáció megvalósításához alkalmatlannak bizonyult. A 7 napos fermentáció során elért aktivitás értékeket, valamint a fermentációk természetének mélyebb megismerése miatt a pH értékeket is bemutatom a 12. ábrán.



12. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások alakulása különböző összetételű tápközegen

raffinóz 1 (m/v) %  $\blacksquare$ , raffinóz 2,8 %  $\bullet$ , borsóliszt 8 (m/v) %  $\blacktriangle$ , borsóliszt 16 (m/v) %  $\blacklozenge$

A legkedvezőbb  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokat a 2,8 (m/v) % raffinóz tartalmú tápközegen értem el, amely a fermentáció 6. napján közel 30 NE/ml értéket mutatott, ezt követte a 16 (m/v) % borsólisztet tartalmazó tápközegen ugyancsak a 6. napon tapasztalt 18,95 NE/ml aktivitás érték.

Az 1 (m/v) % raffinózt és a 8 (m/v) % borsólisztet tartalmazó tápközegen elért termelési értékek azonos aktivitási profilt mutatva a fermentáció 7. napján közelítették meg a 10 NE/ml-es értéket.

A pH értékek – a 16 % borsólisztet tartalmazó tápközegen történő fermentáció kivételével – mindegyik kísérletben pH=8,3 értékű maximumot mutatnak. Ezzel szemben a 16 (m/v) % borsólisztet tartalmazó tápközeg esetében a fermentáció egész folyamán a pH érték stabilan pH=5,4–5,7 között volt. Ez a jelenség a borsólisztben lévő nagy pufferkapacitással rendelkező komponenseknek tulajdonítható.

#### 4.1.3.4 Faktoriális kísérletek

##### Kétszintű három faktoros kísérleti terv

Az előkísérletek eredményeiből arra következtettem, hogy az  $\alpha$ -galaktozidos kötéseket tartalmazó összetevők koncentrációjának növelése az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás növekedését eredményezi. Ennek megerősítésére kétszintű 3 faktoros kísérleti tervet állítottam fel. A faktortervben a raffinóz koncentráció mellett vizsgáltam az L-aszparagin és a Mg-ion koncentrációjának hatását is az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulására. Központi elrendezésű ortogonális tervet szerkesztettem és teljes faktoriális tervet valósítottam meg. A 0,1 (m/v) % glükózt tartalmazó fermentációs tápközeget a faktortervnek megfelelő koncentrációban egészítettem ki a kísérleti tervben szereplő faktorokkal, azaz az optimalizálandó tápkomponensekkel. A kísérleti tervet mutatja a 8. táblázat.

8. táblázat A kísérleti terv a természetes és a transzformált faktorokkal

Kísélet	Koncentrációk [(m/v) %]			Transzformált faktorok / szintek		
	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1.	1,5	0,6	0,07	+1	+1	+1
2.	1,5	0,2	0,07	+1	-1	+1
3.	1,5	0,6	0,03	+1	+1	-1
4.	1,5	0,2	0,03	+1	-1	-1
5.	0,5	0,6	0,07	-1	+1	+1
6.	0,5	0,2	0,07	-1	-1	+1
7.	0,5	0,6	0,03	-1	+1	-1
8.	0,5	0,2	0,03	-1	-1	-1

Z<sub>1</sub> és X<sub>1</sub>: raffinóz; Z<sub>2</sub> és X<sub>2</sub>: L-aszparagin; Z<sub>3</sub> és X<sub>3</sub>: MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O

Matematikai statisztikai értékelés segítségével meghatározható az egyes paraméterek hatása az  $\alpha$ -galaktozidáz termelésre, valamint interakciójuk hatása is értékelhető. A táptalaj optimalizációs kísérletek értékelésére többváltozós lineáris regressziót alkalmaztam az alábbi modellt feltételezve:

$$Y = b_0 + b_1z_1 + b_2z_2 + b_3z_3, \quad \text{ahol } Y \text{ a maximalizálandó függvény, azaz az } \alpha\text{-galaktozidáz aktivitás}$$

$b_0, b_1, b_2, b_3$  az egyenlet meghatározandó paraméterei.

A 7 napos fermentáció 7. napján az enzimaktivitást prognosztizáló egyenlet az alábbi:

$$Y=2,255+12,434*z_1-7,372*z_2+6,531*z_3$$

Az egyenletben a vastagon kiemelt szám azt mutatja, hogy mely faktor volt 95 %-os szignifikancia szinten hatással az enzintermelésre. Az L-aszparaginnak ( $b_2$ ) és a  $MgSO_4$ -nak ( $b_3$ ) ebben a tartományban nincs szignifikáns hatása, míg a raffinóznak ( $b_1$ ) kiemelkedően pozitív hatása van az enzintermelésre.

Tekintettel arra, hogy a kísérleti eredmények alapján csupán a raffinóznak volt szignifikáns hatása az enzintermelésre, a tovább lépésnél csupán e faktor esetében határoztam meg új munkapontot, a másik két faktort rögzítettem az eredeti munkapont értékein és újabb faktor tervet állítottam fel.

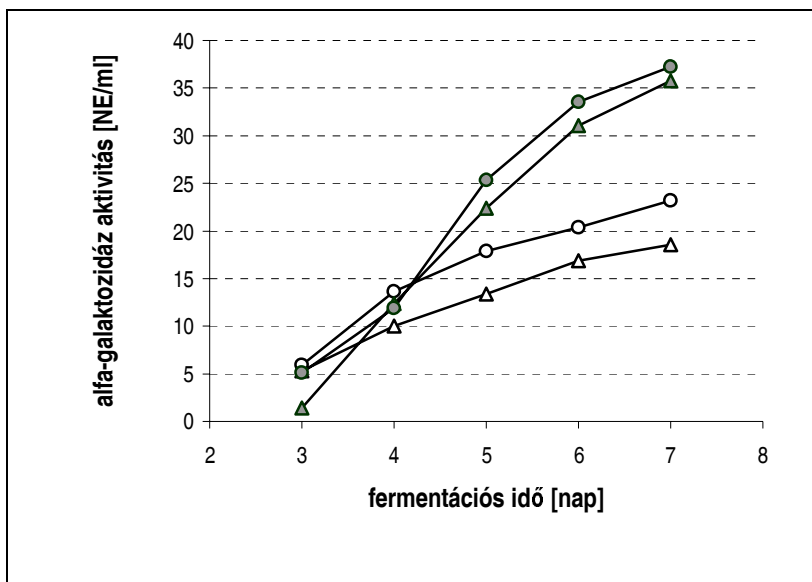
#### Kétszintű két faktoros kísérleti terv

Ebben a kísérletben a raffinóznak, mint mennyiségi faktornak és a N-forrásoknak - L-aszparagin és élesztőkivonat formájában-, mint minőségi faktoroknak hatását vizsgáltam az enzintermelésre vonatkozóan. A vizsgált nitrogénforrás mennyiségének meghatározása az azonos nitrogéntartalomra vonatkoztatva történt. A raffinóz új munkapontjaként 2,0 (m/v) %-os értéket választottam 0,5 (m/v) %-os léptéktényezővel. A változatlan paraméterek koncentrációi: glükóz 0,1 (m/v) %;  $KH_2PO_4$  0,3 (m/v) %;  $K_2HPO_4$  0,2 (m/v) %; Vogel 0,1 (v/vf) %;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05 (m/v) %. A kísérlet során kétszintű két faktoros teljes faktortervet készítettem és valósítottam meg. Ennek megfelelően  $2^2=4$  kísérleti beállítás szerepelt a kivitelezendő tervben. A kísérlethez az alábbi 4 féle tápközeget alkalmaztam (9. táblázat).

**9. táblázat Az alkalmazott tápközegek raffinóz koncentrációja és nitrogénforrás tartalma**

Kísérlet	Raffinóz [(m/v) %]	N-forrás
1.	1,5	0,4 (m/v) % L-aszparagin
2.	1,5	0,8 (m/v) % élesztőkivonat
3.	2,5	0,4 (m/v) % L-aszparagin
4.	2,5	0,8 (m/v) % élesztőkivonat

Az egyes kísérleti fermentációknál az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások alakulását a 13. ábrán mutatom be. A fermentációk során az élesztőkivonaton nevelt gomba magasabb enzimaktivitásokat adott, mint L-aszparagin nitrogénforráson, de a raffinóz mennyiségének növelése jelentősebb aktivitásnövekedést okozott. 2,5 (m/v) % raffinóz koncentráció alkalmazásával a fermentáció 7. napján az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás 36-37 NE/ml értékű volt. A tápközeg raffinóz koncentrációját a nemkívánatos ozmotikus viszonyok kialakulása miatt, valamint gazdaságossági megfontolásokból sem kívántam tovább növelni, ezért stratégiát változtattam.



13. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimaktivitás alakulása a kétszintű két faktoros kísérletsorozatban

1. kísérlet  $\triangle$ , 2. kísérlet  $\circ$ , 3. kísérlet  $\blacktriangle$ , 4. kísérlet  $\bullet$

#### 4.1.3.5 Különböző nitrogénforrások alkalmazásának hatása az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásra

2,5 (m/v) % raffinózzal és 0,1 (m/v) % glükózzal kiegészített fermentációs tápközegben 7 féle nitrogénforrást vizsgáltam meg az  $\alpha$ -galaktozidáz termelés szempontjából. A vizsgálandó nitrogénforrások koncentrációját azonos nitrogéntartalom alapján határoztam meg és a vizsgált nitrogénforrásokat a koncentrációk feltüntetésével a 10. táblázatban adom meg.

A különböző nitrogénforrást tartalmazó tápközegekben a gombatorzs jól szaporodott, de pigmentképzésükben jelentős eltérés mutatkozott. A 4., 6. és 7. kísérletben színanyag termelés nem volt. Az 5. kísérletben sötétbarna pigmentet választott ki a gomba, míg az 1., 2. és 3. kísérletben enyhén rózsaszínű pigmentképzést tapasztaltam. A kísérleteknél észlelt megfigyeléseket és a mérési eredményeket a 11. táblázatban gyűjtöttem össze.

10. táblázat A tápközegekben alkalmazott nitrogénforrások

Kísérlet	Nitrogénforrás	Koncentráció [(m/v)%]
1.	Élesztőkivonat	0,80
2.	L-aszparagin	0,40
3.	Ammónium-acetát	0,45
4.	Ammónium-nitrát	0,24
5.	Nátrium-nitrát	0,50
6.	Ammónium-szulfát	0,40
7.	Ammónium-dihidrogén-foszfát	0,70

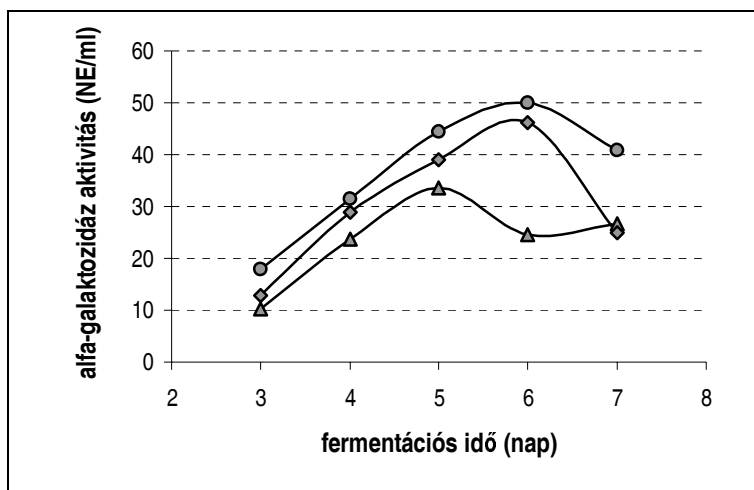


11. táblázat Különböző nitrogénforrások alkalmazásával végzett fermentációk eredményei

Kísérlet	$\alpha$ -galaktozidáz aktivitás (NE/ml)					Pigmenttermelés	pH
	3. nap	4. nap	5. nap	6. nap	7. nap		
1.	13	29	39	46	25	rózsaszín	7,0
2.	10	24	34	25	27	rózsaszín	7,0
3.	18	31	44	50	41	rózsaszín	7,0
4.	0	0,01	na	na	na	nincs pigment	3,0
5.	0,01	0,03	na	na	na	sötétbarna	6,0
6.	0	0,01	na	na	na	nincs pigment	3,0
7.	0	0,01	na	na	na	nincs pigment	3,0

na: nem volt meghatározás

Számottevő  $\alpha$ -galaktozidáz termelés csak az élesztőkivonat, az L-aszparagin és az ammónium-acetát tartalmú tápközegek alkalmazásánál volt. A 11. táblázat adatai alapján az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás hiánya a 4., 5., 6. és 7. kísérleteknél az alacsony pH következményeként az enzimstruktúrában bekövetkező irreverzibilis változással magyarázható. A 14. ábrán mutatom be az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelés szempontjából ígéretes nitrogénforrásokon vezetett fermentációk enzimtermelési profilját. L-aszparagin nitrogénforráson vezetett fermentáció esetén a maximális  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást az 5. napon mértem, míg élesztőkivonat és ammónium-acetát alkalmazásánál a maximális aktivitás értékek a 6. napon jelentek meg és 40-50 %-kal magasabbak voltak, mint az L-aszparagin nitrogénforrás jelenlétében. A *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs fermentációjával 2,5 (m/v) % raffinóz szénforráson és 0,45 (m/v) % ammónium-acetát tartalmú tápközegben a 6. napon 50 NE/ml  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást mértem, ezért a további kísérletekben nitrogénforrásként ammónium-acetátot alkalmaztam.



14. ábra Különböző nitrogénforrások hatása a *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelésére

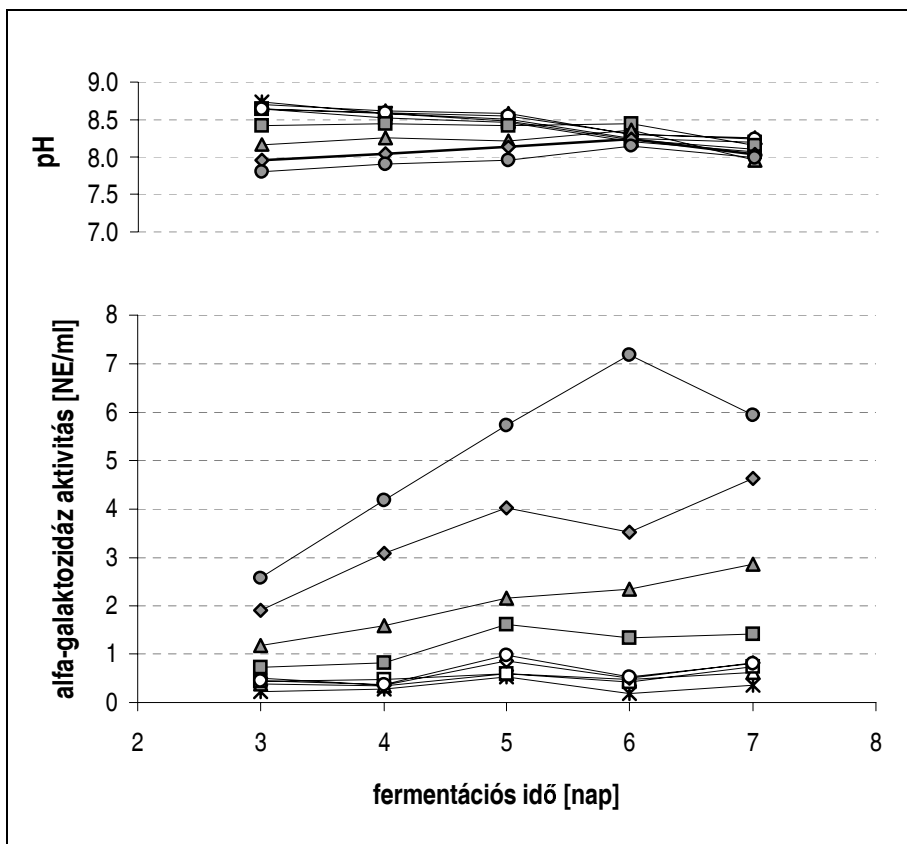
ammónium-acetát ●, L-aszparagin ▲, élesztőkivonat ◆

#### 4.1.3.6 Korpakivonatok alkalmazása az $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállításánál

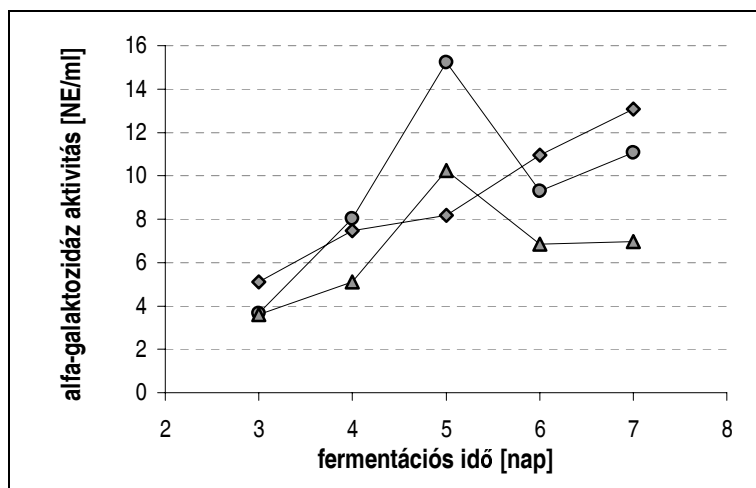
Korpakivonatokat készítettem, hogy a raffinóznál olcsóbb szubsztrátumot találjak az extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállításához. A fermentációhoz 0,45 (m/v) % ammónium-acetát tartalmú tápközeget állítottam elő, az enzim indukálásához pedig különböző mennyiségben alkalmaztam a korpakivonatot. A korpakivonat elkészítési módját az ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK fejezetben ismertettem. A fermentációs tápközegek 2, 4, 6, 8, 10, 25, 50 és 75 (v/v) %-ban tartalmaztak korpakivonatot, illetve készítésük korpakivonattal (100 %) történt. A 7 napos fermentáció során elért eredményeket a 15. ábrán adom közre. A fermentáció 3. napján a pH értékeket vizsgálva megállapítható, hogy a korpakivonat tekintetében hígabb tápközegekben magasabbak voltak a pH értékek (pH=8,7-8,6), amelyek a fermentációs idő előre haladtával lassú ütemben csökkentek. Ezzel szemben a 25 (v/v) %, illetve ennél nagyobb koncentrációjú korpakivonatot tartalmazó tápközegekben ebben az időpontban a pH értékek 8,5 alatt maradtak, illetve a 75 és a 100 (v/v) % esetén a pH=8,0 értéket sem érték el. Ezekben az esetekben a pH növekedését követően szintén csökkenést tapasztaltam. A fermentáció végén a pH értékek 8 és 8,3 között voltak, függetlenül a kezdeti korpakivonat koncentrációtól. Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulásának értékelésénél megállapítható, hogy 10 (v/v) % korpakivonatot tartalmazó, illetve annál kisebb koncentrációjú tápközegekben az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás 1 NE/ml alatt maradt, míg a 25, 50, 75 és 100 (v/v) % korpakivonatot tartalmazó tápközegekben elért maximális aktivitások rendre 1,6, 2,9, 4,6 és 7,2 NE/ml értékűek voltak. Következésképpen levonható, hogy a vizsgált kísérleti rendszerben a korpakivonat koncentrációjának növelése egyenes arányban volt az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás növekedésével.

A fenti eredményre alapozva célul tűztem ki, hogy töményebb korpakivonatokat állítsak elő és ezekben oldjam a többi tápkomponenst. A kivonatok jelölései  $K_E$ ,  $K_1$  és  $K_2$  a legtöményebbtől a leghígabb felé haladva. A  $K_2$  jelölésű kivonat megegyezik az előző kísérletben szereplő korpakivonat összetételével. Az ily módon készített tápközegekben elért aktivitás értékeket mutatja a 16. ábra. Megállapítható, hogy a  $K_2$  korpakivonattal készített tápközegben a maximális aktivitást az 5. napon mértem, amely 10 NE/ml és a fermentáció végén is 7 NE/ml értékű volt, amely megfelel az előző kísérletben elért eredményeknek. A kevésbé hígított extraktum ( $K_1$ ) alkalmazása esetén az enzimaktivitás mintegy 50 %-os növekedését tapasztaltam. Ez azt jelenti, hogy a maximális aktivitást – 15 NE/ml értéket – az 5. napon mértem és az aktivitás értékek ezt követően 9,5 és 11 NE/ml között változtak.

A tömény korpakivonat ( $K_E$ ) felhasználásával készült tápközegen a vizsgált idő intervallumban az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás monoton növekedett és a legmagasabb értéket -13 NE/ml- a 7. napon kaptam. Ezek az értékek már megfelelnek az 1 (m/v) % raffinóz tartalmú tápközegen tapasztalt eredményeknek, de nem érik el a 16 (m/v) % borsóliszten tapasztalt aktivitást és messze elmaradnak a 2,5 (m/v) % raffinóz tartalmú tápközegen tapasztalt 50 NE/ml-es értéktől.



15. ábra *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásának alakulása korpakivonatot különböző koncentrációban tartalmazó tápközegeken  
korpakivonat (v/v) %: 2 \* , 4  $\triangle$  , 6  $\square$  , 8  $\diamond$  , 10  $\circ$  , 25  $\blacksquare$  , 50  $\blacktriangle$  75  $\blacklozenge$  100  $\bullet$

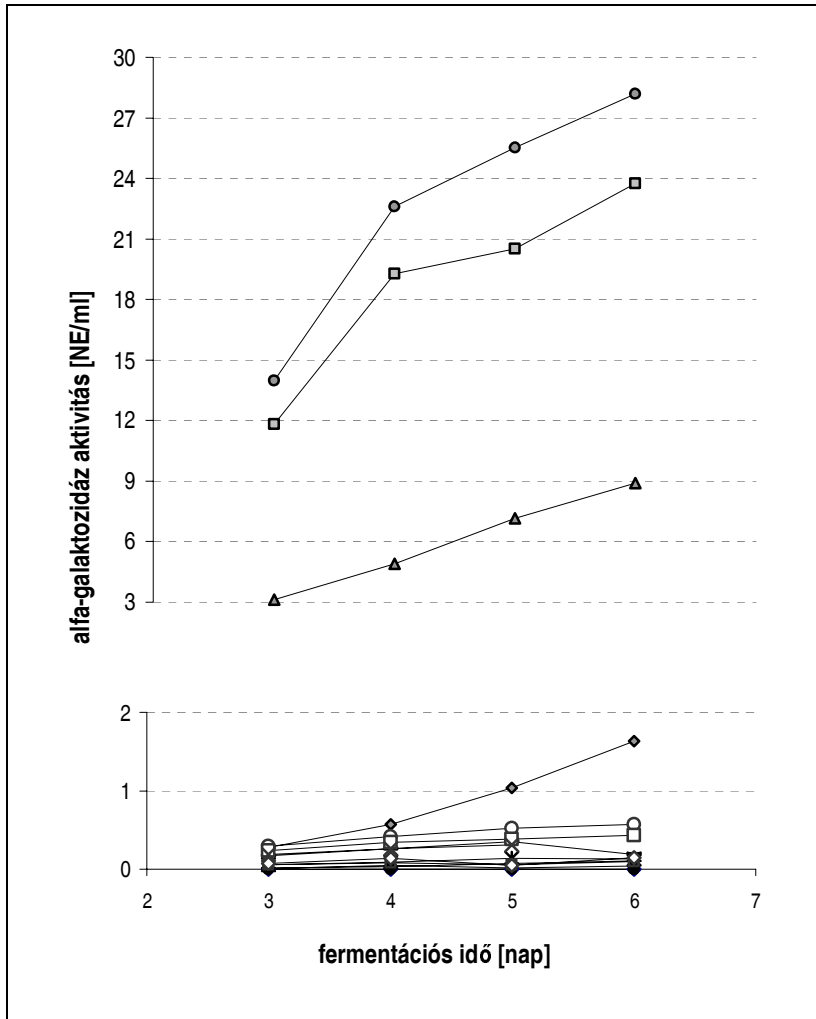


16. ábra Különböző töménységű korpakivonatokkal készült tápközegeken az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulása a fermentációs idő függvényében  
Korpakivonatok jelölései: KE  $\blacklozenge$  , K1  $\bullet$  , K2  $\blacktriangle$

Számos szerző szilárd szubsztrátumú fermentációkban korpát használ az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim indukálására és előállításához (McGhee et al., 1978; Srinivas et al., 1993; Brumer III et al., 1999). E kísérletek eredményeinek összehasonlítása számos problémát vet fel, mivel nem ismert a fermentáció során a mikroba tömege, a szubsztrátum fogyás, valamint eltérő módszerekkel történik az enzim extrakciója. Kotwal munkatársaival különböző szénforrások alkalmazásával egy *Humicola* fajjal megvalósított szubmerz fermentációknál az  $\alpha$ -galaktozidáz szintézisét konstitutívnek írja le, ahol a legnagyobb aktivitást (3,47 NE/ml) 2 % raffinóz szénforráson érte el, ezt követték az 5-7 % korpakivonatot tartalmazó tápközegen tapasztalt 2,5-2,6 NE/ml értékek. 2 % szacharóz jelenlétében 1,46 NE/ml-es és 2 % maltóz tartalmú tápközegen 1,03 NE/ml-es aktivitásokat mértek. Ezen értékek jelentősen elmaradnak az enzimtermelésre kiválasztott *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs termelési értékeitől.

#### 4.1.4 Különböző szerkezetű szénhidrátok hatása az $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésére

A *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelését kívántam megvizsgálni különböző kémiai szerkezettel rendelkező szénhidrátok és szénhidrát származékok alkalmazásával. Ezen vegyületek között voltak természetes szénhidrátok és mesterséges körülmények között előállított oligoszacharidok is. A fermentációs tápközeg az alapösszetevőkön kívül 0,45 (m/v) % ammónium-acetátot és a megfelelő cukor illetve cukorszármazékok 1-1 (m/v) %-át tartalmazták. Ribóz jelenlétében a gomba nem növekedett. A 6 napig tartó fermentációs kísérlet eredményei (17. ábra)  $\alpha$ -galaktozidáz hozamok szempontjából 4 csoportba sorolhatók. Az első csoportba tartoznak azok a szénforrások, amelyeken az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás nem érte el az 1 NE/ml értéket. Ezek a következők: a glükóz, a galaktóz, a mannit, a melibióz, a laktóz, a maltóz, az inulin és a mezo-inozit. Az  $\alpha$ -galaktozidos kötést tartalmazó melibióz szénforrás esetén extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást nem tapasztaltam. Ez arra utal, hogy a melibióz hasznosításában más típusú enzim illetve enzimek vehetnek részt. A második csoportba tartozik az L-arabinóz, mely szénforráson az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim határozott indukcióját tapasztaltam. Az aktivitás monoton növekedése figyelhető meg, mely a fermentáció 6. napján 1,6 NE/ml volt. A harmadik csoportba sorolható – a prebiotikumként kereskedelmi forgalomba hozott – mesterséges oligoszacharid laktoszukróz, amelyet a szacharóz transzgalaktozilálásával állítanak elő és feltehetően  $\alpha$ -galaktozidos kötést is tartalmaz. A laktoszukróz szintén indukálta az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézisét. A fermentáció 3. és 6. napja között az aktivitás értékek monoton növekedtek és a 6. napon megközelítették a 9 NE/ml-es títert. A negyedik csoportba sorolható a raffinóz és a szacharóz. Ezeken a szénhidrátokon tapasztaltam a legnagyobb aktivitásokat, amelyek 2,5-3,0-szor nagyobbak voltak az L-arabinóz szubsztrátumon tapasztalt aktivitásnál. A fermentációs technológia kidolgozása szempontjából figyelemreméltó eredmény, hogy szacharóz szénforráson nagyobb aktivitás érhető el, mint raffinóz esetében, mivel ez könnyebben hozzáférhető és viszonylag olcsó szénforrásnak tekinthető.



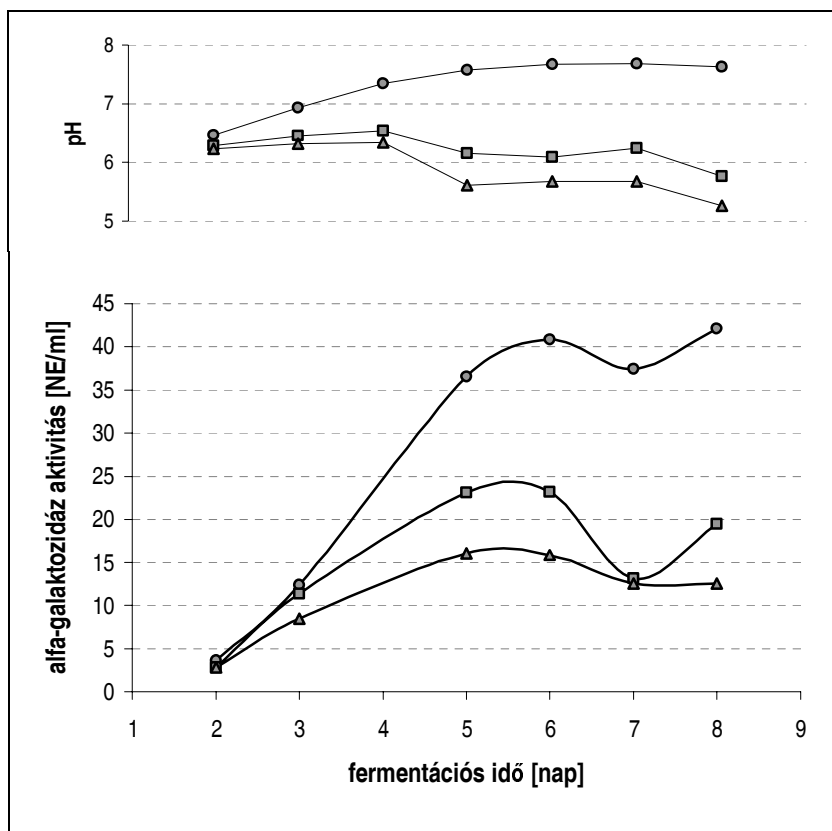
17. ábra Extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások alakulása különböző szénhidrátok és szénhidrát származékok jelenlétében

ammónium-acetát 0,45 (m/v) % és 1-1 (m/v) % cukor illetve cukorszármazék: szacharóz (●), raffinóz (■), laktoszkuróz (▲), L-arabinóz (◆), glükóz (○), fruktóz (●), galaktóz (—), mannit (\*), melibióz (◆), laktóz (—), maltóz (□), inulin (■), mezo-inozit (◇)

Eredményeim arra utalnak, hogy a vizsgált *T. lanuginosus* törzs minden vizsgált szénforráson alapszinten szintetizálja az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet, azonban az  $\alpha$ -galaktozidos kötések tartalmazó szubsztrátumok, és a D-galaktózzal szerkezeti rokonságot mutató L-arabinóz, valamint a szacharóz is indukálják termelését. A *Pycnoporus cinnabarinus* IFO 6139 jelű törzs termostabilis  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termeléséhez szintén szacharóz tartalmú tápközeget alkalmaznak, igaz arra vonatkozó adat nem áll rendelkezésre, hogy az enzim konstitutív módon, vagy indukció eredményeként szintetizálódik.

#### 4.1.4.1 Az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulása több szénhidrát együttes jelenlétében

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézis mechanizmusának felderítésére olyan fermentációkat terveztem, amelyekben 2 (m/v) % szacharóz és 0,45 (m/v) % ammónium-acetát jelenlétében vizsgáltam az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulását, illetve e táptalajokat 0,5 (m/v) % és 1 (m/v) % glükózzal kiegészítve vizsgáltam az aktivitások változását a fermentációs idő függvényében. A kísérleteket két párhuzamosban valósítottam meg és az eredmények átlagait mutatja a 18. ábra.



18. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás alakulása szacharóz tartalmú tápközegen glükóz jelenlétében és hiányában

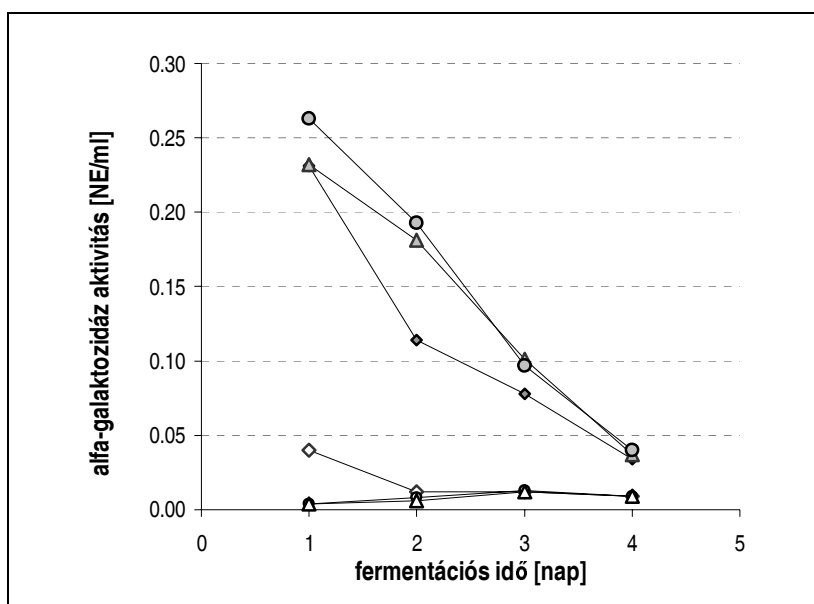
kontroll: 2 (m/v) % szacharóz és 0,45 (m/v) % ammónium-acetát ●  
kontroll + 0,5 % glükóz ■, kontroll + 1,0% glükóz ▲

A különböző fermentációk során tapasztalt aktivitás értékeket összevetve megállapítható, hogy adott szacharóz koncentrációjú tápközeghez glükózt adva a növekvő glükóz koncentrációval fordított arányban változik az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás. Számszerűsítve ez azt jelentette, hogy 0,5 (m/v) % glükóz tartalmú tápközegben az aktivitás a glükóz nélküli tápközegen elért értéknek csupán 60 %-a volt, míg ez az érték 1 (m/v) % glükóz tartalmú közeg alkalmazásánál 40 %. Megállapítható továbbá az is, hogy a kontroll kísérlet során a pH értékek a pH=6,5 és 7,6 közötti tartományban növekedést mutatnak. Ezzel ellentétben a glükózt is

tartalmazó tápközegek pH-ja a fermentáció során jelentősen csökken és a fermentáció végére pH=5,0-6,0 közötti tartományban található. A kísérleti eredmények alapján feltételezhető, hogy az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézise során katabolit represszió lép fel, de a kisebb aktivitás értékek magyarázhatók az eltérő pH értékekkel is.

#### 4.1.4.2 Az $\alpha$ -galaktozidáz szintézis vizsgálata melibióz szubsztrátum esetén

Abból a célból, hogy melibióz szubsztrátum esetében az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézisére vonatkozóan mélyebb információkat szerezzek 0,45 (m/v) % ammónium-acetát tartalmú tápközegekben egyedüli szénforrásként 1, 2 és 3 (m/v) % melibióz diszacharidot alkalmaztam. A fermentáció első napjától kezdve vizsgáltam a melibióz koncentráció változását és az extracelluláris, valamint az intracelluláris enzim aktivitásokat. A mérési eredményeket a 19. ábrán foglaltam össze.



19. ábra A *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelése melibióz szubsztrátum jelenlétében

0,45 (m/v) % ammónium-acetát  
 1 (m/v) % melibióz - intracelluláris aktivitás  $\blacklozenge$ , extracelluláris aktivitás  $\blacklozenge$   
 2 (m/v) % melibióz - intracelluláris aktivitás  $\blacktriangle$ , extracelluláris aktivitás  $\blacktriangle$   
 3 (m/v) % melibióz - intracelluláris aktivitás  $\bullet$ , extracelluláris aktivitás  $\circ$

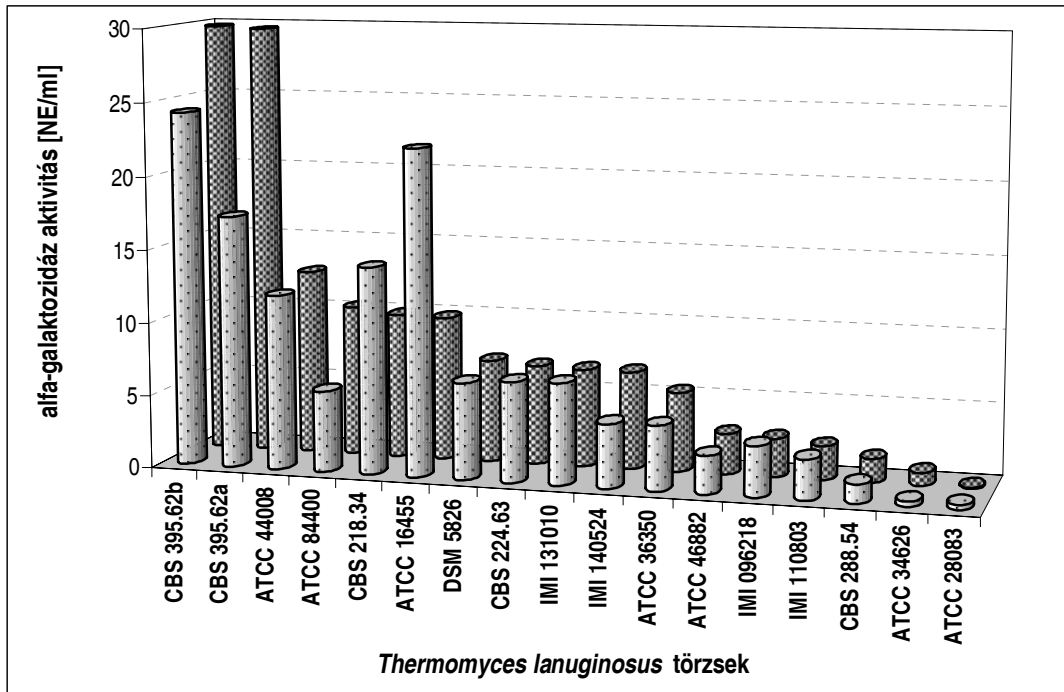
Az enzimaktivitásoknál szignifikáns eltéréseket nem tapasztaltam a különböző melibióz koncentrációjú tápközegek alkalmazása esetén, azonban jelentős különbség volt az extracelluláris és az intracelluláris enzimaktivitások alakulásában. Az extracelluláris enzimaktivitások a 4 napos vizsgálati perióduson belül nem érték el a 0,01 NE/ml-es értéket. A sejten belüli, illetve a sejthez kötődő – intracelluláris -

aktivitások ennek többszörösét mutatták a fermentációs kísérlet folyamán. A legkifejezettebb különbséget a fermentáció első napján észleltem, amikor az intracelluláris 6-25-szöröse volt a tenyészet szűrletében mérhető értékeknek, de ezek az értékek is két nagyságrenddel elmaradtak a szacharóz és a raffinóz szubsztrátumokon tapasztalt aktivitási értékektől.

#### 4.1.5 *T. lanuginosus* törzsek $\alpha$ -galaktozidáz termelése raffinóz és szacharóz szénforrásokon

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállítására irányuló fermentációs technológia kidolgozása szempontjából legígéretesebbnek a szacharóz szubsztrátum tűnik. Az enzimaktivitás fokozására irányuló kísérletek megkezdése előtt ismételt törzsszelektációs kísérleteket végeztem, hogy megállapíthassam vajon mindegyik vizsgált *T. lanuginosus* törzsnél érvényesül-e, hogy nagyobb  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások érhetőek el szacharóz szubsztrátumon, mint raffinóz esetében.

A különböző törzsgyűjteményekből származó törzsek  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásának alakulását vizsgáltam egy 7 napos fermentáció során 0,45 (m/v) % ammónium-acetát és 0,1 (m/v) % glükóz tartalmú tápközegeken, 1-1 (m/v) % raffinózzal illetve szacharózzal kiegészítve. A 3. naptól kezdve naponként vizsgáltam a tenyészetek pH-ját, valamint a fermentlevek szűrleteiben az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokat és a fehérjetartalmat. A 20. ábrán mutatom be az egyes törzsek esetében elért maximális aktivitásokat.



20. ábra *Thermomyces lanuginosus* törzsek  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitása 1 (m/v) % raffinóz és 1 (m/v) % szacharóz tartalmú tápoldatokban ammónium-acetát 0,45 (m/v) %, glükóz 0,1 (m/v) %



A kísérleti eredményekből megállapítható, hogy a vizsgált törzsek legtöbbször nagyobb aktivitások mutatkoztak szacharóz szubsztátumon, mint raffinóz tartalmú oldatban. Két törzs esetében -a CBS 218.34 és az ATCC 16455- a raffinóz szubsztátumon tapasztalt  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás jelentősebb mértékben meghaladta a szacharózon elért értékeket. Az extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás szempontjából három törzsnél tapasztaltam számottevően nagyobb értékeket szacharózon, mint raffinóz jelenlétében. Ezek a CBS 395.62a és b, valamint az ATCC 84400 jelzésű törzsek voltak. A legkiemelkedőbb  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokat továbbra is a CBS 395.62 jelzésű törzsből származó izolátumok mutatták. Ezen eredmények is alátámasztották, hogy az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimermentáció szempontjából legígéretesebb törzs a *T. lanuginosus* CBS 395.62b. A *Thermomyces lanuginosus* törzsek részletes analízise végett az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás mellett a fermentálé fehérjetartalmát és pH értékeit is megmértem. A fermentáció során tapasztalt legnagyobb aktivitás értékekhez tartozó adatokat foglaltam össze a 12. táblázatban.

**12. táblázat A vizsgált törzsek maximális aktivitásaihoz tartozó fehérje tartalmak és pH értékek**

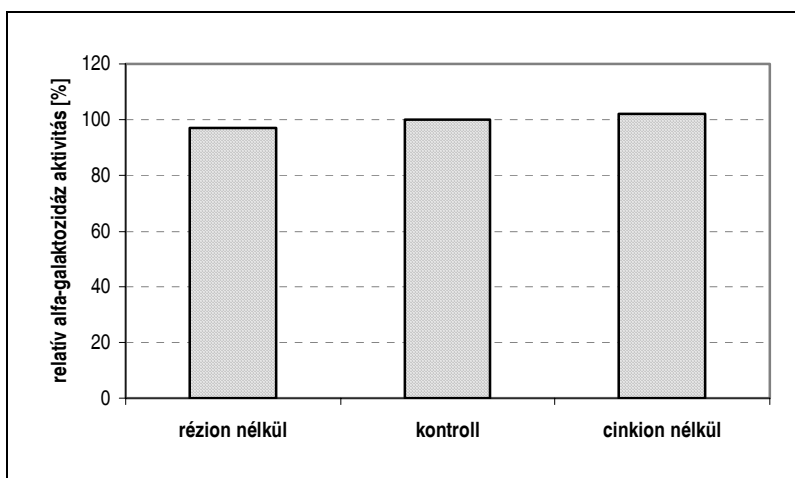
Törzs	Raffinóz					Szacharóz				
	Aktivitás [NE/ml]	Fehérje [mg/ml]	Spec.akt. [NE/mg]	pH	Ferm. idő [nap]	Aktivitás [NE/ml]	Fehérje [mg/ml]	Spec.akt. [NE/mg]	pH	Ferm. idő [nap]
ATCC 16455	22,27	8,17	2,73	7,8	6	9,88	7,68	1,29	7,8	5
ATCC 28083	0,33	6,00	0,06	7,5	7	0,06	7,10	0,01	7,6	7
ATCC 34626	0,36	5,60	0,06	7,7	7	0,87	7,02	0,12	7,6	6
ATCC 36350	4,42	4,63	0,95	7,7	7	5,44	3,83	1,42	7,9	5
ATCC 44008	11,97	7,59	1,58	7,7	5	12,69	6,81	1,86	7,8	5
ATCC 46882	2,60	2,94	0,88	7,7	7	3,11	3,28	0,95	7,7	7
ATCC 84400	5,54	7,30	0,76	7,9	5	10,33	8,98	1,15	7,7	6
CBS 218.34	14,16	3,69	3,84	7,9	6	9,95	4,13	2,41	7,8	6
CBS 224.63	6,84	5,74	1,19	8,1	6	6,81	5,14	1,32	8,1	6
CBS 288.54	1,29	3,77	0,34	8,1	7	1,86	4,26	0,44	8,1	7
CBS 395.62a	17,24	9,54	1,81	7,9	5	29,62	10,86	2,73	7,8	6
CBS 395.62b	24,28	9,26	2,62	7,8	7	29,76	9,74	3,06	8,0	6
DSM 5826	6,62	8,10	0,82	8,0	5	7,03	8,13	0,86	7,9	5
IMI 096218	3,45	4,54	0,76	7,9	6	2,63	4,91	0,54	8,1	6
IMI 110803	2,74	9,03	0,30	8,2	5	2,30	9,11	0,25	7,8	7
IMI 131010	6,94	10,54	0,66	8,2	4	6,72	8,93	0,75	8,1	3
IMI 140524	4,36	7,42	0,59	7,9	6	6,70	7,70	0,87	7,9	6

Az egyedi törzsek fehérje kiválasztás tekintetében nem mutattak szignifikáns eltérést a két vizsgált szénforrás alkalmazása esetén. A különböző törzsek fehérje szekréciójában azonban jelentős különbségek figyelhetők meg, ami arra utal, hogy a fehérje kiválasztás törzsre jellemző sajátosság. Az aktivitás értékekből és a fehérjetartalomról származtatott specifikus aktivitások alapján megállapítható, hogy a legjobb termelőképeséggel rendelkező törzsek specifikus aktivitásukat tekintve 1,5 és 4,0 NE/mg fehérje

tartományban található. Kiemelném, hogy szacharóz szénforráson a fehérjetartalomra vonatkoztatott legjobb specifikus aktivitásokat a CBS 395.62 jelzésű törzsek mutatták. A fermentáció enzimtermelési szakaszában a pH értékek 7,2 és 8,5 tartományban változtak.

#### 4.1.6 A tápközeg iontartalma és az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás közti összefüggés

A fermentációs tápközegben alkalmazott Vogel-féle nyomelem oldatban lévő összetevők közül elhagytam azon vegyületeket, amelyek irodalmi adatok szerint gátlólag hathatnak az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásra. Ezért 1 (m/v) % szacharóz és 0,45 % ammónium-acetát tartalmú tápközégeket állítottam elő, amelyek nem tartalmaztak réz-szulfátot, illetve cink-szulfátot. A fermentáció hatodik napján kapott maximális értékeknek a kontroll tápközegen mutatott aktivitásra vonatkoztatott százalékos arányát mutatom be a 21. ábrán.



21. ábra A tápközeg iontartalmának hatása az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások alakulására szacharóz 1 (m/v) %, ammónium-acetát 0,45 (m/v) %

A maximális  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokban a különböző iontartalommal készült tápközegeken vezetett fermentációknál szignifikáns eltéréseket nem tapasztaltam, mivel ezek a különbségek messze a kísérteimben tapasztalt 10-15 % hiba határon belül maradtak. Az alkalmazott koncentrációban a cink- és a rézionok az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokra gyakorolt negatív hatása nem volt bizonyítható, ugyanakkor létfontosságúak lehetnek a gomba növekedése szempontjából, ezért nem módosítottam a fermentációs tápközeg alapösszetevőit.

#### 4.1.7 A szacharóz és az ammónium-acetát koncentráció optimalizálása

Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás maximalizálására faktoriális és klasszikus egy faktoros kísérleteket terveztem és valósítottam meg. A kísérleti eredmények értékelésénél az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás mellett szempont volt az is, hogy a fermentációs idő minél rövidebb legyen.

### Központi elrendezésű kétszintű két faktoros kísérleti terv

A fermentációs alapösszetevőket a kísérleti tervben megadott koncentrációban egészítettem ki szacharózzal és ammónium-acetáttal. Minden fermentációt két párhuzamosban végeztem. Az 5. kísérletet, amely a kísérleti terv centrumában történt 3 párhuzamos vizsgálattal valósítottam meg. A kísérleti tervet szemlélteti a 13. táblázat.

**13. táblázat Központi elrendezésű kétszintű két faktoros kísérleti terv**

Kísérlet száma	Koncentrációk [(m/v) %]		Transzformált faktorkok	
	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	3	0,60	1	1
2	3	0,30	1	-1
3	1	0,60	-1	1
4	1	0,30	-1	-1
5	2	0,45	0	0

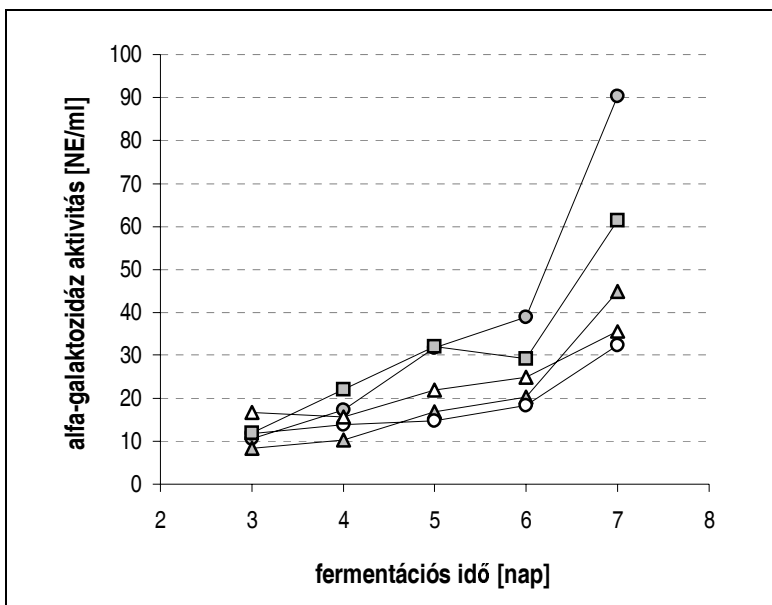
Z<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>: szacharóz

Z<sub>2</sub>, X<sub>2</sub>: ammónium-acetát

A kísérleti terv megvalósítása során kapott eredményekből szerkesztett diagramot mutatja a 22. ábra. A vizsgált faktorkok az adott tartományban nem voltak szignifikáns hatással az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásra. A kísérleti eredmények azonban rávilágítottak arra, hogy a szacharóz koncentráció növelése az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás növekedését eredményezi. Az 1. és a 2. kísérletek eredményeinek összevetése nyilvánvalóvá teszi, hogy az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás szempontjából fontos a szacharóz és az ammónium-acetát optimális arányának meghatározása.

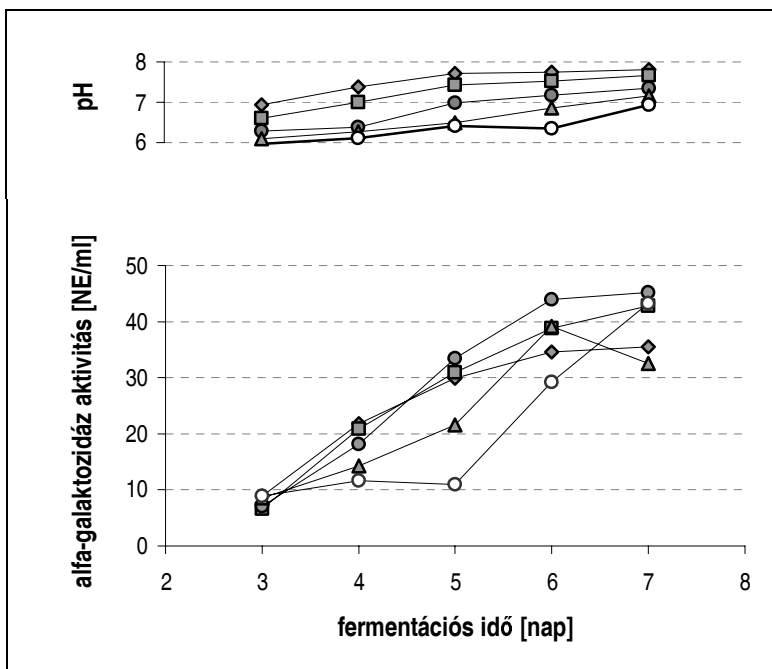
### A szacharóz koncentráció és az $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás közti összefüggés

Az optimális szacharóz koncentráció meghatározására 0,45 (m/v) % ammónium-acetát tartalmú tápközeget és 2, 2,5, 3, 3,5 és 4 (m/v) % szacharóz koncentrációkat alkalmaztam. A tápközeg készítésnél a szacharózt külön sterilizáltam. A fermentációs kísérlet eredményeit szemléltetem a 23. ábrán.



22. ábra Központi elrendezésű kétszintű két faktoros kísérleti terv eredményei

1. kísérlet ●, 2. kísérlet ▲, 3. kísérlet ○, 4. kísérlet △, 5. kísérlet ■



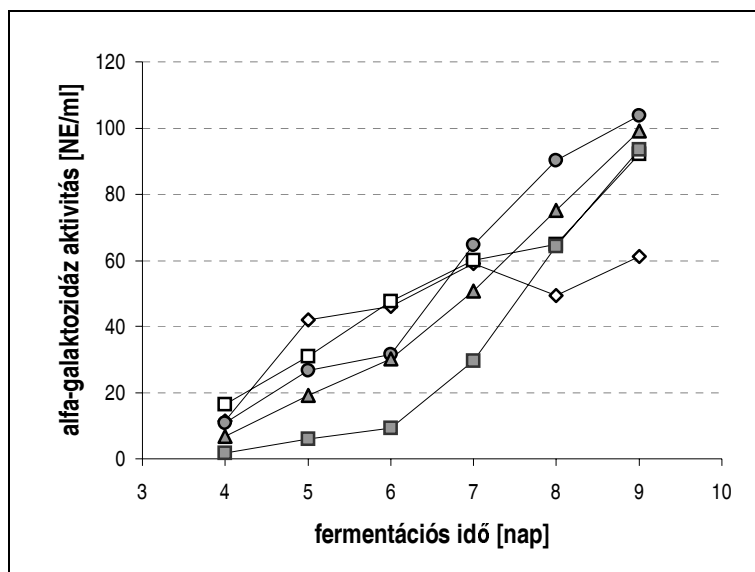
23. ábra *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktosidáz enzimtermelése különböző szacharóz koncentrációknál

ammónium-acetát 0,45 (m/v) %, szacharóz koncentráció (m/v) %: 2 ◆, 2,5 ■, 3 ●, 3,5 ▲, 4 ○

A 7 napos fermentációt értékelve megállapítható, hogy a legkisebb aktivitást a 2 (m/v) % szacharóz tartalmú tápközegen kaptam. A 3 (m/v) % szacharózt tartalmazó közegen tapasztaltam a legnagyobb aktivitás értéket, amely több mint 15%-kal meghaladta a 2 (m/v) % szacharóz tartalmú tápközegen elért aktivitást. A 3 (m/v) % szacharóznál nagyobb cukor koncentrációk alkalmazás esetén az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás növekedése csak késleltetve indult meg, amely a kedvezőtlen ozmotikus környezettel magyarázható. Az a tény, hogy 2,5, 3 és 4 (m/v) % szacharóz koncentrációjú tápközegeken is hasonló  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokat tapasztaltam, az ammónium-acetát koncentráció limitáló hatására utal. A fermentációs kísérlet pH értékei alapján megállapítható, hogy a termelési fázisban a pH értékek monoton növekednek, de a kezdeti szacharóz koncentrációval fordított arányban változnak. Minél nagyobb a kezdeti szacharóz koncentráció, annál kisebbek a pH értékek. Összegezve megállapítható, hogy mind pH tekintetében, mind az aktivitások szempontjából, valamint gazdasági megfontolásból is a legkedvezőbb szacharóz koncentráció a 3 (m/v) %.

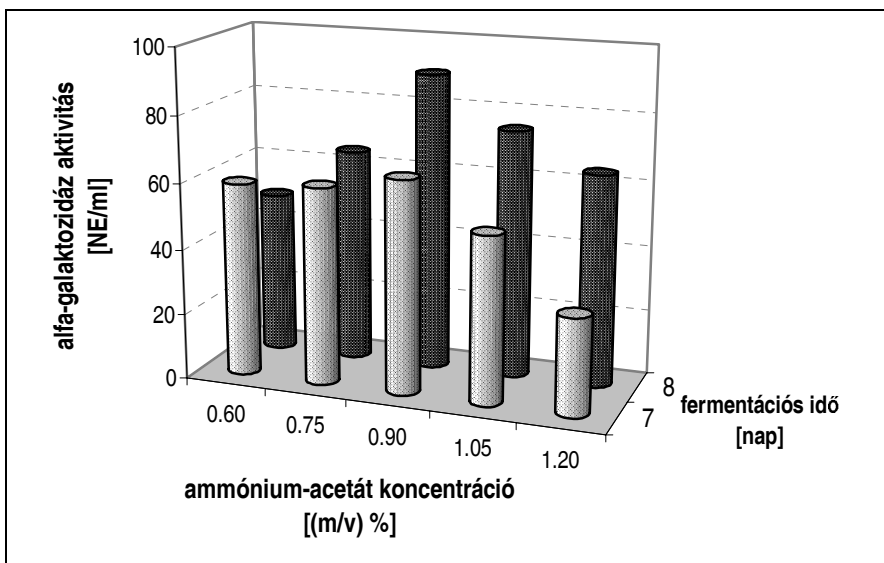
#### A szacharóz és az ammónium-acetát optimális arányának meghatározása

A szacharóz és az ammónium-acetát optimális arányának meghatározásához 3 (m/v) % szacharóz és különböző ammónium-acetát tartalmú tápközégeket készítettem. Az egyes tápközegeken az ammónium-acetát koncentrációt 0,6 (m/v) %-tól kiindulva 0,15 (m/v) %-os lépésekkel változtattam egészen 1,2 (m/v) %-ig. A tápközegek összeállításánál a szacharózt külön steriliztem. A fermentációs kísérletek  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásainak alakulását mutatom be a 24. ábrán. 7-8 napos fermentációs időt figyelembe véve állapítottam meg a maximális  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás biztosításához szükséges optimális ammónium-acetát koncentrációt (25. ábra). Ez az érték mindkét fermentációs idő esetében 0,9 (m/v) %-nak adódott.



**24. ábra** *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelése különböző ammónium-acetát koncentrációknál

szacharóz 3 (m/v) %, ammónium-acetát koncentráció (m/v) %: 0,6 ◇, 0,75 □, 0,95 ●, 1,05 ▲, 1,20 ■



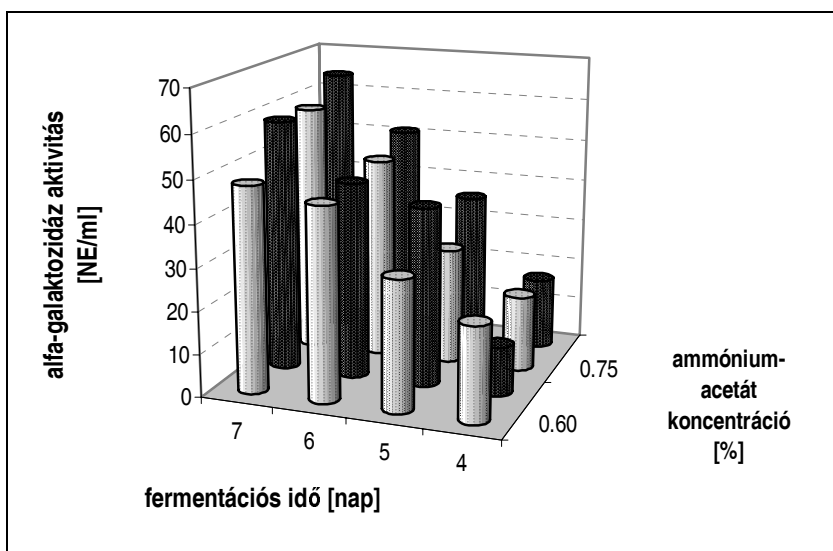
25. ábra *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktozidáz termelése különböző ammónium-acetát koncentrációknál szacharóz 3 (m/v) %

#### 4.1.8 Az enzimaktivitás növelése a fermentáció környezeti paramétereinek változtatásával

##### 4.1.8.1 A tápközeg elkészítésének módja és az $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelése közti összefüggés

A fermentációs kísérletek során felvetődött az a kérdés, hogy a tápközeg készítésénél az enzimtermelés szempontjából előnyös vagy hátrányos a szacharózt külön sterilizálni. Ennek a kérdésnek a megválaszolására olyan kísérleteket végeztem, amelyek 3 (m/v) % szacharózt és 0,6 illetve 0,75 (m/v) % ammónium-acetátot tartalmaztak. A fermentációs idő függvényében az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások alakulását mutatja a 26. ábra.

A fermentáció során az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások tekintetében kedvezőbb eredményeket értem el, ha a szacharózt a többi tápkomponenssel együtt sterilizáltam, így felesleges lépés a szacharóz külön történő sterilizése.

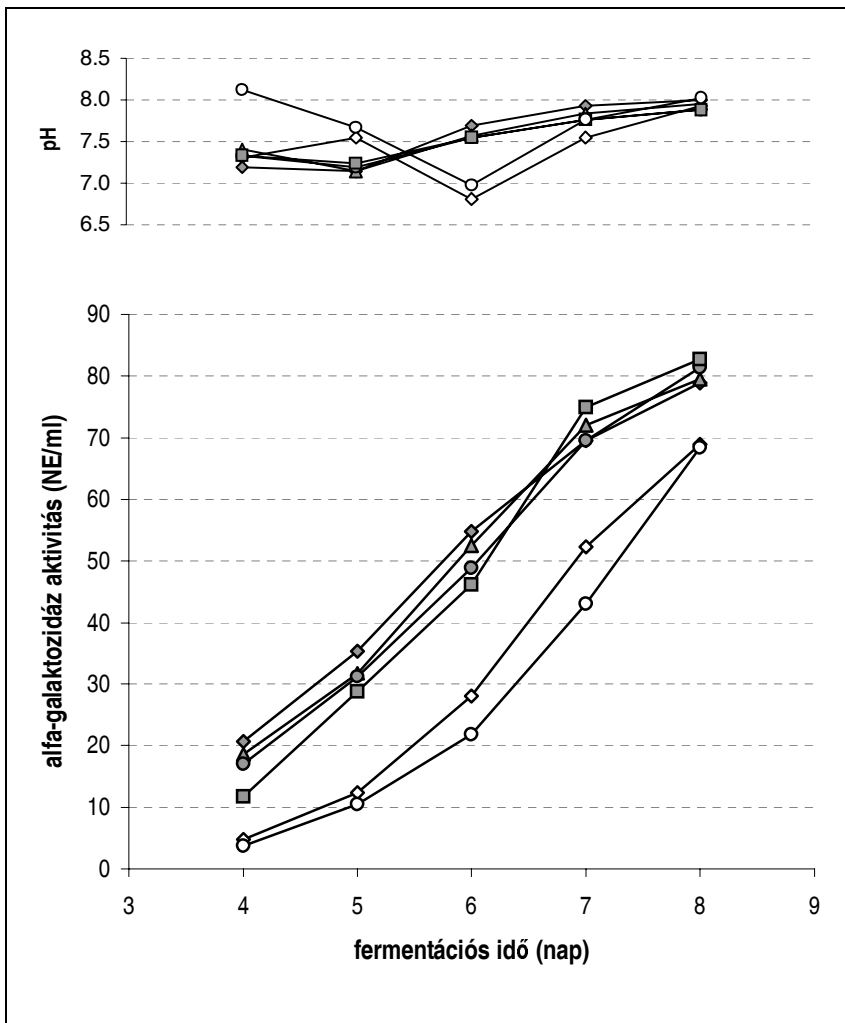


**26. ábra** Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitása alakulása és a tápközeg készítési módja közti összefüggés szacharóz 3 (m/v) %, külön sterilizelve: □, tápközeggel együtt sterilizelve ▨

#### 4.1.8.2 A pH szabályozás hatása az $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelésére

Tisztázni kívántam, hogy a fermentáció során a pH milyen hatással van az enzimaktivitások alakulására, ezért a rázott lombikos fermentációk során a pH szabályozást oly módon valósítottam meg, hogy pufferolt tápközegeket állítottam elő. A fermentációs kísérlethez 3 (m/v) % szacharóz és 0,9 (m/v) % ammónium-acetát tartalmú tápközegeket alkalmaztam. Az első kísérletsorozatban a tápközegek készítéséhez pH=5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 és 7,8 Mcllvaine puffereket használtam desztillált víz helyett. Kontrollként a desztillált vízzel készült tápközegen vezetett fermentáció szolgált. A két párhuzamos kísérlet eredményeinek átlag értékei a 27. ábrán kerültek bemutatásra.

A gombatorzs egyáltalán nem növekedett pH=5,5 pufferral készült tápközegben. Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások tekintetében igen hasonló lefutású görbéket kaptam a kontroll kísérletben és a pH=6,0 Mcllvaine pufferral készült tápközeg alkalmazásával. Ezen vizsgálatoknál a pH görbék azt mutatták, hogy a pH szabályozás nélküli kontroll kísérletben a fermentáció első szakaszában a pH értékek jóval magasabbak, mint a pH=6,0-ról induló fermentációnál. Mindkét közeg pH-ja a fermentáció 6. napjára pH=7,0 körüli értékre csökkent, majd fokozatosan növekedett és a 8. napra érte el a pH=8 értéket. A pH=6,5; 7,0; 7,5 és 7,8 Mcllvaine pufferral készült tápközegek alkalmazása esetén az enzimtermelésben szignifikáns különbség nem mutatkozott, de a termelési értékek jelentősen meghaladták a kontroll kísérletben elért titereket. Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelés fokozása érdekében és a tápközeg pH szabályozására a további kísérletekben a pH=7,5 puffert alkalmaztam.



27. ábra A tápközeg pufferolásának hatása az  $\alpha$ -galaktoszidáz fermentációjára

szacharóz 3 (m/v) %, ammónium-acetát 0,9 (m/v) % ;  
a tápközeg készítéséhez alkalmazott pufferek: pH=6,0 (◇), pH=6,5 (◆), pH=7,0 (▲), pH=7,5 (●), pH=7,8 (■),  
desztillált vízzel készített kontroll (○)

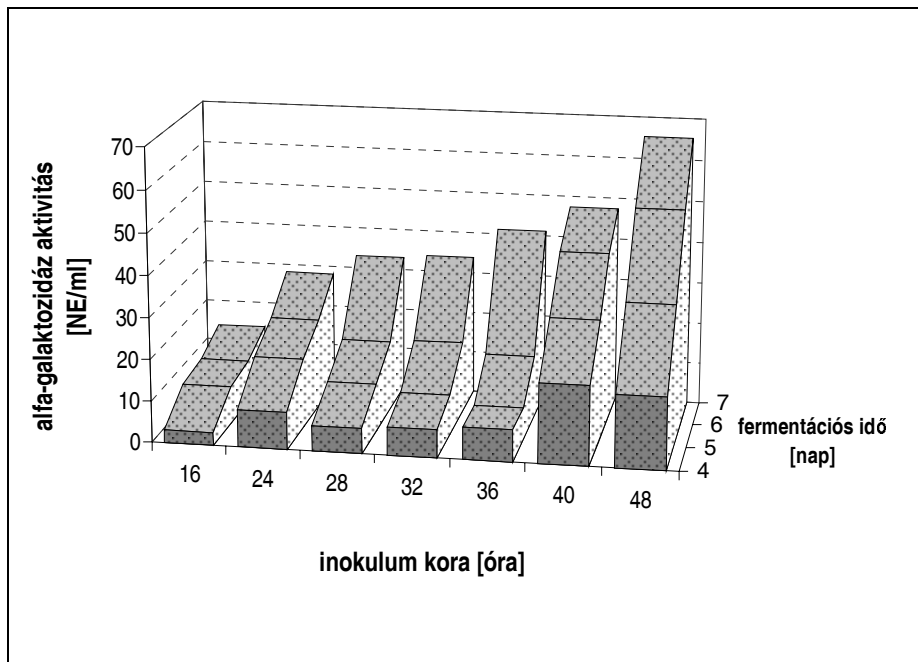
#### 4.1.9 Az inokulum tenyészet korának hatása az $\alpha$ -galaktoszidáz aktivitás alakulására

Az enzimfermentációs technológia standardizálása céljából az inokulum korát is optimalizálni kívántam. Különböző korú inokulum tenyészetekkel indítottam a fermentációkat. A vizsgálatoknál három párhuzamost alkalmaztam. A különböző korú inokulum tenyészetekkel oltott fermentációk  $\alpha$ -galaktoszidáz aktivitásainak átlagait mutatja a 28. ábra.

A túl fiatal tenyészetekkel, ahol a micélium még nem fejlődött ki teljesen, oltott fermentációknál az enzim kiválasztás nehezebben indult és a fermentáció során elért aktivitások is kisebbek voltak, mint a kifejlett



48 órás inokulum tenyészetekkel történő oltások esetén. 48 óránál idősebb tenyészeteknél már a micélium szétesését tapasztaltam és ezért alkalmatlannak ítéltam azokat az enzimfermentációk indításához.

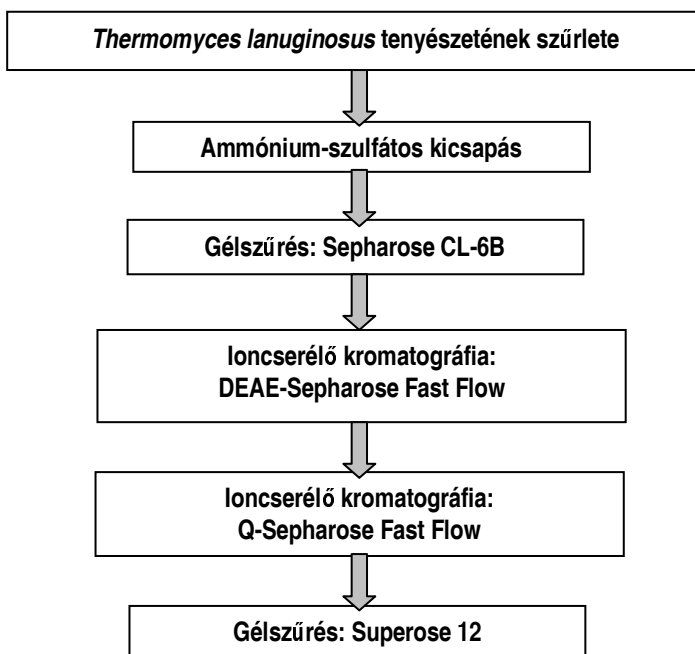


**28. ábra** Az inokulum korának hatása az  $\alpha$ -galaktózidáz aktivitás alakulására  
szacharóz 3 (m/v) %, ammónium-acetát 0,6 (m/v) %

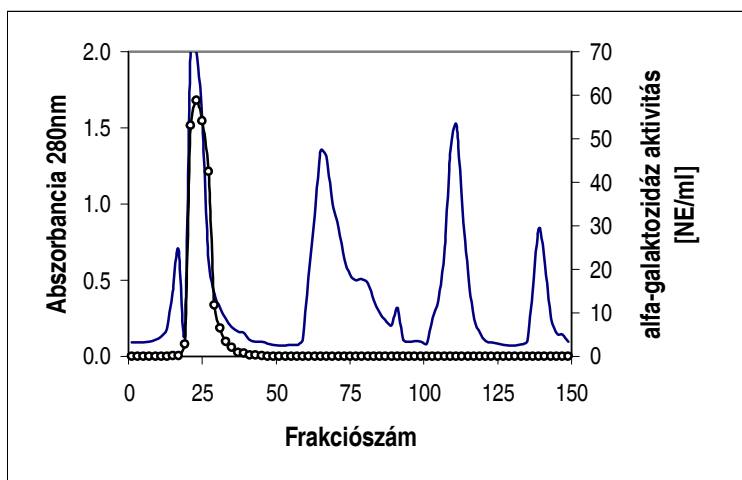
## 4.2 AZ ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM KINYERÉSE ÉS TISZÍTÁSA

Szacharóz/ammónium-acetát tartalmú tápközegben tenyésztett *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b törzs által kiválasztott  $\alpha$ -galaktózidáz enzim kinyerését és tisztítását ammónium-szulfátos kicsapással, ioncserélő kromatográfia és gélszűrés kombinációjával valósítottam meg. A tisztítás folyamata látható a 29. ábrán.

A kinyerés első lépéseként a gomba tenyészetének szűrletéből ammónium-szulfáttal (70 %-os telítettség) csaptam ki az enzimehénjét. A csapadékot centrifugálással gyűjtöttem össze és minimális mennyiségű pH=5,6 50 mM citrát-foszfát pufferban oldottam fel. Az oldatban lévő  $\alpha$ -galaktózidáz enzimet gélszűréssel (Sepharose CL-6B töltet) választottam el a kísérő fehérjéktől. Az oszlopot 0,2 % nátrium-azidot tartalmazó pH=5,5 20 mM citrát-foszfát pufferral hoztam egyensúlyba és 0,25 ml/perc áramlási sebesség mellett mostam le a fehérje frakciókat. A gélszűrés kromatogramját a 30. ábra mutatja.



29. ábra A *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének tisztítási lépései



30. ábra A gélszűrés kromatogramja

Sepharose CL-6B /5 cmx70 cm/ áramlási sebesség: 0,25 ml/perc  
 —o—  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitás; — abszorbancia 280nm

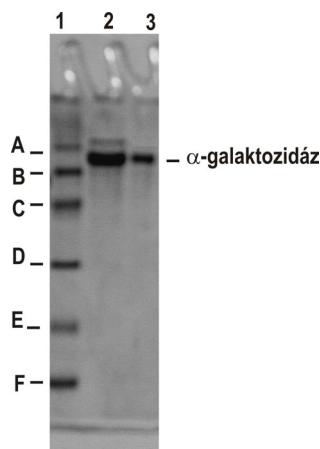
Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást mutató frakciókat (19-41. frakciók) egyesítettem, majd az így nyert enzimoldatot ultraszűréssel (Amicon) 20 mM pH=6,4 citrát-foszfát puffer alkalmazásával koncentráltam. A koncentrátumot FPLC rendszerhez kapcsolt 50 mM pH=6,4 citrát-foszfát pufferral egyensúlyba hozott DEAE-Sepharose Fast Flow (2,5 cm x 50 cm) anioncserélő oszlopra vittem. A megkötött fehérjéket 50 mM pH=6,4 citrát-foszfát pufferben 1 M NaOH segítségével létrehozott 0,1 és 0,4 M sógradiens tartományban

1,75 ml/perces áramlási sebesség mellett és 5 ml-es frakciókat gyűjtve eluáltam. Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást mutató frakciókat összeöntöttem és 20 mM pH=7,0 citrát-foszfát puffer alkalmazásával Amicon ultraszűrő berendezésen koncentráltam. A koncentrátumot 30 mM citrát-foszfát pH=7,0 pufferral egyensúlyba hozott Q-Sepharose Fast Flow töltetű erős anioncserélő oszlopra (1 cm x 30 cm) vittem, majd 50 mM nátrium-foszfát pufferban előállított 0,05-0,4 M nátrium-klorid gradienssel történt a fehérjék frakcionálása. Az alkalmazott áramlási sebesség 1,5 ml/perc volt. Az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitással rendelkező frakciókat egyesítettem, és koncentráltam. Az enzim tisztítás utolsó lépéseként a fehérje oldatot 2 cm x 60 cm hosszúságú Superose 12 töltetű gélszűrő oszlopra vittem, amelyet előzőleg 0,2 % nátrium-azidot tartalmazó 20 mM pH=5,4 citrát-foszfát pufferral hoztam egyensúlyba. Az eluálás 0,25 ml/perc áramlási sebesség mellett ugyanezzel a pufferral történt. Az  $\alpha$ -galaktozidáz tartalmú frakciókat egyesítettem és desztillált vízzel szemben dializáltam, majd az enzimefehérjét liofilizáltam. Az egyes tisztítási lépések jellemző adatait a 14. táblázatban foglaltam össze.

**14. táblázat** *Thermomyces lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim tisztítása

Művelet	Összes aktivitás [NE]	Összes fehérje [mg]	Specifikus aktivitás [NE/mg]	Kitermelés [%]	Tisztulás
Fermentlé	7000	439,8	15,92	100	1,0
Kisózás	6900	160,4	43,02	98	2,7
Sepharose CL-6B	6741	65,5	102,92	96	6,5
DEAE-Sepharose	6050	20,3	298,03	86	18,7
Q-Sepharose	5450	4,7	1159,57	78	72,9
Superose 12	4170	2,3	1813,04	59	113,9

A kidolgozott és a megvalósított enzimművelési és tisztítási eljárással a homogenitásig tisztított enzimet mintegy 59 %-ban sikerült kinyerni és megközelítően 114-szeres specifikus aktivitás növekedést értem el. A SDS-PAGE alapján kapott egyetlen fehérje sávot mutató elektroforetogram bizonyítja, hogy a kinyert enzim homogén (31. ábra).



### 31. ábra *Thermomyces lanuginosus* eredetű $\alpha$ -galaktozidáz enzim elektroforetogramja

1. sáv: Molekulatömeg markerek: A: foszforiláz [94 kDa], B: bovin szérum albumin [67 kDa], C: ovalbumin [43 kDa], D: anhidráz [30 kDa], E: szója tripszin inhibitor [20,1 kDa], F:  $\alpha$ -laktalbumin [14,4 kDa]
2. sáv: Fehérje oldat a Superose 12 tölteten való gélszűrés előtt
3. sáv: A homogenitásig tisztított  $\alpha$ -galaktozidáz enzim.

## 4.3 *THERMOMYCES LANUGINOSUS* EREDETŰ ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIM JELLEMZÉSE

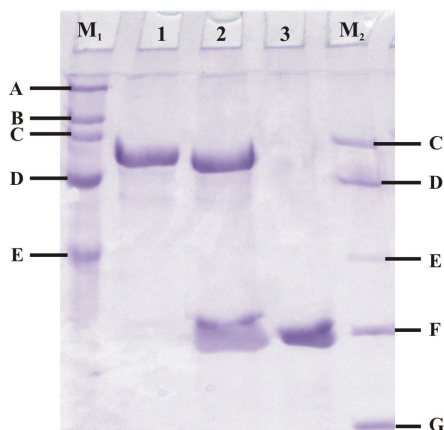
### 4.3.1 Molekulatömeg és izoelektromos pont

A homogenitásig tisztított egy dimenziós SDS-PAGE mintázatot 1-D Analysis v2.4b szoftverrel (Signum/Biotech Fisher GmbH, Germany) feldolgozva a tiszta enzim móltömege 92-94 kDa-nak adódott és izoelektromos pontja  $pI=3,9-4,1$  tartományban volt. A fonalgomba eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek molekulatömegei 41-87 kDa tartományban találhatóak és izoelektromos pontjuk  $pI=3,73-7,0$  értékek között változik (Zapater et al., 1990; Ríos et al., 1993; Adya & Elbein, 1977; Civas et al., 1984a; Shibuya et al., 1997; Dey et al., 1993; Shibuya et al., 1995a; Luonteri et al., 1998a; Brumer III et al., 1999; Mitsutomi & Ohtakara, 1984; Golubev & Neustroev, 1993; Zeilinger et al., 1993). Az általam izolált  $\alpha$ -galaktozidáz enzim a fenti tartományok szélsőértékeit képviseli. A meghatározott molekulatömeg, ha kis mértékben is, de meghaladja az eddig leírt legnagyobb  $\alpha$ -galaktozidáz monomerek molekulatömeget és a meghatározott izoelektromos pont legkisebb izoelektromos ponttal rendelkező enzimekével ( $pI=4,1$ ) mutat hasonlóságot (Shibuya et al., 1995a; Scigelova & Crout, 2000).

### 4.3.2 A szénhidrátartalom

Kémiai összetételét tekintve az enzim 5,3 % szénhidrátartalommal glikoproteinnek bizonyult. Ezen belül 56 % D-mannóz, 36 % D-glükózamin, 8 % galaktóz és kisebb, mint 1% glükóz tartalmat mutattam ki. Enzimes deglikolizálással is bizonyítást nyert, hogy az előállított  $\alpha$ -galaktozidáz enzim glikoprotein. Ezt

szemlélteti a 32. ábra, ahol SDS-PAGE mintázat alapján megállapítható, hogy a kezelt enzim molekulatömege csökkent és ennek megfelelően elektroforetikus mobilitása növekedett.



**32. ábra Endoglikozidáz H enzimmel emésztett  $\alpha$ -galaktozidáz enzim elektroforetogramja**

A mintákat 7,5 % SDS-PAGE-re vittem fel.

M<sub>1</sub>: nagy molekulatömegű kalibráló fehérjék

M<sub>2</sub>: kis molekulatömegű kalibráló fehérjék

1. sáv: glikolizált enzim

2. sáv: N-deglikolizált enzimfehérje

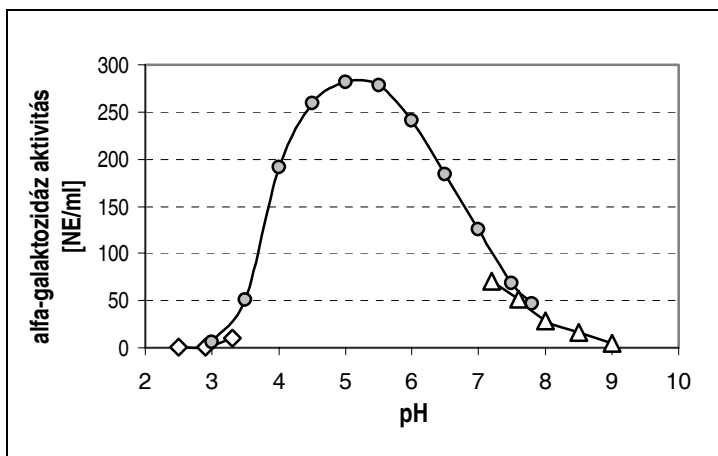
3. sáv: endoglikozidáz H enzim

Ezek az eredmények összhangban vannak az irodalmi adatokkal, mivel az eukarióta eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek jellemzően glikoprotein jellegűek, azonban itt is található kivétel. Ilyen a Zeilinger és munkatársai (1993) által tisztított enzim, amely nem tartalmazott kovalensen kötött szénhidrát részt.

### 4.3.3 A készítmény pH optimuma

A tisztított enzimmészítmény aktivitásának pH függését vizsgáltam a pH=2,5-9,0 tartományban – glicin/HCL, McIlvaine és TRIS/HCl pufferek alkalmazásával – 58°C-on végrehajtott aktivitásméréssel. A kapott  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásokat a 33. ábra szemlélteti.

A tiszta enzimmészítmény optimális pH tartománya az enzimaktivásra vonatkoztatva pH=5,0-5,5 között található. Ez összhangban van az irodalmi adatokkal, mivel a *T. lanuginosus* IMI 158749 gomba által szintetizált  $\alpha$ -galaktozidáz pH optimuma 4,5-5,0 (Puchart et al., 2000) és a *Humicola* sp.-ből tisztított  $\alpha$ -galaktozidáz enzimé 5,0 (Kotwal et al., 1999). A gombaeredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimek optimális pH értékeit tekintve, az általam előállított enzimmészítmény a legnagyobb pH optimummal rendelkező enzimek közé sorolható.

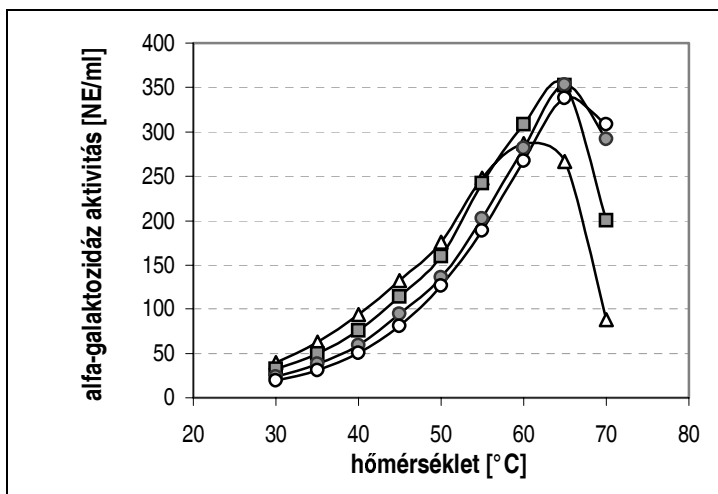


33. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimkészítmény aktivitásának pH függése

Alkalmazott pufferek: glicin/HCl ◇, Mclvaine ●, TRIS/HCl △

#### 4.3.4 A hőmérséklet optimum

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimkészítmény hőmérséklet optimumának meghatározását Mclvaine puffert használva az optimális pH tartomány környezetében végeztem el p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid szubsztrátumon történő aktivitásméréssel. A 34. ábrán bemutatott kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a környezet hidrogénion koncentrációja hatással van az enzimaktivitás hőmérséklet optimumára. A vizsgálati körülmények között pH=4,5-nél az optimális hőmérséklet 60 °C, míg pH=5,0-6,0 tartományban a 65 °C hőmérsékletet találtam optimálisnak. Puchart és munkatársai szentjánoskenyér eredetű galaktomannánon előállított *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim hőmérséklet optimumaként a 65-70 °C közötti tartományt adják meg.



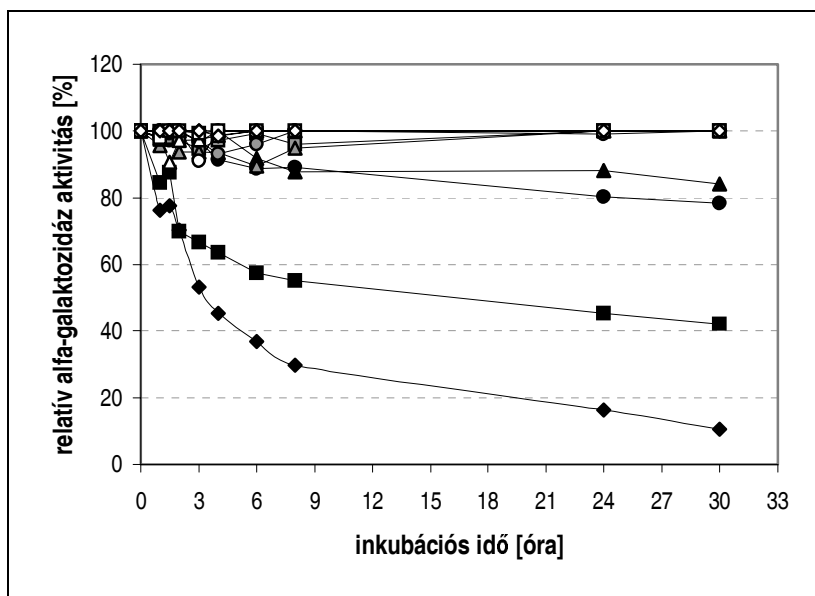
34. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimkészítmény aktivitásának hőmérséklet függése

Az enzimaktivitás méréseknél alkalmazott pH értékek: pH=4,5 △, pH=5,0 ■, pH=5,5 ●, pH=6,0 ○

A 65 °C hőmérséklet optimum fonalgomba eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimekre nézve a felső határt jelenti, amely ipari felhasználás szempontjából kedvező érték, de az enzimmalkalmazási kísérletek szempontjából fontos információt szerezni az enzim stabilitására vonatkozóan.

#### 4.3.5 Enzimstabilitási vizsgálatok eredményei

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmérszítmény stabilitását 40-80 °C-os hőmérsékleti tartományban és különböző hidrogénion koncentrációjú közegben meghatározott időközönkénti mintavételezéssel vizsgáltam 30 óra hosszat. A pufferoláshoz Mcllvaine (pH=4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 és 7,5) és TRIS/HCl (pH=7,5; 8,0; 8,5 és 9,0) pufferokat alkalmaztam. A kapott adatokat több szempontból is feldolgoztam a stabilitás értékeléséhez. Különböző pH-jú környezetben a 40 °C-on mért aktivitási értékeket az idő függvényében mutatja a 35. ábra.



35. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmérszítmény aktivitásának változása különböző pH-jú környezetben 40 °C-on inkubálva

Mcllvaine pufferok  
 pH=4,0 —◆—, pH=4,5 —■—, pH=5,0 —●—, pH=5,5 —●—, pH=6,0 —◆—, pH=6,5 —■—, pH=7,0 —▲—, pH=7,5 —●—  
 TRIS pufferok  
 pH=7,5 —○—, pH=8,0 —△—, pH=8,5 —□—, pH=9,0 —◇—

Az enzimmérszítmény 40 °C-on pH=6,0–9,0 tartományban 30 órás inkubálás során stabilnak bizonyult, míg pH=5,0-5,5 közötti tartományban megtartotta aktivitásának mintegy 80 %-át és pH=4,5-nél több mint 40 %-át. pH=4,0-nél az enzimaktivitás felezési ideje 3,4 órának adódott.

Az enzimeszítvány 45 °C-on inkubálva 30 órán át pH=5,5-9,0 tartományban stabilnak bizonyult, pH=5,0 értéknél, mintegy 60 %-át és pH=4,5-nél 50 %-át tartotta meg a kiindulási aktivitásának. pH=4,0 értéknél az enzimaktivitás felezési idejét 3,2 órának határoztam meg.

Az enzimet 50 °C-on különböző pH-jú környezetben hőkezelve az 30 órán keresztül pH=6,5-9,0 tartományban megtartotta a teljes aktivitását. pH=4,0-es környezetben inaktíválódott, míg pH=4,5 pH=5,0 mellett rendre megtartotta aktivitásának 28 %-át és 70 %-át. pH=5,5 és pH=6,0 környezetben az eredeti aktivitás mintegy 90 %-a volt mérhető.

55 °C-on 30 óráig inkubálva az enzimet pH=4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 és 9,0 pufferekben az eredeti aktivitásnak rendre 12, 50, 66, 67, 100, 76, 71, 82, 84 és 71 %-át mértem. pH=4,0-nél az enzim 4 órán belül inaktíválódott.

60 °C-on 24 óra hosszat tartó vizsgálatok során megállapítottam, hogy pH=4,0-nél 1 órán és pH=4,5-nél 7,5 órán belül inaktíválódott az enzim. pH=5,0-nél 52 %, pH=5,5-nél 58 %, pH=6,0-nál 68 %, pH=6,5-nél 75 %, pH=7,0-nél 79 %, pH=7,5-nél 45 %, pH=8,0-nál 51%, pH=8,5-nél 59 % és pH=9,0-nél 19 % maradék aktivitást mértem vissza.

Az enzimeszítvány 65 °C-on történő kezelés során pH=4,0-nél 20 percen, pH=4,5-nél 40 percen, pH=7,5-nél, pH=8,5-nél és pH=9,0-nél 3 órán, pH=5,0-nél 4 órán, pH=5,5-nél és pH=7,0-nél 5 órán belül inaktíválódott, pH=6,0 és pH=6,5-nél 6 óra múlva is megtartotta az enzim aktivitásának több, mint 40 %-át és pH=8,0-nál 10 %-nyi aktivitás maradt.

70 °C-on és e feletti hőmérsékleteken történő inkubálás során az enzimeszítvány nagyon rövid időn belül inaktíválódik.

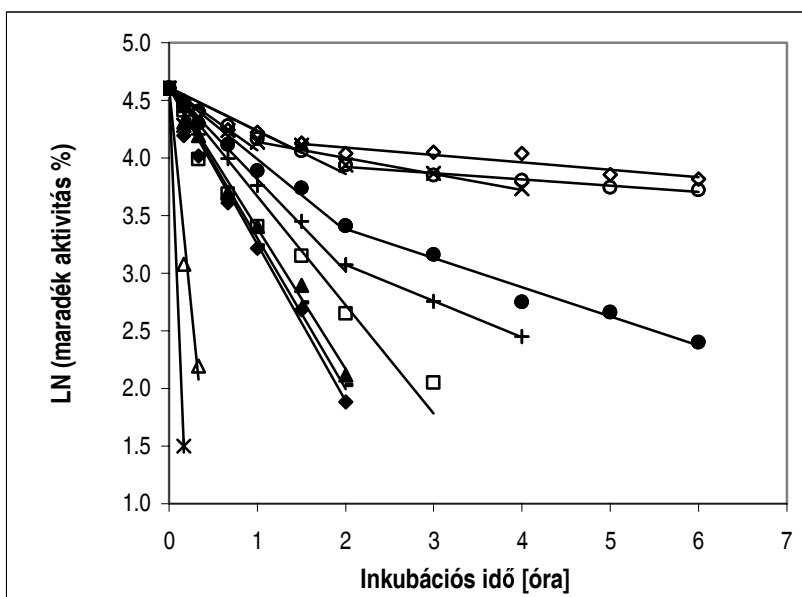
Az enzimek stabilitása jellemezhető az inaktíválási sebességi állandóval ( $k$ ), amely az alábbi egyenlet segítségével kiszámítható:

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) \cdot 100 = k \cdot t$$

ahol  $t$ : idő,  $A_0$ : kiindulási aktivitás  $A_t$ :  $t$  időpontban mért aktivitás

A 65 °C-on kapott mérési adatokhoz illesztett egyenesek láthatók a 36. ábrán és a meghatározott sebességi állandók kerültek összefoglalásra a 15. táblázatban, amelyekből megállapítható, hogy egyes esetekben a mérési adatok két egyenessel írhatók le. Azokban az esetekben, ahol a linearizálás során a mért értékek két független egyenest határoztak meg, az inaktíválódás létrejöttében több tényező játszik szerepet. A meghatározott inaktíválódási sebességi állandók a pH növekedésével csökkennek és abszolút értékben a legkisebb értékeket pH=6,0-6,5 tartományban határoztam meg. Ezt követően az inaktíválódási sebességi állandók abszolút értékei ismét növekedtek. pH=7,0-9,0 tartományban végzett vizsgálatoknál a sebességi állandóknál tapasztalt kiugró értékek magyarázatoként szolgálhat, hogy puffer váltás történt, mivel pH=8,0-9,0 tartományban TRIS/HCl puffert alkalmaztam.





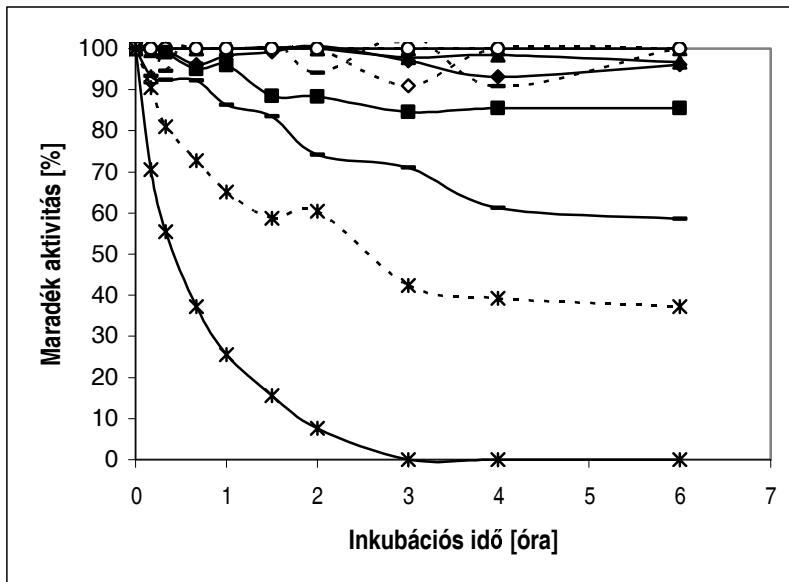
36. ábra Különböző pH-jú környezetben 65 °C-on történő inkubálás során az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások természetes alapú logaritmusa az idő függvényében ábrázolva

A vizsgálatoknál alkalmazott pH értékek: pH=4,0 X, pH=4,5  $\Delta$ , pH=5,0  $\square$ , pH=5,5  $\times$ , pH=6,0  $\diamond$ , pH=6,5  $\circ$ , pH=7,0  $+$ , pH=7,5  $-$ , pH=8,0  $\bullet$ , pH=8,5  $\blacklozenge$ , pH=9,0  $\blacktriangle$

15. táblázat Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimesztítmény 65 °C-on meghatározott inaktiválódási sebességi állandói

Sebességi állandó [h <sup>-1</sup> ]	pH										
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0T	8,5T	9,0T
k <sub>1</sub>	-18,3	-7,68	-0,94	-0,54	-0,38	-0,38	-0,80	-1,31	-0,62	-1,36	-1,22
k <sub>2</sub>				-0,14	-0,06	-0,05	-0,31		-0,25		

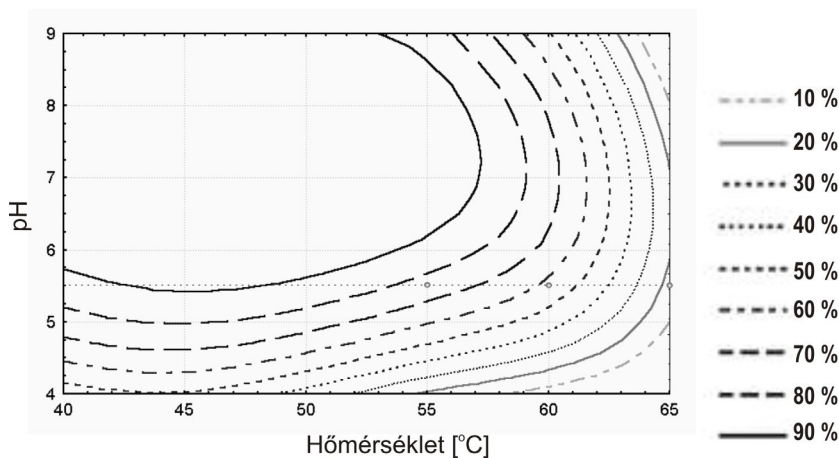
A puffer minőség és az enzimaktivitás közötti összefüggés felderítésére McIlvaine és TRIS/HCl pufferekben (pH=7,5) különböző hőmérsékleteken vizsgáltam az enzimaktivitások alakulását 6 óras időintervallumban. Ezen adatokat foglalja össze a 37. ábra, amelyből megállapítható, hogy a TRIS/HCl pufferben történő inkubálás kedvezőbb az enzimaktivitás megőrzése szempontjából. A különböző pufferek alkalmazása még azonos koncentrációban és pH értéknél is eltérő ionerősségű lehet, amely közvetett módon hathat az enzimszerkezetre (Segel, 1975). Az aktivitás görbéken látható törések feltehetően azzal magyarázhatók, hogy a pH okozta inaktiválódás során az enzim kezdeti és végállapota között átmeneti állapotok jöhetnek létre. Ez azt jelenti, hogy az enzimmolekulának számos ionizációs formája lehet (Chitnis & Sadana, 1989).



37. ábra Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimkészítmény aktivitásának alakulása különböző hőmérsékleteken pH=7,5 TRIS/HCl és McIlvaine pufferek jelenlétében inkubálva

McIlvaine pufferekben vizsgálva  
 40°C —◆—, 45°C —▲—, 50°C —●—, 55°C —■—, 60°C —□—, 65°C —×—  
 TRIS/HCl pufferekben vizsgálva  
 40°C -◇-, 45°C -△-, 50°C -○-, 55°C -□-, 60°C -■-, 65°C -×-

Az enzimalkalmazási vizsgálatok szempontjából fontosnak tartottam egy olyan megközelítést és ábrázolást is, amely szemléletesen mutatja a hőmérséklet és a pH együttes hatását az enzim stabilitására. Az enzim stabilitását vizsgálva a pH-t és a hőmérsékletet választottam független változóknak és a maradék aktivitás szolgált függőváltozóként. A legkisebb négyzetek módszerét használtam a kísérleti adatok közelítésére. A 24 órás inkubáció során a százalékos relatív  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások alakulását mutatja a 38. ábra.



38. ábra 24 órás inkubációt követően a maradék enzimaktivások százalékos értékei különböző környezeti paramétereknél

Az illesztett modell segítségével megállapítható, hogy az enzimek készítmény 55 °C-on pH=6,4-8,3 tartományban történő inkubálás során legalább 1 napig megőrzi aktivitását és az optimálisnak meghatározott pH=5,5 értéknél visszamérhető az aktivitás 76 %-a. Ezen időtartam alatt az enzim elveszti az aktivitását 65 °C-on vagy felett. A 65 °C-os hőmérséklet optimummal rendelkező *Humicola* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim csupán 60 percig őrizte meg aktivitását 55 °C-on (Kotwal et al., 1999). Talbot és Sygusch (1990) *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének stabilitását vizsgálva megállapította, hogy a 24 órás 60°C-on történő hőkezelés során megtartotta aktivitását, de 65 °C-on már elveszítette aktivitásának 30 %-át. Thippeswamy és Mulimani (2002) *Giberella fujikuroi* eredetű enzimet állítottak elő és 55 °C-on (0,2 M acetát puffer pH=5,5) vizsgálták annak hőstabilitását mind szabad, mind rögzített formában. 24 órás inkubálás után az oldott szabad enzim aktivitásának 44 %-át, míg a rögzített enzim 36%-át tartotta meg. Háromnapos hőkezelést követően az oldatban lévő enzim kezdeti aktivitásának csupán 6 %-a, míg az immobilizált enzim 17 %-a volt visszamérhető.

A *T. lanuginosus* CBS 395.62b eredetű tiszta  $\alpha$ -galaktozidáz enzim vizes oldatban gyorsan inaktiválódik. Hűtőszekrény hőmérsékletén tárolva 4-5 nap alatt elveszti aktivitásának 60-70 %-át. Az enzim stabilis fagyasztva szárítva vagy oldott formában 10-20 % NaCl jelenlétében. Puchart és munkatársai (2000) *T. lanuginosus* IMI 158749 eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim stabilizálására marha szérumalbumint használtak.

#### 4.3.6 Fémionok hatása az enzim aktivitására

A különböző fémionok enzimaktivitásra gyakorolt hatását mutatja a 16. táblázat. A vizsgálatok aktivitásmérésén keresztül történtek.

16. táblázat Különböző fémionok hatása az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitására

Ionok [10 mM]	$\alpha$ -galaktozidáz aktivitás [NE/ml]	Relatív aktivitás [%]
Mn <sup>++</sup>	211	113
K <sup>+</sup>	197	106
Mg <sup>++</sup>	192	103
Kontroll	186	100
Co <sup>++</sup>	164	88
Ni <sup>++</sup>	162	87
Cu <sup>++</sup>	158	85
Ca <sup>++</sup>	24	13
Zn <sup>++</sup>	12	6
Hg <sup>++</sup>	6	3
Ag <sup>+</sup>	0	0

Az irodalmi adatok alapján a  $Mn^{++}$ , a  $Mg^{++}$  az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim kofaktorai lehetnek és a  $K^+$  aktivátorként szerepelhet. E megfigyeléseket kísérleti eredményeim is alátámasztják. 10 mM  $Mn^{++}$  koncentráció alkalmazása a reakció elegyben mintegy 13%-os aktivitás növekedést eredményezett.  $Mn^{++}$  aktiváló hatását mutatták ki *Lactobacillus fermentum* 236 (Garro et al., 1993) és *Bifidobacterium longum* CRL 849 (Garro et al., 1994) jelzésű törzsek  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeinél is. Ezzel ellentétes megfigyelések is fellelhetők az irodalomban pl. a *Lactobacillus fermentum* CRL 251 jelzésű törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enziménél 10 mM koncentrációban jelenlévő  $Mn^{++}$  nem befolyásolta az aktivitást (Garro et al., 1993). *Penicillium janthinellum* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim esetében kimutatták, hogy a  $Mn^{++}$  5 mM koncentrációban 30% aktivitás növekedést eredményezett, de 10 mM koncentrációban már nem gyakorolt hatást az enzim az aktivitásra (Elshafei et al., 1993).

A  $Mg^{++}$  és a  $K^+$  ionok csak kis mértékű enzimaktivitás növekedést ( $Mg^{++}$ -nál 3 %,  $K^+$ -nál 6 %) okoztak a méréseim során. Ez nem tekinthető szignifikáns hatásnak. Hasonló adatok azonban fellelhetők a szakirodalomban is: *Monascus pilosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmél 1 mM-os koncentrációban mind a  $Mg^{++}$ , mind a  $K^+$  4 % aktivitás növekedést idézett elő (Wong et al., 1986). Néhány esetben 1-3 % aktivitás csökkenésről is beszámoltak (Garro et al., 1993; Garro et al. 1994; Garro et al., 1995). A  $K^+$  ion általában nincs hatással a mikroba eredetű  $\alpha$ -galaktozidázok aktivitására.

12-15 % aktivitás csökkenést tapasztaltam a  $Co^{++}$ , a  $Ni^{++}$  és a  $Cu^{++}$  ionok jelenlétében. A  $Cu^{++}$  enyhén gátló hatását más mikrobáknál is tapasztalták (pl. *Lactobacillus fermentum* CRL 251 és CRL236 jelzésű törzsnél) (Garro et al., 1993). 1 mM  $Cu^{++}$  a *Monascus pilosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enziménél erős inhibitornak bizonyult, 69%-kal csökkentve az enzimaktivitást (Wong et al., 1986).  $Ni^{++}$  ionok jelenléte néhány prokarióta eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim esetében pozitív hatást gyakorolt az enzimaktivitásokra (Garro et al., 1993; Garro et al., 1994).

A  $Ca^{++}$ , a  $Zn^{++}$  és a  $Hg^{++}$  ionok erősen gátolták az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim működését és  $Ag^+$  jelenlétében az enzim teljesen inaktívvá vált. *Candida guilliermondii* H-404 élesztő mindkét izoenzimét szinte teljesen inaktíválta már 1 mM  $AgNO_3$  és 1 mM  $HgCl_2$  (Hashimoto et al., 1992).  $Hg^{++}$  által okozott inaktíválódást *Penicillium janthinellum* (Elshafei et al., 1993) és *Lactobacillus fermentum* CRL 236 és CRL 251 törzsek  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeinél (Garro et al., 1993) is kimutattak. Az  $Ag^+$  és a  $Hg^{++}$  által okozott gátlás az összes vizsgált  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmél érvényesült. A fémionok közül már kis koncentrációban is a  $Hg^{++}$  gátló hatása a legerősebb. Az  $Ag^+$  inhibíciós hatása talán annak köszönhető, hogy reakcióba lép az aktívcentrumban található karboxil-csoportokkal és hisztidin molekulával (Wong et al., 1986). A  $Hg^{++}$  pedig az enzim aktívcentrumának katalitikus helyén lévő tiol-csoportokhoz kötődve átmeneti komplexet képez, így az aktivitás megszűnését, vagy jelentős csökkenését eredményezi. A fémionok (az  $Ag^+$ -re is jellemző) ilyenkor komplexet képezve katalizálják az SH-csoportok oxidációját. Az oxidáció eredményeként diszulfid S-S kötés alakul ki két tiol-csoport között (Sümegei, 1997).

A Zn<sup>++</sup> hatására a *Lactobacillus fermentum* CRL 236 és CRL, a *Bifidobacterium longum* CRL 849 jelzésű baktérium törzseknél és *Monascus pilosus* fonalgombánál maximum 25%-os aktivitás csökkenést tapasztaltak, ellentétben az általam kapott eredménnyel, ahol közel 93%-os aktivitás veszteség lépett fel.

A Ca<sup>++</sup> az általam vizsgált *Thermomyces lanuginosus*  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktivitást 87 %-kal lecsökkentette.

#### 4.3.7 Enzimkinetikai vizsgálatok eredményei

A kinetikai paraméterek meghatározása során a szintetikus p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid és a raffinóz hidrolízisét 0,15 mM, és 7,5 mM koncentráció tartományban vizsgáltam, míg a sztachióz esetében a vizsgált koncentráció tartomány 0,5 mM és 10 mM volt. A kinetikai adatokat Hanes-Woolf (Segel, 1975) módszerével határoztam meg és a 17. táblázatban adom közre.

17. táblázat *T. lanuginosus* CBS 395.62b  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének kinetikai paraméterei

Szubsztrátum	K <sub>m</sub> [mM]	V <sub>max</sub> [ $\mu$ mol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> ]
p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid	1,13	2498
raffinóz	1,61	4434
sztachióz	1,17	4889

(A K<sub>m</sub> és V<sub>max</sub> értékek meghatározása Hanes-Woolf módszerrel történt)

A K<sub>m</sub> értékek alapján az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimnek a legnagyobb affinitása a szintetikus szubsztrátumhoz van, közel azonos affinitást mutat a tetramer szerkezetű sztachióza nézve, amely két  $\alpha$ -galaktozidos kötéssel kapcsolódó galaktóz molekulát tartalmaz. A vizsgált szubsztrátumok közül a raffinózzal szemben mutatja a legkisebb affinitást az enzim. Összegzésként megállapítható, hogy nem tapasztalható jelentős különbség az enzim affinitásában különböző lánchosszúsággal rendelkező  $\alpha$ -D-galaktozidokra, illetve az eltérő aglikon egységeket tartalmazó oligoszacharidoknál. A maximális reakció sebesség tekintetében meghatározó a szubsztrátum aglikon része. A legkisebb V<sub>max</sub> értéket a szintetikus szubsztrátumon kaptam, míg az oligoszacharidokon tapasztalt V<sub>max</sub> értékek jelentősen nagyobbak voltak. A legnagyobb értéket sztachióz szubsztrátumon mértem, ahol egy két szubsztrátumos kinetikai rendszer valósul meg, mivel a sztachióz hidrolízise során keletkező raffinóz szintén szubsztrátuma az enzimnek. A kinetikai paraméterek tekintetében igen jelentős eltérések találhatók az irodalomban. Ezek az eltérések nemcsak azzal magyarázhatók, hogy a vizsgált enzimek igen különböző forrásokból származnak, hanem azzal is hogy az indukciós körülmények és nem utolsósorban meghatározási módjuk is különbözik. A szubsztrátumokra vonatkozó affinitási sorrend tekintetében eredményeim hasonlóságot mutatnak a *T. reesei* RUT C-30 eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmel (Zeilinger et al., 1993). Jelentős eltérések fedezhetők fel katalitikus tulajdonság tekintetében egy másik *T. lanuginosus* gombatörzs, az IMI158749 által galaktomannán növekedési szubsztrátumon szintetizált  $\alpha$ -galaktozidáz enzimhez viszonyítva (Puchart et al., 2000). Ez a törzs

hatékonyabban hidrolizálja a szintetikus p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid szubsztrátumot, mint a raffinózt, míg az általam vizsgált *T. lanuginosus* CBS 395.62b jelű törzs szacharózon szintetizált enziménél ennek ellenkezője tapasztalható.

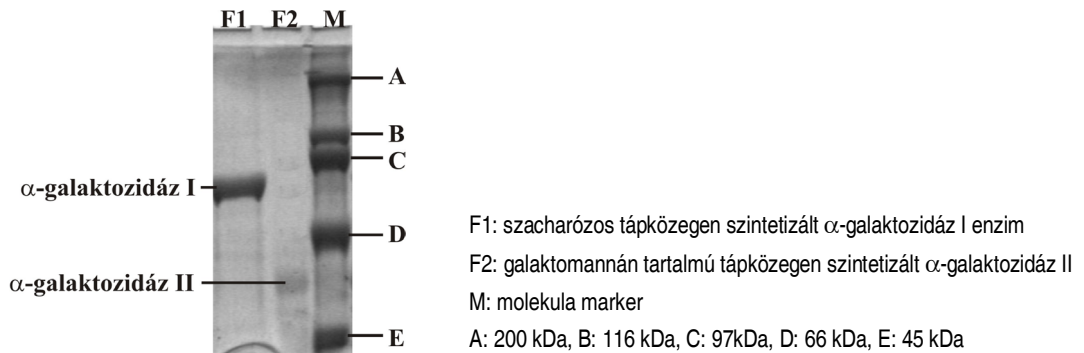
#### 4.4 *THERMOMYCES LANUGINOSUS* CBS 395.62b GOMBATÖRZS ALFA-GALAKTOZIDÁZ ENZIMEI

Számos fonalagombánál kimutatták, hogy összetett szubsztrátumokon eltérő fiziko-kémiai tulajdonságokkal és szubsztrátum specifitással rendelkező  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeket szintetizálnak. A *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzset különböző kémiai szerkezetű szénhidrátokon szaporítva vizsgáltam az extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz termelésüket és az enzimfehérjéket kinyerve összehasonlítottam molekulatömegüket. Az enzimek előállítása optimalizált összetételű szacharóz (F1), illetve szentjánoskenyér galaktomannán (F2) tartalmozó tápközegeken történt. Az enzim fermentáció eredményeit a 18. táblázatban foglaltam össze.

**18. táblázat Extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitások különböző szénforrásokat tartalmazó optimalizált fermentációs tápközegben**

Fermentációs idő [nap]	$\alpha$ -Galaktozidáz aktivitás [NE/ml]	
	Szacharózos tápközegen (F1)	Galaktomannános tápközegen (F2)
2	6,7	2,9
3	24,4	5,9
4	54,9	7,8
7	109,0	9,4

A *T. lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzs az oligoszacharid tartalmú tápközegen egy nagyságrenddel nagyobb  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitást mutatott, mint a szentjánoskenyér eredetű galaktomannánon. A galaktomannán szubsztrátumon szintetizált enzim kinyerésénél a tisztítási eljárást módosítani kellett, mivel a fermentlé viszkózus anyagokat tartalmazott, ezért izo-propanolos frakcionált kicsapást alkalmaztam. Első lépésben azonos térfogatú izo-propanolt adtam a sejtmentes fermentléhez. A kicsapódott anyagot centrifugálással (10000 rpm, 10 perc) eltávolítottam. Ezt követően a tükrös felülúszóból 2 térfogatnyi izo-propanollal kicsaptam a fehérjéket. A csapadékot centrifugálással gyűjtöttem össze és minimális mennyiségű 50 mM Mcllvaine pH=6,0 pufferben oldottam fel. Az oldhatatlan részeket centrifugálással, majd membránszűréssel távolítottam el. Az izo-propanol nyomoktól ultraszűréssel tisztítottam meg a fehérjeoldatot. Ezt követően a kidolgozott eljárásnak megfelelően homogenitásig tisztítottam az  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet. SDS-PAGE segítségével ellenőriztem az enzimpredarátum tisztaságát, valamint meghatároztam molekulatömegét. Szacharóz (F1) és galaktomannán (F2) szénforráson szintetizált enzimek elektroforetogramját mutatja a 39. ábra.



**39. ábra** *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs különböző szénforrásokon szintetizált  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeit

A szentjánoskenyér gumit tartalmazó tápközegen (F2) termelt enzim molekulatömegét 53-54 kDa-ra becsültem és  $\alpha$ -galaktozidáz II-nek neveztem. Ez jó egyezést mutat a Puchart és munkatársai (2000) által közölt adattal, akik a *T. lanuginosus* egyik mannanolitikus törzse – a *T. lanuginosus* IMI 158749 – által galaktomannán szubsztrátumon termelt  $\alpha$ -galaktozidáz enzimének molekulatömegét 57 kDa-nak határozták meg. Hasonló molekulatömegű (57,5-60,2 kDa) enzimet nyertek guar eredetű galaktomannán növekedési szubsztrátumon szaporított *Penicillium ochrochloron* gombával. Ezzel szemben a szacharózos tápközegen (F1) szintetizált  $\alpha$ -galaktozidáz I enzim molekulatömege jóval nagyobb – 94 kDa – volt.

Kísérleti eredményeim alapján megállapítható, hogy az alkalmazott növekedési szubsztrátumtól függően, a *T. lanuginosus* fonalgomba egy adott törzse is több  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet szintetizál és választ ki. A *T. lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzs fermentációja során sikerült két eltérő molekulatömegű enzimet kimutatnom.

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim galaktóz anyagcserében betöltött kiemelkedő jelentőségét bizonyítja, hogy számos szervezet – növények, állatok és a mikroorganizmusok – többféle  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet is szintetizál. Ezeknek az enzimeknek a szintézisét általában más-más gén kódolja. A fonalgombák  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeire vonatkozóan is egyre több olyan közlemény jelenik meg, amelyek egy faj, illetve törzs által termelt enzimek tisztításával és jellemzésével foglalkozik. *Aspergillus niger* törzsek esetében több kutatócsoport is kimutatott három eltérő fiziko-kémiai és biokémiai tulajdonságú enzimet (de Vries et al., 1999; Manzanares et al., 1998). Ademark munkatársaival (2001) négy  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet tisztított galaktomannánt tartalmazó tápközegen szaporított *Aspergillus niger* tenyészeléből. Három  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet (AGLI, AGLII és AGLIII) mutattak ki *Penicillium simplicissimum* (Luonteri et al., 1998b), valamint *Trichoderma reesei* (Margolles-Clark et al., 1996) gombáknál.

## 4.5 ENZIMALKALMAZÁSI KÍSÉRLETEK

A *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzs által szacharóz növekedési szubsztrátumon termelt és homogenitásig tisztított enzimekkel természetes szubsztrátumok hidrolízisét vizsgáltam. A kísérleteket az enzim optimális paramétereinek és stabilitási tulajdonságainak figyelembevételével 55 °C-on végeztem.

### 4.5.1 Galakto-oligoszacharidok hidrolízise

A galakto-oligoszacharidok hidrolízisének követésére különböző szénhidrát meghatározási módszereket alkalmaztam.

#### **Melibióz hidrolízise**

A hidrolízist 2, 4, 6 és 8 (m/v) % melibióz koncentrációk alkalmazásával és a szubsztrátum 1 grammjára számítva 50 NE  $\alpha$ -galaktozidáz enzim alkalmazásával valósítottam meg. Három óráig tartó biokonverziót hajtottam végre 55 °C és pH=5,5 (McIlvaine puffer) környezeti paraméterek mellett. A szénhidrátok azonosítására és mennyiségi meghatározására HPLC technikát alkalmaztam. A kísérleti eredmények a 40. ábrán kerülnek bemutatásra.

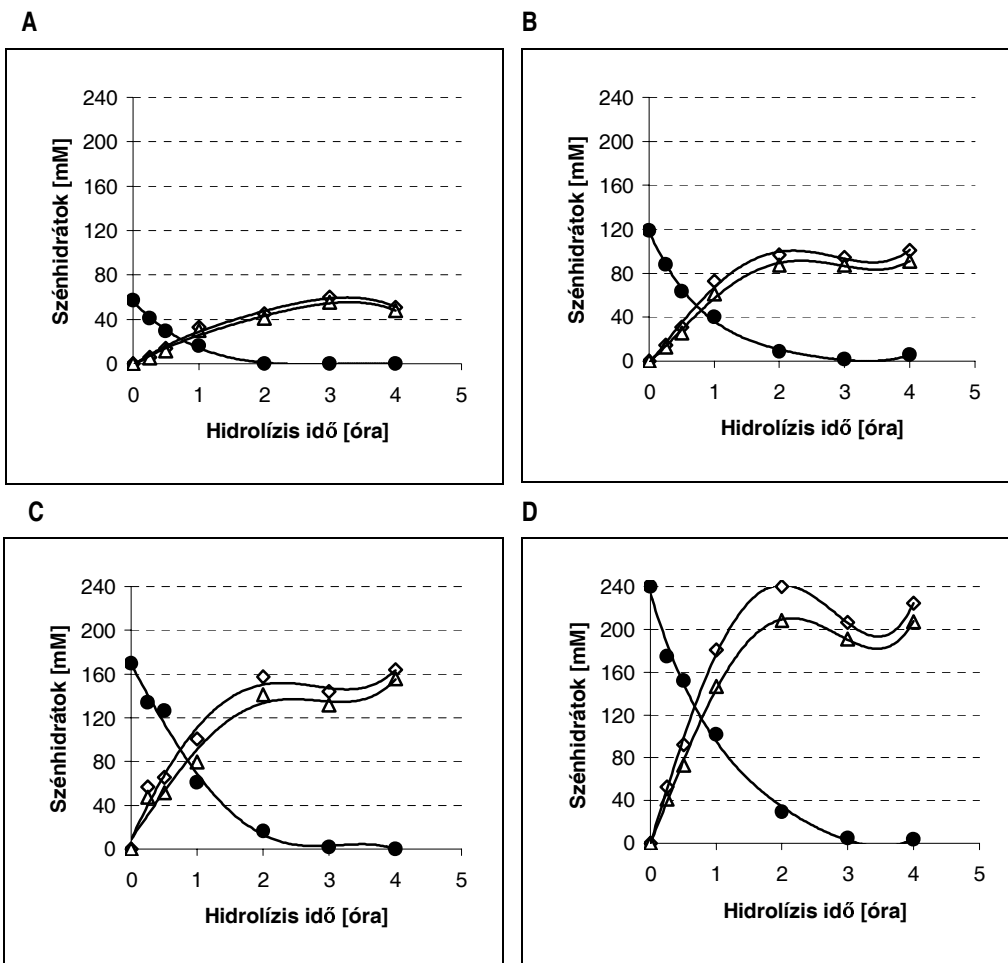
A 2 (m/v) % melibióz teljes hidrolízise 2 órán belül megtörtént. A nagyobb melibióz koncentrációk (4, 6 és 8 (m/v) %) esetében a teljes hidrolízishez szükséges időtartam 3 óra volt. A termékképződési görbék azt mutatják, hogy minden vizsgálatnál és minden időpontban a galaktóz mennyisége kisebb, mint a glükózé, pedig a hidrolízis eredményeként azonos moláris arányban kellene keletkezniük. Ez a jelenség utalhat arra, hogy transzgalaktozilálás is lejátszódik, ahol a reakcióelegyben jelenlevő mindhárom szénhidrát szerepelhet akceptor molekulaként.

#### **Raffinóz hidrolízise**

1 (m/v) % raffinóz koncentrációnál 50, 100 és 200 NE  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet alkalmaztam 1 g szubsztrátumra vonatkoztatva és galaktóz koncentráció meghatározásával vizsgáltam a hidrolízist, a biokonverzió 18. és 24. órájában. A kísérleti eredményeimet a 41. ábrán foglaltam össze. A hidrolízis 18. órájában 86 és 89 %, míg a 24. órában 89 és 95,5 % közötti hidrolízist tapasztaltam. Az enzim-szubsztrátum arány növelésével egyenes arányban növekedett a hidrolízisfok.

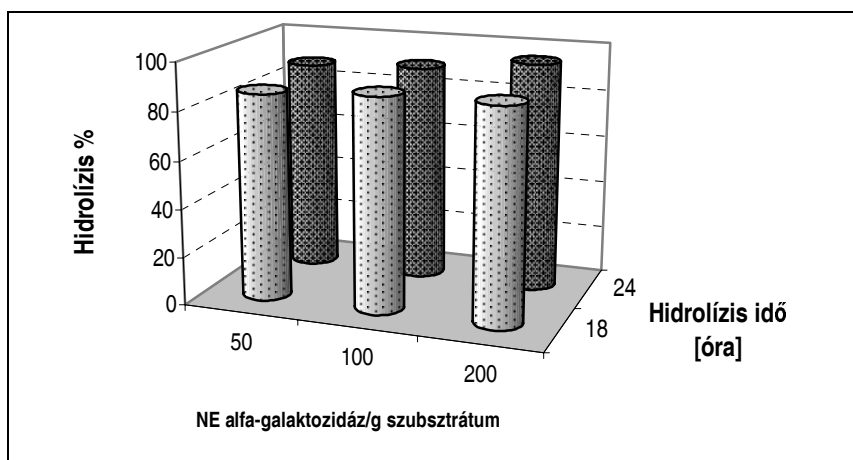
A különböző enzim:szubsztrátum arányoknál tapasztalt hidrolízisekben nem volt jelentős különbség, ezért 50 NE/g szubsztrátum aránynál vizsgáltam a raffinóz  $\alpha$ -galaktozidáz enzimmel történő hidrolízisét 1, 2, 4 és 6 (w/v) % szubsztrátum koncentrációnál 55°C és pH=5,5 környezeti paramétereket alkalmazva. A biokonverzió folyamatának követésére redukáló cukortartalom meghatározást alkalmaztam. A kísérleti adatokat és eredményeket a 42. ábrán szemléltetem.



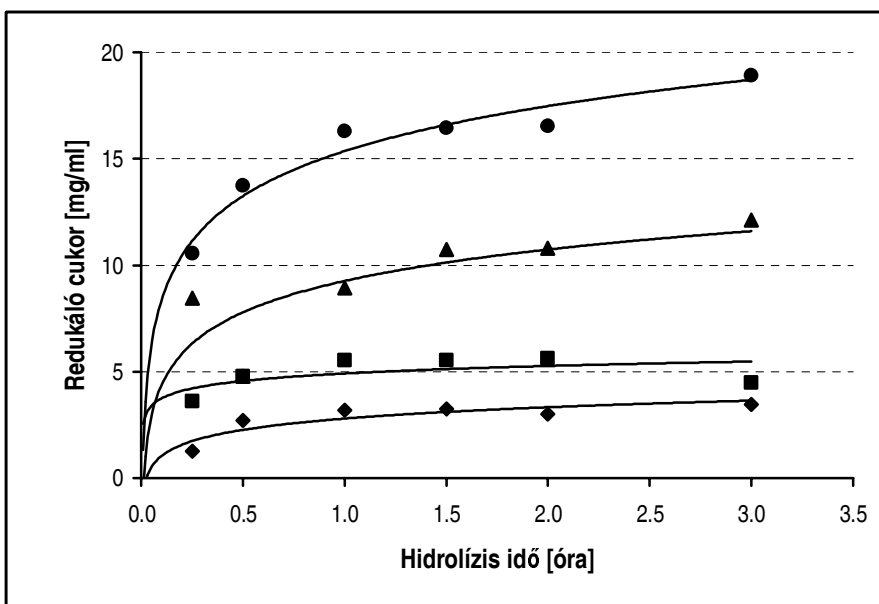


**40. ábra Melibióz hidrolízise**

A: 2 (m/v) %, B: 4 (m/v) %, C: 6 (m/v) %, D: 8 (m/v) % melibióz szubsztrátum  
 Szénhidrátok: melibióz ●, glükóz ◇, galaktóz △; Környezeti paraméterek 55°C, pH=5,5 (Mcllvaine puffer)



**41. ábra Raffinóz 1 (m/v) %-os oldatának hidrolízise különböző enzim:szubsztrátum arányoknál**  
 Környezeti paraméterek: 55°C, pH=5,5 (Mcllvaine puffer)



42. ábra Különböző koncentrációjú raffinóz oldatok hidrolízisének a keletkező redukáló cukor mennyisége az idő függvényében

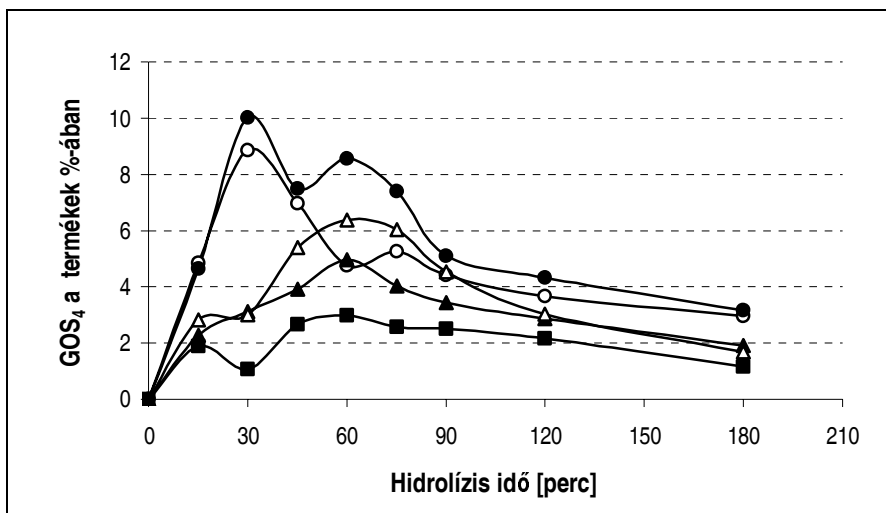
Kiindulási raffinóz koncentrációk (m/v) %: 1 ◆, 2 ■, 4 ▲, 6 ●  
 Környezeti paraméterek: 55°C, pH=5,5 (McIlvaine puffer)

A nemredukáló raffinóz hidrolízise minden vizsgált koncentrációnál lezajlott 3 órán belül. A redukáló cukor koncentrációban tapasztalható ingadozás oka a reverz reakcióval és az enzim transzferáz aktivitásával magyarázható. Ennek felderítésére 6 (m/v) % raffinóz szubsztrátumot alkalmaztam. Az általam összeállított rendszerben a raffinóz szolgált donor szubsztrátumként. Az akceptor lehet akár a raffinóz, akár a hidrolízis során keletkező szacharóz. Ennek alapján 3, illetve 4 monoszacharidból álló trimer, illetve tetramer termék keletkezése várható. A transzfer reakciók pH függésének meghatározásához különböző pH-jú környezetben hajtottam végre a kísérletet. A hidrolízis folyamatok során keletkező transzfer termékek kimutatása HPLC technikával történt. A hidrolízis során kimutatható mennyiségben keletkezett egy tetramer szerkezetű termék, amelyet 4-es polimerizáltságú galakto-oligoszacharidnak (GOS<sub>4</sub>) neveztem el.

A termékek közt megjelenő GOS<sub>4</sub> részarányát a hidrolízis idő és a pH függvényében a 43. ábra mutatja. Az adatokból leolvasható, hogy a hidrolízis első órájában keletkezik a legnagyobb mennyiségű tetramer szerkezetű transzfer termék. A legnagyobb részarányban a tetramer termék pH=7,0-nél keletkezett, ahol elérte a 10 % koncentrációt. Ezt követte a pH=6,5-ön vezetett hidrolízis. A transzfer reakciót igen problematikus optimalizálni, mivel ez a reakció mindig verseng a donor és a transzglykolizált termékek hidrolízisével.

A fenti eredmények alapján feltételezhető, hogy a *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62b törzs által szacharóz szubsztrátumon szintetizált enzim a galakto-oligoszacharidok hidrolízise mellett, galaktóz transzfer

is képes megvalósítani. A transzfer reakció hatékonysága több tényező mellett nemcsak a reakcióidőtől függ, hanem a környezet pH-ja is meghatározó.



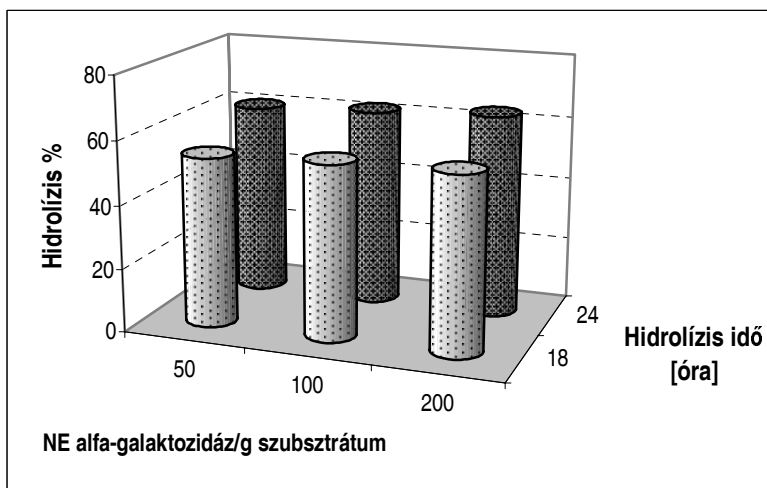
43. ábra Tetramer termékek keletkezése 6 (m/v) % raffinóz hidrolízise során

A biokonverzióknál alkalmazott környezeti paraméterek: 55°C

pH értékek: pH=7,0 —○—, pH=6,5 —●—, pH=6,0 —▲—, pH=5,5 —△—, pH=5,0 —□—, pH=5,0 —■—

### Sztachióz hidrolízise

1 (m/v) % sztachióz hidrolízisét vizsgáltam 1 gramm szubsztrátumra számított 50, 100 és 200 NE  $\alpha$ -galaktozidáz alkalmazásával. A folyamatot 18. és 24. órában történő mintavételezéssel és a galaktóz meghatározásával követtem. Eredményeimet a 44. ábrán mutatom be.



44. ábra Sztachióz 1 (m/v) %-os oldatának hidrolízise különböző enzim:szubsztrátum arányoknál

Környezeti paraméterek: 55°C, pH=5,5 (Mcllvaine puffer)

A biokonverzió 18. órájában a hidrolízisfok 54 és 56 % volt, míg a 24. órában ezek az értékek csupán 61 és 64 %-nak adódtak. Az enzim-szubsztrátum arány növelésével egyenes arányban növekedett a hidrolízisfok.

#### **4.5.2 Galaktomannánok hidrolízise**

Két növényi eredetű galaktomannánt vizsgáltam annak kiderítésére, hogy az általam előállított *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzim képes-e hidrolizálni azokat. A szentjánoskenyér eredetű galaktomannánban mannóz/galaktóz=3,1, míg a guar gumiban ez az arány 1,5. A galaktomannánokból 1 (m/v) %-os oldatokat készítettem. A hidrolízis során a szubsztrátumra nézve nagy feleslegben alkalmaztam az enzimet, ez azt jelentette, hogy 1 g szubsztrátumhoz 16  $\mu$ g enzim preparátumot adtam. Ez az eddigi kísérletekben alkalmazott szubsztrátum-enzim aránynak, több mint 15-szöröse volt. A hidrolízis kísérlet értékelésére enzimes galaktóz meghatározást alkalmaztam. A kísérlet során galaktóz felszabadulást nem detektáltam, ami arra utal, hogy hidrolízis nem történt. Az eredmények azt igazolják, hogy a vizsgált galaktomannánok nem szubsztrátumai az alkalmazott *T. lanuginosus* eredetű  $\alpha$ -galaktozidáz enzimnek.

## 5 ÖSSZEFOGLALÁS

Az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim ipari alkalmazásának áttörése a közeljövőben várható, mivel számos  $\alpha$ -galaktozidáz enzim, hasonlóan más konformáció megtartó hidrolitikus enzimhez, transzglykozidáz aktivitással is rendelkezik. E tulajdonságai alapján nemcsak oligo- és poliszacharidok lebontására alkalmasak, hanem helyspecifikus szintézissel galakto-oligoszacharidok felépítésére is. Ezek a tulajdonságok hasznosíthatók az élelmiszer-, a gyógyszer-, a papír- és az olajiparban, továbbá a szerkezetkutatásban és a gyógyászatban is.

Meghatározott feladatra speciális enzimek szüke szükséges, ezért szakadatlanul folyik az újabb és újabb enzimeforrások felkutatása. Potenciális enzimeforrás lehet a *Thermomyces lanuginosus* termofil fonalgomba, amely könnyen szaporítható, nem patogén, nem termel toxinokat és gazdag forrása számos extracelluláris enzimeknek. Ilyenek a hemicellulázok, az amilolitikus, a pektolitikus, a lipáz és a fitáz enzimek. Számos kutató foglalkozik a *T. lanuginosus* eredetű amilolitikus enzimek előállításával, tisztításával, jellemzésével és szerkezetük vizsgálatával. A hemicellulázok közül a legtöbb ismeret a xilanáz enzimekről áll rendelkezésre. Az enzim teljes szekvenciáját és kristály szerkezetét is meghatározták. Ezen xilanáz kutatásokat az is inspirálta, hogy a *T. lanuginosus* cellulázmentes, termotabilis xilanáz enzimet termel és ezen tulajdonsága alapján ígéretes a papír- és a sütőipari alkalmazása.

A hemicellulázok lebontásában szerepet játszó *T. lanuginosus* eredetű glikozilhidrolázokra, köztük az  $\alpha$ -galaktozidázra, vonatkozó irodalmi adatok igen szűkösek. E hiány pótlására tűztem ki célul a *T. lanuginosus* termofil gomba  $\alpha$ -galaktozidáz enzimtermelésének tanulmányozását, az enzim kinyerését és jellemzését, valamint alkalmazhatóságának vizsgálatát.

Tizenhét *T. lanuginosus* törzset rangsoroltam raffinóz növekedési szubsztrátumon extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásra nézve. A legjobb aktivitású törzset – CBS 395.62b – választottam az enzimfermentációs technológia kidolgozásához. Ennek a törzsnek az 58°C-on meghatározott 15,7 NE/ml aktivitása közel két és félszerese volt az összes vizsgált törzs termelőképességének átlagához viszonyítva.

A vizsgált növekedési szubsztrátumok közül a szacharóz, a raffinóz, a laktoszukróz, az L-arabinóz és a galaktomannánok indukálták az extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézisét. Hatékonyan bizonyultak az enzim szintézis szempontjából azon összetett mezőgazdasági eredetű termények, illetve melléktermékek, amelyek ilyen komponenseket tartalmaztak (a borsóliszt és a korpakivonatok). Az enzimszintézis szempontjából a legjobb induktornak a szacharóz bizonyult. A vizsgált törzsek többsége jobb, vagy közel azonos aktivitásokat mutatott szacharózon, mint raffinóz növekedési szubsztrátumon. Az enzim előállítására szelektált törzs 23 %-kal nagyobb aktivitást mutatott szacharózon, mint raffinóz szénforráson. Ipari megvalósíthatóság szempontjából is kedvező a szacharóz alapon történő technológia kidolgozása, mivel könnyebben hozzáférhető, olcsóbb tápkomponens, mint a raffinóz.

A *T. lanuginosus* CBS 395.62b termelőtorzsz  $\alpha$ -galaktozidáz enzim termelésének maximalizálására meghatároztam a tápközeg optimális szacharóz és ammónium-acetát koncentrációját, valamint az inokulálási technológiát. Az optimalizált tápközeg összetétele a következő: szacharóz 30 g, ammónium-acetát 9 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g, Vogel-féle nyomelem oldat 1 ml és a fenti komponensek McIlvaine pufferral (pH=7,5) 1000 ml-re oldandók. Az enzimfermentáció indításához a 2 napos inokulum tenyészet alkalmazását találtam optimálisnak.

A kidolgozott technológiával 7-8 napos fermentációs időtartammal 100 NE/ml enzimaktivitás érhető el. Az optimalizálás eredményeként az enzimhozamot sikerült hatszorosára növelni. Ez kiemelkedőnek mondható az irodalmi adatokkal összehasonlításban is, mivel a közlemények túlnyomó többségében csupán 1-5 NE/ml enzimaktivitásokról számolnak be.

Az enzim kinyerésére és tisztítására a tenyészlé szűrléséből történő ammónium-szulfátos kicsapást követően négy lépésből álló kromatográfiás eljárást dolgoztam ki, amely molekulaméret és töltés alapján történő elválasztásokból állt. Az enzim tisztítás során 114-szeres tisztulást és 59 %-os kitermelést értem el, valamint 1813 NE/mg specifikus aktivitású terméket kaptam. Az enzimfehérje homogenitását denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem. Az enzim molekulatömege 94 kDa és izoelektromos pontja 3,9-4,1 között volt. Az enzim glikoprotein és szénhidrát tartalmát 5,3 (m/m) %-ra becsültem. Az enzimhez kapcsolódó szénhidrátok vizsgálata során a következő megoszlást találtam: 56 % mannóz, 36 % glükózamin, 8 % galaktóz. A glükóz tartalom kisebb volt, mint 1 %.

Az enzimaktivitás optimális pH-ja pH=5,0-5,5 és optimális hőmérséklete ebben a pH tartományban 65 °C volt p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid szubsztrátumon meghatározva. Az enzim legalább 1 napon keresztül stabilnak bizonyult 55°C-on pH=6,4-8,3 tartományban. 60 °C-on 24 óra hosszát tartó vizsgálatok során megállapítottam, hogy pH=4,0-nél 1 órán és pH=4,5-nél 7,5 órán belül inaktíválódott az enzim. pH=5,0-nél 52 %, pH=5,5-nél 58 %, pH=6,0-nál 68 %, pH=6,5-nél 75 %, pH=7,0-nél 79 %, pH=7,5-nél 45 %, pH=8,0-nál 51%, pH=8,5-nél 59 % és pH=9,0-nél 19 % maradék aktivitást mértem vissza. 65 °C-on történő kezelés során pH=4,0-nél 20 percen, pH=4,5-nél 40 percen, pH=7,5-nél, pH=8,5-nél és pH=9,0-nél 3 órán, pH=5,0-nél 4 órán, pH=5,5-nél és pH=7,0-nél 5 órán belül inaktíválódott. pH=6,0 és pH=6,5-nél 6 óra múlva is megtartotta az enzim aktivitásának több, mint 40 %-át és pH=8,0-nál 10 %-nyi aktivitás maradt. 70 °C-on és e feletti hőmérsékleteken történő inkubálás során az enzimmészítmény nagyon rövid időn belül inaktíválódik.

Az enzim aktív volt p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozidon, melibiózon, raffinózon és sztachiózon, de nem tett szabaddá galaktózt intakt galaktomannánokból. Az enzim kinetikai paramétereit meghatározva p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozidra nézve a  $K_m=1,13$  mM, a  $V_{max}=2498 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ; raffinózra  $K_m=1,61$  mM,  $V_{max}=4434 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  és sztachiózra  $K_m=1,17$  mM,  $V_{max}=4889 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  értékeknek adódtak. A legnagyobb affinitást az enzim a raffinózhoz mutatta és hasonló affinitású volt p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozidra és sztachiózra nézve is.

A  $\text{Mn}^{++}$  aktivátorként, míg a  $\text{Ca}^{++}$ , a  $\text{Zn}^{++}$  és a  $\text{Hg}^{++}$  erős inhibitoroként hat a vizsgált  $\alpha$ -galaktozidáz enzim aktivitására.  $\text{Ag}^+$  ionok hatására az enzim inaktíválódik.

Az enzimalkalmazási kísérletek során megállapítottam, hogy 55°C-on és pH=5,5 Mcllvaine pufferral 50 NE  $\alpha$ -galaktozidáz/g szubsztrátum enzim/szubsztrátum aránynál 1 és 8 (m/m) % koncentrációkat alkalmazva a melibióz és a raffinóz hidrolízise 3 órán belül lezajlik. Raffinóz szubsztrátum esetében kimutattam, hogy a hidrolízis első órájában átmeneti termékként 3, illetve 4 monoszacharidból álló trimer és tetramer vegyületek is keletkeznek. A sztachióz hidrolízisének 24 órás hidrolízis idő után csak 60 %-os konverziót figyeltem meg.

A *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs  $\alpha$ -galaktozidáz enzim szintézise eltérő különböző növekedési szubsztrátum alkalmazásánál. Szacharóz és galaktomannán szubsztrátumon az enzim kiválasztódott a tenyészlébe, míg melibióz szubsztrátumon csupán intracellulárisan szintetizálódott.

Az extracelluláris enzimtermelésnél is meghatározónak bizonyult az alkalmazott növekedési szubsztrátum minősége. Galaktomannánon optimalizált körülmények között is egy nagyságrenddel kisebb aktivitásokat értem el, mint szacharóz növekedési szubsztrátumon. Ennek magyarázata, hogy a galaktomannán koncentráció gélképző tulajdonsága miatt nem növelhető 1 (m/v) % fölé, e koncentrációban történő alkalmazása is problémát okozott az enzim kinyerése során. A szintetizált enzimek eltérő voltára utal az is, hogy a tisztítást követően a galaktomannánon előállított enzim molekulatömege 54 kDa, míg a szacharózon nyert enzimé 94 kDa volt.

#### **Az eredmények továbbfejlesztési és hasznosítási lehetőségei**

- Az  $\alpha$ -galaktozidáz előállítására laboratóriumi szinten kidolgozott technológia léptéknövelésével megvalósítható az ipari szintű enzimtermelés. Az ipari fermentációhoz javasolható a melasz alapon történő technológia kidolgozása és megvalósítása, mivel a melasz mind raffinózt mind szacharózt tartalmaz, mely indukálja az enzimtermelést. Továbbá előnyt jelenthet, hogy a melasz gazdag a könnyen hasznosítható szabad aminosavakban.
- A *Thermomyces lanuginosus* gomba extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzimeinek feltérképezésére érdemes lenne korpa alapú tenyészlévekből is izolálni és jellemezni az  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitással rendelkező komponenseket.
- Az enzimek aminosav szekvenciájának, valamint a térbeli szerkezetének meghatározása a glikozilhidrolázok családjába történő besorolással, módot adhat az enzim katalitikus tulajdonságainak és hatásmechanizmusának feltárására.
- Az enzim hatásmechanizmusának feltárása molekuláris módszerek alkalmazásával.
- Az enzimalkalmazási kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy az előállított enzim alkalmas az antinutritív galakto-oligoszacharidok lebontására. Így hasznosítható a hüvelyesekben lévő flatulencia faktorokként ismert galakto-oligoszacharidok mennyiségének csökkentésére, illetve eliminálására, ezáltal ezen alapanyagok funkcionálissá tehető, valamint tápértékük növelhető.
- A prebiotikumként hasznosítható transzgalakto-oligoszacharidok szintézisének kidolgozása az enzimes transzfer reakciók optimalizálásával.

## 6 SUMMARY

The industrial exploitation of  $\alpha$ -galactosidase is expected in the near future, since several  $\alpha$ -galactosidase enzymes, similarly to other conformation retaining hydrolase enzymes, also have transglycosidase activities. These features make them capable not only for the degradation of the oligo- and polysaccharides but the synthesis of galacto-oligosaccharides, too. Therefore the  $\alpha$ -galactosidases can be utilised in the food, pharmaceutical, paper and oil industry, moreover in the studies of the structures of glycoprotein and carbohydrates, and in the medicine as well.

For defined tasks special enzyme preparations are needed. To meet this requirement the search is continuously going on to discover new enzyme sources. One of the potential candidates is *Thermomyces lanuginosus* a thermophilic filamentous fungus, which can be easily cultivated. This fungus is not pathogenic and does not produce toxins, moreover it secretes several enzymes, such as hemicellulases, amylolytic, pectolytic, lipase and phytase enzymes. Numerous researchers deal with the production, the purification, the characterisation and the studying of the structure of amylolytic enzymes from *Thermomyces lanuginosus*. Of their hemicellulases most information is known about the xylanase enzyme. Its sequence and crystal structure are defined. The researches on xylanase enzyme were driven thereby that *T. lanuginosus* is non-cellulolytic, therefore it produces cellulase free thermostable xylanase. This feature is promising from the point of view of utilization in the paper and baker industry.

Data on the other glycosylhydrolases from *T. lanuginosus* i.e. the  $\alpha$ -galactosidases, which participate in the degradation of the hemicelluloses, are very limited. To get detail information about  $\alpha$ -galactosidase enzyme from *Thermomyces lanuginosus*, it was aimed to study its enzyme production, recover and characterise the enzyme, and to investigate possible utilisations.

Seventeen *T. lanuginosus* strains cultivated on raffinose substrate were ranked based on their  $\alpha$ -galactosidase activities. *T. lanuginosus* CBS 395.62b strain with the best activity was selected for the elaboration of enzyme fermentation technology. The activity of 15.7 U/mL of this strain defined at 58 °C was two and half times higher than the average productivity of all other investigated strains.

Of the investigated growth substrates only sucrose, raffinose, lactosucrose, L-arabinose and galactomannans induced the synthesis of extracellular  $\alpha$ -galactosidase enzyme. Some agricultural products and by-products (pea flour, wheat bran extracts) also efficiently induce the synthesis of  $\alpha$ -galactosidases. Among the investigated inducers, sucrose proved to be the best one for enzyme production. The majority of the tested strains showed better or near identical activities on sucrose, than on raffinose growth substrate. The *T. lanuginosus* strain selected for enzyme production exhibited 23 % higher activity in sucrose than in raffinose containing media. The industrial feasibility of the elaboration of fermentation technology, which applies sucrose as carbon source is promising, since it is more available and cheaper nutrient than raffinose. To maximize the production of the  $\alpha$ -galactosidase of *T. lanuginosus* CBS 395.62b strain, the optimum concentrations of



sucrose and ammonium acetate as well as the preparing of inoculum and fermentation culture were determined. The optimal composition of the medium is the following: sucrose 30 g, ammonium acetate 9 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g, Vogel's mineral solution 1 mL. The above mentioned components are dissolved in Mcllvaine buffer (pH=7.5) and its volume is adjusted to 1000 mL. For the initiation of enzyme fermentation two-day old inoculum culture is advised.

After seven- or eight-day fermentation using the elaborated technology about 100 U/mL enzyme activity was achieved. The optimisation of fermentation medium enhanced the enzyme yield six times. This achievement is outstanding comparing to the data presented so far in the literature, while the majority of publications communicate only  $\alpha$ -galactosidase activities of 1-5 U/mL.

The  $\alpha$ -galactosidase was isolated by precipitation with ammonium sulphate from the filtrate of the ferment broth. For the enzyme purification a four-step chromatographic process was elaborated, in which the separations were carried out by combinations of ion-changing and gel filtration chromatography. Applying this procedure 114-fold purification and yield of 59 % was achieved, and an enzyme preparation with 1813 U/mg was gained. The homogeneity of the enzyme protein was proved by SDS-PAGE. The molecular mass was calculated to be 94 kDa and the isoelectric point of the enzyme was between  $\text{pI}=3.9-4.1$ . The  $\alpha$ -galactosidase enzyme seems to have glycoprotein character and its carbohydrate content was estimated to be 5.3 (w/w) %. The distribution of carbohydrates linked to the enzyme protein was the following: 56 % of D-mannose, 36 % of glucosamine, 8 % of D-galactose and the D-glucose content was less than 1 %.

The optimal pH of the enzyme activity was between  $\text{pH}=5.0-5.5$  and in this pH range the optimum temperature was  $65^\circ\text{C}$  determined at presence of p-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside substrate. The enzyme preparation was stable at  $55^\circ\text{C}$  between  $\text{pH}=6.4$  and  $8.3$  for at least one day. It was determined that the  $\alpha$ -galactosidase enzyme at  $60^\circ\text{C}$  under  $\text{pH}=4.0$  and  $\text{pH}=4.5$  was inactivated in one hour and 7.5 hour, respectively. Residual activities measured at  $\text{pH}=5.0$ ,  $\text{pH}=5.5$ ,  $\text{pH}=6.0$ ,  $\text{pH}=6.5$ ,  $\text{pH}=7.0$ ,  $\text{pH}=7.5$ ,  $\text{pH}=8.0$ ,  $\text{pH}=8.5$  and  $\text{pH}=9.0$  were 52, 58, 68, 75, 79, 45, 51, 59 and 19 %, respectively. During the treatment at  $65^\circ\text{C}$  the enzyme was inactivated at  $\text{pH}=4.0$  in 20 minutes, at  $\text{pH}=4.5$  in 40 minutes, at  $\text{pH}=7.5$ ,  $\text{pH}=8.5$  and  $\text{pH}=9.0$  in 3 hours, at  $\text{pH}=5.0$  in 4 hours at  $\text{pH}=5.5$  and  $\text{pH}=7.0$  in 5 hours, however at  $\text{pH}=6.0$  and  $\text{pH}=6.5$  it kept more than 40 % of its activity and at  $\text{pH}=8.0$  10 % residual activity was measured after 6 hours. When incubated at  $70^\circ\text{C}$  or higher, the enzyme preparation lost its activity very quickly.

The relevant  $\alpha$ -galactosidase enzyme is active on p-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside, melibiose, raffinose and stachyose, but it was not capable to liberate galactose from intact galactomannans.

The kinetic parameters of the enzyme were determined, and following values were found:  $K_m=1.13$  mM,  $V_{\text{max}}=2498$   $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  for p-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside;  $K_m=1.61$  mM,  $V_{\text{max}}=4434$   $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  for raffinose and  $K_m=1.17$  mM,  $V_{\text{max}}=4889$   $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  for stachyose.  $\alpha$ -Galactosidase showed the highest affinity to raffinose and had similar affinity to p-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside and stachyose substrates.

The manganese ions serve as activator, while the calcium, the zinc and the mercury ions act as inhibitors of the enzyme.

The hydrolysis of melibiose and raffinose happened at 55 °C and pH=5.5 (McIlvaine buffer) applying 50 U  $\alpha$ -galactosidase for 1g substrate, when the concentration of the substrates was between 1 and 8 (w/w) % in 3 hours. In case of raffinose hydrolysis, trimer and tetramer oligosaccharides as intermediar products were also formed. In case of the hydrolysis of stachyose only 60 % conversion was observed after 24 hours.

The synthesis of the  $\alpha$ -galactosidase enzyme of *T. lanuginosus* CBS 395.62b strain was different when various growth substrates were applied. In presence of sucrose and galactomannan the enzyme was secreted into the medium, while in melibiose containing medium the enzyme was synthesized in intracellular form. In the production of extracellular  $\alpha$ -galactosidase enzyme the quality of growth substrate was also decisive. Under optimal circumstance one order of magnitude less activity was reached on galactomannans, than on sucrose. One of the possible explanations of this is that the concentration of galactomannan cannot be increased above 1 (w/v) % because its gel forming capacity. When galactomannan concentration was applied in 1 (w/v) %, it caused problems during the isolation of enzyme. The difference in the synthesised enzymes was proved, while the molecular masses of galactomannan and sucrose induced enzymes are 54 kDa and 94 kDa, respectively.

#### **The further prospects of the research**

- The elaborated technology for the production of  $\alpha$ -galactosidase is suitable for scaling-up. For industrial manufacture of  $\alpha$ -galactosidase molasses is proposed as growth substrate, because it contains sucrose and raffinose. Both of them induce the synthesis of  $\alpha$ -galactosidase, moreover it is rich in easily available amino acids and minerals.
- It would be worth to isolate extracellular protein components possessing  $\alpha$ -galactosidase activity when the fungus is cultivated in media containing extract of wheat bran. These enzymes should be characterised and compared with other  $\alpha$ -galactosidase enzymes.
- The determination of amino acid sequence and geometry of the enzyme protein may lead to classify it into the families of the glycohydrolases, and determine its catalytic behaviour and mechanism.
- Exploration of the mechanism of the enzyme by molecular methods.
- Based on the results of hydrolysis experiments on laboratory scale,  $\alpha$ -galactosidase from *T. lanuginosus* is able to hydrolyse anti-nutritive galactooligosaccharides. The bioconversion technology applying this enzyme is suitable to reduce or eliminate the amount of these galactooligosaccharides from legumes that cause flatulence effects, therefore the functionality and the nutritional value of these foods can be improved.
- The optimisation of transgalactosylation leads to production of transgalacto-oligosaccharides, which are applicable as prebiotics in production of functional foods.

## 7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Rangsoroltam tizenhét *Thermomyces lanuginosus* törzset extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz aktivitásuk alapján rázatott lombikos tenyésztés során. Megállapítottam, hogy a vizsgált törzsek enzim termelőképességében számottevő különbség van. Az enzim előállítás céljára a *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzset ítélem megfelelőnek. Meghatároztam azon növekedési szubsztrátumok körét, amelyek indukálják a *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz szintézisét. A legjobb induktornak a szacharóz bizonyult. Az enzim szintézisét indukálták továbbá az  $\alpha$ -galaktozidos kötést tartalmazó oligo- és poliszacharidok (a raffinóz és a galaktomannánok), az L-arabinóz, valamint a prebiotikumként alkalmazott bioszintetikus laktoszukróz.
2. Megállapítottam, hogy melibióz növekedési szubsztrátumon a *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzs intracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet szintetizál.
3. Laboratóriumi fermentációs technológiát dolgoztam ki a *T. lanuginosus* CBS 395.62b törzsszel történő  $\alpha$ -galaktozidáz enzim előállítására. Az enzimfermentáció indításához a 2 napos inokulum tenyészet alkalmazását találtam optimálisnak. Optimalizáltam a tápközeg összetételét és így az enzimtermelési szintet hatszorosára növeltem.
4. Módszert fejlesztettem ki az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim kinyerésére. A szacharóz szubsztrátumon termelt és homogenitásig tisztított  $\alpha$ -galaktozidáz enzim molekulatömege 94 kDa, izoelektromos pontja 3,9-4,1. Az enzim glikoprotein, szénhidrátartalma 5,3 %, főkomponensei: mannóz 56 %, glükózamin 36 %, galaktóz 8 %. A homogenitásig tisztított enzim pH optimuma pH=5,0-5,5 tartományban van és hőmérséklet optimuma 65 °C p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid szubsztrátumon meghatározva. A Mn<sup>++</sup> gyenge aktivátorként, míg a Ca<sup>++</sup>, a Zn<sup>++</sup> és a Hg<sup>++</sup> erős inhibítorként hatnak az enzimaktivásra. Ag<sup>+</sup> jelenlétében az  $\alpha$ -galaktozidáz enzim inaktíválódik.
5. Az enzim katalitikus tulajdonságaira vonatkozóan megállapítottam, hogy a p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid szubsztrátumon kívül hidrolizálja a melibiózt, a raffinózt és a sztachiózt, de nem mutatott aktivitást az intakt galaktomannán szubsztrátumokon. Meghatározott körülmények között transzferáz aktivitás is kimutatható.  
Meghatároztam az  $\alpha$ -galaktozidáz készítmény kinetikai paramétereit, amelyek p-nitro-fenil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid jelenlétében:  $K_m=1,13$  mM,  $V_{max}=2498$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ; raffinóznál  $K_m=1,61$  mM,

$V_{\max}=4434 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  és sztachióznál  $K_m=1,17 \text{ mM}$ ,  $V_{\max}=4889 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  értékeknek adódtak.

6. Bebizonyítottam, hogy a *T. lanuginosus* CBS 395.62b jelzésű törzs legalább két különböző molekulatömegű extracelluláris  $\alpha$ -galaktozidáz enzimet szintetizál. A szacharózon szintetizált enzim molekula tömege: 94 kDa, míg a szentjánoskenyér eredetű galaktomannánon előállított enzimé 54 kDa volt.

## 8 FELHASZNÁLT IRODALOM

- Adams, M. W.W., Perler, F.B., Kelly, R.M. (1995): Extremozymes the limits of Biocatalysis. *Bio/Techn.* **13**: 662-668
- Ademark, P., Larsson, M., Tjerneld, F., Stålbrand, H. (2001): Multiple  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. purification, characterisation and substrate specificities. *Enzyme Microb. Technol.* **29**: 441-448
- Adya, S., Elbein, A. (1977): Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus niger*. purification and properties of  $\alpha$ -galactosidase. *J. Bacteriol.* **129**: 850-856
- Aguilar, A. (1996): Extremophile research in European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews* **18**: 89-92
- Anunziato, M.E., Mahoney, R.R. Mudgett R.E. (1986): Production of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture. *J. Food Sci.* **51**: 1370-1371
- Arnaud, N., Bush, D.A., Horisberger, M. (1976): Study of an intracellular  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus, *Penicillium duponti*. *Biotechnol. Bioeng.* **18**: 581-585
- Aslanidis C., Schmid K., Schmitt, R. (1989): Nucleotide sequences and operon structure of plasmid-borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 6753-6763
- ATCC (1984): Media Handbook, ATCC Rockville
- Bahl, O.P., Agrawal, K.M.L. (1969): Glycosidases of *Aspergillus niger*. I. Purification and characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases and  $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase. *The Journal of Biological Chemistry.* **244** (11) 2970-2978
- Brechtel, R., Wätzig, H., Rüdiger, H. (2001): The lectin from the mushroom *Pleurotus ostreatus*: a phosphatase-activating protein that is closely associated with an  $\alpha$ -galactosidase activity. *Plant Science* **160**: 1025-1033
- Bridge, T.A.M., Johnson, D.B. (1998): Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron-containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2181-2186
- Brumerlli, H., Sims, P.F.G., Sinnott, M.L. (1999): Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: purification and characterization of the main  $\alpha$ -galactosidase. *Biochem. J.* **339**: 43-53
- Bulpin, P.V., Gidley, M.J., Jeffcoat, R., Underwood, D.J. (1990): Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant  $\alpha$ -galactosidase. *Carbohydr. Polym.* **12**: 155-168
- Campillo, E., Shannon, L.M., Hankins, C.N. (1981): Molecular properties of enzymic phytohemagglutinin of mung bean. *J. Biol. Chem.* **256**: 7177-7180
- Castillo, E.M., De Lumen, B.O., Rayes, P.S., de Lumen, H.Z. (1990): Raffinose synthase and galactinol synthase of legumes in developing seeds and leaves. *Journal of Food Chemistry* **38**: 351-355
- Cavazzoni, V., Adami, A., Craveri, R. (1987):  $\alpha$ -Galactosidase from the yeast *Candida javanica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 555-559
- Chinen, I., Nakamura, T., Fukuda, N. (1981): Purification and properties of alpha-galactosidase from immature stalks of *Saccharum officinarum* (sugar cane). *J. Biochem.* **90**: 1453-1461
- Chitnis, A., Sadana, A. (1989): pH-dependent enzyme deactivation models. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 804-818
- Church, F.C., Meyers, S.P., Srinivasan, V.R. (1980): Isolation and characterisation of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii*. In: *Developments in Industrial Microbiology* (eds. L.A. Underkofler, M.L. Wulf) Vol. 21 Ch. 35, pp. 339-348
- Civas, A., Eberhard, R., Le Dizet, P., Petek, F. (1984a): Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Mycelial  $\alpha$ -D-galactosidases. *Biochem. J.* **219**: 849-855
- Civas, A., Eberhard, R., Le Dizet, P., Petek, F. (1984b): Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Secreted  $\alpha$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-mannanase. *Biochem. J.* **219**: 857-863

- Colowick, S.P., Kaplan, C.N. (1955):** Methods in Enzymology Vol. 1 Academic Press New York
- Courtois, J.E., Petek, F. (1966):**  $\alpha$ -D-galactosidase from coffee beans. Methods in Enzymology 8: 565-571
- Cowan, D.A. (1992):** Biotechnology of the *Archaea*. Tibtech. 10: 315-323
- Critchley, P. (1987):** Commercial aspects of biocatalysis in low-water systems. In: Biocatalysis in organic media (eds. C. Laane, J. Tramper, M.D. Lilly) Elsevier, Amsterdam pp.173-183
- Cruz, R., Batistela, J.C., Wosiacki, G. (1981):** Microbial  $\alpha$ -galactosidase for soymilk processing. J. Food Sci. 46: 1196-1200
- Cruz, R., Park, Y.K. (1982):** Production of fungal  $\alpha$ -galactosidase and its application on the hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soybean milk. J. Food Sci. 47: 1973-1975
- Dagnall, B.H., Paulsen, I.T., Sainer, M.H. (1995):**The DAG family of glycosyl hydrolases combines two previously identified protein families. Biochem. J. 311: 349-350
- de Vries, R.P., Broeck, H.C., Dekkers, E., Manzanares, P., Graaff, L.H., Visser, J. (1999):** Differential expression of three  $\alpha$ -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2453-2460
- de Vries, R.P., de Graaff, L.H., Visser, J (1999):** CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. Res. Microbiol. 150: 281-285
- den Herder, I.F., Rosell, A.M.M., van Zuilen, C.M., Punt P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. (1992):** Cloning and expression of a member of the *Aspergillus niger* gene family encoding alpha-galactosidase. Mol. Gen. Genet. 233: 404-410
- Deploy, J.J. (1985):** Some factors affecting the germination of *Thermoascus aurantiacus*. Mycologia 87: 362-365
- Derikx, P.J.L., Op den Camp, H.J.M., Wagner, A.M., Straatsma, G., van Griensven, L.J.L.D., Vogels, G.D. (1990):** Respiratory pathways in *Agaricus bisporus* and *Scytalidium thermophilum*. FEMS Microbiol. Lett. 66: 307-312
- Dey, P.M., Pridham, J.B. (1972):** Biochemistry of alpha-galactosidases. Adv. Enzymol. 15: 91-130
- Dey, P.M. (1969):** Inhibition, transgalactosylation and mechanism of action of sweet almond  $\alpha$ -galactosidase. Biochim. Biophys. Acta 191: 644-652
- Dey, P.M. (1984):** Occurrence of glycoprotein glycosidases in mature seeds of mung bean (*Vigna radiata*). Phytochemistry 23: 257-260
- Dey, P.M., Del Campillo, E., Pont Lezica, R. (1983):** Characterization of a glycoprotein  $\alpha$ -galactosidase from lentil seeds (*Lens culinaris*). J. Biol. Chem. 258: 923-929
- Dey, P.M., Naik, S., Pridham, J.B. (1982):** The lectin nature of  $\alpha$ -galactosidases from *Vicia faba* seeds. FEBS Lett. 150: 233-237
- Dey, P.M., Patel, S., Brownleader, M.D. (1993):** Induction of  $\alpha$ -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonobola*) gum. Biotechnol. Appl. Biochem. 17: 361-371
- Dey, P.M., Pridham, J.B. (1969):** Substrate specificity and kinetic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Vicia faba*. Biochem. J. 115: 47-54
- Dey, P.M., Wallenfels, K. (1974):** Isolation and Characterization of  $\alpha$ -Galactosidase from *Lens esculanta*. Eur. J. Biochem. 50: 107-112
- Dhar, M., Mitra, M., Hata, J., Butnariu, O., Smith, D. (1994):** Purification and characterisation of *Phaseolus vulgaris*  $\alpha$ -galactosidase isozymes. Biochem. Mol. Biol. Int. 34: 1055-1062
- Duffaud, G.D., McCutchen, C.M., Leduc, P., Parker, K.N., Kelly, R.M. (1997):** Purification and characterization of extremely thermostable  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase, and  $\alpha$ -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. Applied and Environmental Microbiology. 63 (1) 169-177
- Elshafei, A.M., Foda, M.S., Aboul-Enein, A., Afify, A.S., Ali, N.H. (1993):** Purification and enzymatic properties of alpha-galactosidase from *Penicillium janthinellum*. Acta-Biotechnologica. 13: 351-359.
- Eneyskaya, E.V., Golubev, A.M., Kachurin, A.M., Savel'ev, A.N., Neustroev, K.N. (1998):** Transglycosylation activity of  $\alpha$ -D-galactosidase from *Trichoderma reesei*. An investigation of the active site. Carbohydrate Research. 305: 83-91

- Fellinger, A.J., Verbakel, J.A., Veale, R.A., Sudbery, P.E., Bom, I.J., Overbreeke, N., Verrips, C.T. (1991):** Expression of the  $\alpha$ -galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (Guar) by *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. **7**: 463-473
- Foda, M.S., Eishafei, A.M., Aboul-Enein, A., Afify, A.S., Ali, N.H. (1995):** Physiological studies on the formation of alpha-galactosidase by fungi. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **17**: 25-32
- Fox, A.D., Robyt, J.F. (1991):** Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.* **195**: 93-96
- Fridjonsson, O., Watzlawick, H., Gehweiler, A., Mattes, R (1999a):** Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB3621: cloning, sequencing and characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: 147-153
- Fridjonsson, O., Watzlawick, H., Gehweiler, A., Rohrhirsch, T., Mattes, R. (1999b):** Cloning of the gene encoding a novel thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus brockianus* IT1360. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**: 3955-3963
- Galili, U, Matta, K.L. (1996):** Inhibition of anti-Gal IgG binding to porcine endothelial cells by synthetic oligosaccharides. *Transplantation* **62**: 256-262
- Gallili, G., Lampen, J.O. (1977):** Large and small invertase and the yeast cell cycle: pattern of synthesis and sensitivity to tunicamycin. *Biochem. Biophys. Acta* **475**: 113-122
- Garro, M.S., Giori, G.S., Valdez, G.F., Oliver, G. (1993):** Characterization of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Applied Bacteriology.* **75**: 485-488
- Garro, M.S., Giori, G.S., Valdez, G.F., Oliver, G. (1994):**  $\alpha$ -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology.* **19**: 16-19
- Garro, M.S., Valdez, G.F., Oliver, G., Giori, G.S. (1996a):** Influence of Carbohydrates on the  $\alpha$ -Galactosidase Activity of *Lactobacillus fermentum*. *Current Microbiology.* **33**: 302-305
- Garro, M.S., Valdez, G.F., Oliver, G., Giori, G.S. (1996b):** Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Biotechnology.* **45**: 103-109
- Gherardini, F., Babcock, M., Salyers, A.A. (1985):** Purification and characterization of two  $\alpha$ -galactosidases associated with catabolism of guar gum and other  $\alpha$ -galactosides by *Bacteroides ovatus*. *Journal of Bacteriology.* **161**: 500-506
- Ginsburg, V. (1972):** Enzymatic basis for blood groups in man. *Adv. Enzymol.* **36**: 131-149
- Giuseppin, M.L.F., Almkerk, J.W., Heistek, C.J., Verrips, C.T. (1993):** Comparative study on the production of guar  $\alpha$ -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continuous cultures. *Appl. Environ. Microb.* **59**: 52-59
- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980):** What should be called a lectin? *Nature* **285**: 66
- Goldstein, J. (1989):** Conversion of ABO blood groups. *Transfus. Med. Rev.* **3**: 206-212
- Goldstein, J., Siviglia, G., Hurst, R., Lenny, L., Reich, L. (1982):** Group B erythrocytes enzymatically converted to group O survive normally in A, B and O recipients. *Science* **215**: 168-170
- Golubev, A.M., Neustroev, K.N. (1993):** Crystallization of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* **231**: 933-934
- Guimaraes, V.M., de Rezende, S.T., Moreira, M.A., de Barros, E.G., Felix, C.R. (2001):** Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochem.* **58**: 67-73
- Gupta, S.D., Maheshwari, R. (1985):** Is organic acid required for nutrition of thermophilic fungi? *Arch. Microbiol.* **141**: 164-169
- Haasum, I., Ericksen, S.H., Jensen, B., Olsen, J. (1991):** Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 656-660
- Hara, K., Fujita, K., Kuwahara, N., Tanimoto, T., Hashimoto, H., Koizumi, K., Kitahata, S. (1994):** Galactosylation of Cyclodextrins and Branched Cyclodextrins by  $\alpha$ -Galactosidases. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 652-659
- Harpaz, N., Flowers, H.M., Sharon, N. (1977):**  $\alpha$ -Galactosidase from soybeans destroying blood-group B antigens. Purification by affinity chromatography and properties. *Eur. J. Biochem.* **77**: 419-426

- Hartemink, R., Kok, B.J., Weenk, G.H., Rombouts, F.M. (1996): Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *J. Microbiol Meth.* **27**: 33-43
- Hashimoto, H., Goto, M., Katayama, C., Kitahata, S. (1991): Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Pseudomonas fluorescens* H-601. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2831-2838
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Kitahata, S. (1993): Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 372-378
- Hashimoto, H., Katayama, C., Goto, M., Okinaga, T., Kitahata, S. (1995): Transgalactosylation catalyzed by  $\alpha$ -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 619-623
- Henrissat, B.(1991): A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**: 309-316
- Henrissat, B., Bairoch, A. (1996): Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695-696.
- Henrissat, B., Romeu, A. (1995): Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **311**: 350-351
- Herbert, R.A. (1992): A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Tibtech.* **10**: 395-402
- Imanaka, T., Kaieda, T., Sato, K., Taguchi, H. (1972): Optimization of alpha-galactosidase production by mold. I. Alpha-galactosidase production in batch and continuous culture and a kinetic model for enzyme production. *J. Ferment. Technol.* **50**: 633-646
- Jackson, P. (1994): High-resolution polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled reducing saccharides. *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. **230**: 250-265
- Kachurin, A.M., Golubev, A.M., Geisow, M.M., Veselkina, O.S., Isaeva-Ivanova, L.S., Neustroev, K.N. (1995): Role of methionine in the active site of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* **308**: 955-964
- Kaneko, R., Kusakabe, I., Ida, E., Murakami, K. (1991): Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 109-115
- Kaneko, R., Kusakabe, I., Sakai, Y., Murakami, K. (1990): Substrate specificity of  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 237-238
- Kemény, S., Deák, A. (1990): Mérések tervezése és eredmények értékelése. Műszaki Könyvkiadó. Budapest
- King, M.R., Yernool, D.A., Eveleigh, D.E., Chassy, B.M. (1998): Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermotoga neapolitana*: cloning, sequencing and expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**: 37-42
- Kocourek, J., Hořejší, V. (1981): Defining a lectin. *Nature* **290**: 188
- Koizumi, K., Tanimoto, T., Okada, Y., Hara, K., Hashimoto, H., Kitahata, S. (1995): Isolation and characterization of novel heterogeneous branched cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) produced by transgalactosylation with  $\alpha$ -galactosidase from coffee bean. *Carbohydr. Res.* **278**: 129-142
- Korhola, M., Liljeström, P.L., Kopu, H., Ruohola, H., Torkkeli, T. (1987): Structure and expression of *Saccharomyces* MEL1 gene. *In: Biological research on industrial yeast Vol. III* (eds. G.G. Stewart, I. Russell, R. D. Klein, R.R. Hiesch) CRC press, Boca Ranton pp. 119-124
- Kornreich, R., Desnick, R.J., Bishop, D.F. (1989): Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3301-3302
- Kotwal, S.M., Gote, M.M., Khan, M.I., Khire, J.M. (1999): Induction, purification and characterisation of a constitutive intracellular  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Humicola* sp. *J. Ind. Microbial Biotechnol.* **23**: 661-667
- Kotwal, S.M., Khan, M.I., Khire, J.M. (1995): Production of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from thermophilic fungus *Humicola* sp. *Journal of Industrial Microbiology.* **15**: 116-120
- Krahe, M., Antranikian, G., Märkl, H. (1996): Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews.* **18**: 271-285
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685



- Lazo, P.S., Florez, I.G., Ochoa, A.G., Gascon, S. (1981): Induction and catabolite repression of  $\alpha$ -galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Cell. Mol. Biol.* **27**: 615-622
- Lazo, P.S., Ochoa, A.G., Gascon, S. (1977):  $\alpha$ -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cellular localisation, and purification of the external enzyme. *Eur. J. Biochem.* **77**: 375-380
- Lazo, P.S., Ochoa, A.G., Gascon, S. (1978):  $\alpha$ -Galactosidase (Melibiase) from *Saccharomyces carlsbergensis*: Structural and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**: 316-324
- Leder, S., Hartmeier, W., Marx, S.P. (1999):  $\alpha$ -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Current Microbiology.* **38**:101-106
- Leenhouts, K.J., Bolhuis, A., Ledebouer, A., Venema, G., Kok, J. (1995): Production of secreted guar  $\alpha$ -galactosidase by *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 75-80
- Lenny, L.L., Hurst, R., Goldstein, J., Galbraith, R.A. (1994): Transfusions to group O subjects of 2 units of red cells enzymatically converted from group B to group O. *Transfusion* **34**: 209-214
- Li, D.H., Yang, Y.J., Peng, Y.L., Shen, C.Y. (1998): Purification and characterisation of extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol. Res.* **102**: 568-572
- Li, D.H., Yang, Y.J., Shen, C.Y. (1997): Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol. Res.* **101**: 18-22
- Liebl, W., Wagner, B., Schellhase, J. (1998): Properties of an  $\alpha$ -galactosidase, and structure of its gene *galA*, within an  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactoside utilization gene cluster of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 1-11
- Liljeström, P.L., Liljeström, P. (1987): Nucleotide sequence of the *melA* gene, coding for alpha-galactosidase in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **15**: 2213-2220
- Liljeström, P. (1985): The nucleotide sequence of the yeast *MEL1* gene. *Nucleic Acid Res.* **13**: 7257-7268
- Linden, J.C. (1982): Immobilized  $\alpha$ -D-galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 130-136
- Luonterinen, E., Alatalo, E., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Penttilä, M., Tenkanen, M. (1998a):  $\alpha$ -Galactosidase of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterisation of the gene encoding AGL I. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**: 179-188
- Luonterinen, E., Tenkanen, M., Viikari, L. (1998b): Substrate specificities of *Penicillium simplicissimum*  $\alpha$ -galactosidases. *Enzyme and Microbial Technology.* **22**: 192-198.
- Lusis, A.J., Paigen, K. (1976): Properties of mouse  $\alpha$ -galactosidase. *Biochimica et Biophysica Acta.* **437**: 487-497
- Maheshwari, R., Balasubramanyam, P.V. (1988): Simultaneous utilisation of glucose and sucrose by thermophilic fungi. *J. Bacteriol.* **170**: 3274-3280
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. (2000): Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 461-488
- Malhotra, O.P., Dey, P.M. (1967): Purification and physical properties of sweet-almond  $\alpha$ -galactosidase. *Biochem. J.* **103**: 508-513
- Manzanares, P., de Graaff, L.H., Visser, J. (1998): Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 383-390
- Margolles-Clark, E., Ilmén, M., Penttilä, M. (1997): Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *J. Biotechnology* **57**: 167-179
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Luonterinen, E., Penttilä, M. (1996): Three  $\alpha$ -galactosidases genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **240**: 104-111
- Martinez, J.P., Elorza, M.V., Gonzalbo, D., Sentandreu, R. (1982): Regulation of  $\alpha$ -galactosidase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and effect of cerulenin on the secretion of this enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **716**: 158-168
- Mathew, C.D., Balasubramaniam, K. (1987): Mechanism of action of  $\alpha$ -galactosidase. *Phytochemistry (Oxf)* **26**: 1299-1300
- McCleary, B.V. (1988):  $\alpha$ -D-galactosidase from lucerne and guar seed. *Methods in Enzymology* **160**: 627-632

- McCutchen, C.M., Duffaud, G.D., Leduc, P., Peterson, A.R.H., Tayal, A., Khan, S.A., Kelly, R.M. (1996):** Characterisation of extremely thermostable enzymatic breakers ( $\alpha$ -1,6-galactosidase and  $\beta$ -1,4-mannanase) from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolysis of guar gum. *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 332-339
- McGhee, J.E., Silman, R., Bagley E.B. (1978):** Production of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus awamori* properties and action on p-nitrophenyl  $\alpha$ -galactoside and galacto-oligosaccharides of soy milk. *J. Am. Oil. Chem.Soc.* **55**: 244-247
- McKay, A.M. (1991):** Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -galactosidase during fungal growth on polygalacturonate. *Journal of Food Science.* **56**: 1749-1750
- Mitsutomi, M., Ohtakara, A. (1988):** Isolation and identification of oligosaccharides produced from raffinose by transgalactosylation reaction of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2305-2311
- Mitsutomi, M., Ohtakara, A. (1984):** A simplified procedure for purification and crystallization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarius*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 3153-3155
- Mitsutomi, M., Uchida, Y., Ohtakara, A. (1985):** Immobilization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme. *J. Ferment. Technol.* **63**: 325-329
- Mulimani, V.H., Ramalingam (1997):** Short Communication: Enzymatic degradation of raffinose family sugars in chickpea flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **13**: 583-585
- Murali,R., Ioannou, Y.A., Desnick, R.J., Burnett, R.M. (1994):** Crystalization and preliminary X-ray analysis of human  $\alpha$ -galactosidase A complex. *J. Mol. Biol.* **239**: 578-580
- Naumova, E.S., Turakainen, H., Naumov, G.I., Korhola, M. (1996):** Superfamily of alpha-galactosidase MEL genes of the *Saccharomyces sensu stricto* species complex. *Mol Gen. Genet.* **253**: 111-117
- Nelson, N. (1944):** A photometric adaptation for the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380
- Neumann, N.P. (1972):** Oxidation with hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* **25**: 393-400
- Nguyen, D.Q., Rezessy-Szabó, J.M., Claeysens, M., Stals, I., Hoschke, Á. (2002):** Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme Microbiol. Techn.* **31**: 345-352
- Nilsson, K.G.I. (1987):** A simple strategy for changing the regioselectivity of glycosidase-catalysed formation of disaccharides. *Carbohydr. Res.* **167**: 95-103
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1981):** What is a lectin? *Arch. Biochem. Biophys.* **206**: 458-462
- Oda, Y., Fukunaga, M. (1999):** Isolation and characterization of *MELt* gene from *Torulaspora delbrueckii* IFO 1255. *Yeast.* **15**: 1797-1801
- Ohtakara, A., Mitsutomi, M. (1987):** Immobilization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitosan beads and its application to the hydrolysis of raffinose in beet sugar molasses. *J. Ferment. Technol.* **65**: 493- 498
- Ohtakara, A., Mitsutomi, M., Uchida, Y. (1984):** Purification and enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1319-1327
- Okumiya, T., Ishii, S., Takenaka, T., Kase, R., Kamei, S., Sakuraba, H., Suzuki, Y. (1995):** Galactose stabilizes various missense mutants of  $\alpha$ -galactosidase in Fabry disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**: 1219-1224
- Overbeeke N., Fellingner A.J., Toonen M.Y., van Wassenaar D., Verrips C.T. (1989):** Cloning and nucleotide sequence of the alpha-galactosidase cDNA from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar). *Plant Mol. Biol.* **13**: 541-550
- Overbeeke, N., Fellingner, A.J., Hughes, S.G. (1995):** Production of guar alpha-galactosidase by hosts transformed by recombinant DNA methods. EP 0255153
- Overbeeke, N., Thermorshuizen, G.H.M., Giuseppin, M.L.F., Underwood, D.R., Verrips, C.T. (1990):** Secretion of the  $\alpha$ -galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) by *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1429-1434
- Pederson, D.M., Goodman, R.E. (1980):** Isozyme of  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*.

Can. J. Microbiol. **26**, 978-984

- Porter, J.E., Herrmann, K.M., Ladish, M.R. (1990):** Integral kinetics of  $\alpha$ -galactosidase purified from *Glycine max* for simultaneous hydrolysis of stachyose and raffinose. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 15-22
- Porter, J.E., Sarikaya, A., Herrmann, K.M., Ladisch, M.R. (1992):** Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean  $\alpha$ -galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 609-613
- Prasad, A.R.S., Kurup, C.K.R., Maheshwari, R. (1979):** Effect of temperature on respiration of a mesophilic and thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 355-361
- Price, K.R., Lewis, J., Wyatt, G.M., Fenwick, G.R. (1988):** Flatulence-causes, relation to diet and remedies. *Nahrung* **32**: 609-626
- Pridham, J.B., Dey, P.M. (1974):** The nature and function of higher plant  $\alpha$ -galactosidases. *In: Plant Carbohydrate Biochemistry* (ed. J.B. Pridham) Academic Press. London-New York-San Francisco pp. 83-96
- Puchart, V., Vršanská, M., Bhat, M.K., Biely, P. (2000):** Purification and characterisation of  $\alpha$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1524**: 27-37
- Rajasekaran, A.K., Maheshwari, R. (1990):** Effect of growth temperature on lipid composition of a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Indian J. Exp. Biol.* **28**: 134-137
- Rauen, H. M. (1964):** *Biochemisches Taschenbuch*. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York. pp. 89-121
- Reddy, V.A., Johnson, R.S., Biemann, K., Williams, R.S., Ziegler, F.D., Trimble, R.B., Maley, F. (1988):** Characterisation of the glycosylation sites in yeast external invertase. *J. Biol. Chem.* **263**: 6978-6985
- Ríos, S., Pedregosa, A.M., Monistrol, I.F., Laborda, F. (1993):** Purification and molecular properties of an  $\alpha$ -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**: 35-42
- Rivero-Urgell, M., Santamaria-Orleans, A. (2001):** Oligosaccharides: application in infant food. *Early Hum. Development.* **65**: S43-S52
- Rombouts, F.M., Pilnik, W. (1980):** Pectic enzymes Ch.5. *In: Microbial Enzymes and Bioconversions* (ed. A.H. Rose) Academic Press, New York p 230
- Rother, R.P., Squinto, S.P. (1996):** The  $\alpha$ -galactosyl epitope: A sugar coating that makes viruses and cells unpalatable *Cell* **86**: 185-188
- Ruohola, H., Liljeström, P.L., Torkkeli, T., Kopu, H., Lehtinen, P., Kalkkinen, N., Korhola, M. (1986):** Expression and regulation of yeast *MEL1* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**: 179-185
- Rüdriger, H. (1997):** Structure and function of plant lectins. *In: Glycosciences, Status and Perspectives* (eds. H.J. Gabius, S. Gabius), Chapman & Hall, Weinheim, pp. 415-438
- Sakai, K., Tachiki, T., Kumagai, H., Tochikura, T. (1987):** Hydrolysis of  $\alpha$ -D-galactosyl oligosaccharides in soymilk by  $\alpha$ -galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 315-322
- Savel'ev, A.N., Ibatylin, F.M., Eneyskaya, E.V., Kachurin, A.M., Neustroev, K.N. (1996):** Enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei*. *Carbohydr. Res.* **296**: 261-273
- Schiffmann, R., Murray, G.J., Treco, D., Daniel, P., Sellos-Mouta, M., Myers, M., Quirk, J.M., Zirzow, G.C., Borowski, M., Loveday, K., Anderson, T., Gillespie, F., Oliver, K.L., Jeffries, N.O., Doo, E., Liang, T.J., Kreps, C., Gunter, K., Frei, K., Crutchfield, K., Selden, R.F., Brady, R. (2000):** Infusion of  $\alpha$ -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 365-370
- Schiraldi, C., de Rosa, M. (2002):** The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Tibtech.* **20**: 515-521
- Schomburg, D., Salzmann, M. (1991):** *Enzyme Handbook 4*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Scigelova, M, Singh, S., Crout, D.H.G. (1999):** Glycosidases - a great synthetic tool. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **6**: 483-494
- Scigelova, M., Crout, D. H. G. (2000):** Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **8**: 175-181

- Segel, I.H. (1975):** Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, London-Sydney-Toronto
- Sharon, N. (1974):** Lectins (Phytoagglutinins). *In: Plant Carbohydrate Biochemistry* (ed. J.B. Pridham), Academic Press. London-New York-San Francisco, pp. 240-244
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Kasamo, K., Kusakabe, I. (1995b):** Nucleotide sequence of  $\alpha$ -galactosidase cDNA from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 1345-1348
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Sato, T., Kim, W., Yoshida, S., Kaneko, S., Kasamo, K., Kusakabe, I. (1997):** Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 592-598
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Park, G.G., Komatsu, Y., Sato, T., Kaneko, R., Nagasaki, H., Yoshida, S., Kasamo, K., Kusakabe, I. (1995a):** Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 2333-2335
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Yoshida, S., Kaneko, S., Park, G.G., Kusakabe, I. (1999):** Purification and Characterization of Recombinant *Mortierella vinacea*  $\alpha$ -Galactosidases I and II Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1096-1099
- Shibuya, H., Nagasaki, H., Kaneko, S., Yoshida, S., Park, G.G., Kusakabe, I., Kobayashi, H. (1998):** Cloning and High-Level Expression of  $\alpha$ -Galactosidase cDNA from *Penicillium purpurogenum*. *Applied and Environmental Microbiology.* **64**: 4489-4494
- Singh, S., Scigelova, M., Crout, D.H.G. (1999):** Glycosidase-catalysed synthesis of  $\alpha$ -galactosyl epitopes important in xenotransplantation and toxin binding using the  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium multicolor*. *Chem. Commun. (Cambridge)* 2065-2066
- Sinnott, M.L. (1990):** Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**: 1171-1202
- Slominski, B.A. (1994):** Hydrolysis of Galactooligosaccharides by Commercial Preparations of  $\alpha$ -Galactosidase and  $\beta$ -Fructofuranosidase: Potential for Use as Dietary Additives. *J. Sci. Food Agric.* **65**: 323-330
- Somiari, R.I., Balogh, E. (1992):** Hydrolysis of raffinose and stachyose in cowpea (*Vigna unguiculata*) flour, using  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **8**: 564-566
- Somiari, R.I., Balogh, E. (1995):** Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. *Enzyme and Microbial Technology.* **17**: 311-316
- Somogyi, M. (1945):** A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**: 61
- Somogyi, M. (1952):** Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23
- Spangenberg, P., André, C., Dion, M., Langlois, V., Rabiller, C. (2002):**  $\alpha$ -Galactosyl fluoride in transfer reactions mediated by the green coffee beans  $\alpha$ -galactosidase in ice. *Carbohydr. Res.* **337**: 221-228
- Spangenberg, P., André, C., Dion, M., Rabiller, C., Mattes, R. (2000):** Comparative study of new  $\alpha$ -galactosidases in transglysylation reactions. *Carbohydr. Res.* **329**: 65-73
- Speake, B.K., Malley, D.J., Hemming, F.W. (1981):** The effect of tunicamycin on secreted glycosidases of *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**: 110-117
- Srinivas, M.R.S., Padmanabhan, S., Lonsane, B.K. (1993):** Growth kinetics,  $\alpha$ -galactosidase biosynthesis, and concomitant production of invertase by *Aspergillus niger* NCIM 839 in solid state fermentation system. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **15**: 41-46
- Stark, M.J.R., Milner, J.S. (1989):** Cloning and analysis of the *Kluyveromyces lactis* TRP1 gene: a chromosomal locus flanked by genes encoding inorganic pyrophosphatase and histon H3. *Yeast* **5**: 35-50
- Streets, B.W., Ingle, M.B. (1972):** The effect of temperature on spore germination and growth of *Mucor miehei* in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **18**: 975-979
- Suzuki, H., Li, S., Li, Y. (1970):**  $\alpha$ -Galactosidase from *Mortierella vinacea*. Crystalization and properties. *J. Biol. Chem.* **245**: 781-786
- Sümeği, B. (1997):** Biokémiai praktikum. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó. Budapest
- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirama, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., Horikoshi, K. (2000):** Complete genome sequence of the

- alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4317-4331
- Talbot, G., Sygusch, J. (1990):** Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology.* **56**: 3505-3510
- Tansey, M.R., Brock, T.D. (1972):** The upper temperature limit for eukaryotic organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2426-2428
- Thananunkul, D., Tanak, M., Chichester, C.O., Lee, T. (1976):** Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*: Entrapment of  $\alpha$ -galactosidase within polyacrylamide gel. *J. Food Sci.* **41**: 173-175
- Thippeswamy, S., Mulimani, V.H. (2002):** Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochemistry* **38**: 635-640
- Thompson, J., Pikiš, A., Ruvinov, S.B., Henrissat, B., Yamamoto, H., Sekiguchi, J. (1995):** The gene *glvA* of *Bacillus subtilis* 168 encodes a metal-requiring, NAD(H)-dependent 6-phospho-alpha-glucosidase. Assignment to family 4 of the glycosylhydrolase superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**: 27347-27356
- Trent, J.D., Gabrielsen, M., Jensen, B., Neuhard, J., Olsen, J. (1994):** Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the tree phylogenetic domains. *J. Bacteriol.* **176**: 6148-6152
- Turakainen, H., Hankaanpää, M., Korhola, M., Aho, S. (1994a):** Characterization of MEL genes in the genus *Zygosaccharomyces*. *Yeast* **10**: 733-745
- Turakainen, H., Kristo, P., Korhola, M. (1994b):** Consideration of the evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* MEL gene family on the basis of the nucleotide sequences of the genes and their flanking regions. *Yeast* **10**: 1559-1568
- Turakainen, H., Aho, S., Korhola, M. (1993):** MEL Gene Polymorphism in the Genus *Saccharomyces*. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**: 2622-2630
- Ulezlo, I.V., Zaprometova, O.M. (1982):** Microbial alpha-galactosidase (a review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **18**: 1-12
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P. (1998a):** Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**: 575-692
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Pusztai, A., Bardocz, S. (1998b):** Handbook of Plant Lectins. Properties and Biomedical Applications. Wiley, Chichester
- Van den Broek, L.A.M., Ton, J., Verdoes, J.C., Van Laere, K.M.J., Voragen, A.G.J., Beldman, G. (1999):** Synthesis of  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides by a cloned  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnology Letters.* **21**: 441-445
- Van Laere, K.M.J., Hartemink, R., Beldman, G., Pitson, S., Dijkema, C., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (1999):** Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083  $\alpha$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **52**: 681-688
- Van Peij, N.N.M.e., Gielkens, M.M.C., de Vries, R.P., Visser, J., de Graff, L.H. (1998):** The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3615-3619
- Vogel, H.J. (1964):** Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* **903**: 435-446
- Waffenschmidt, S., Jaenicke, L. (1987):** Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate. *Anal. Biochem.* **165**: 337-340
- Wali, A.S., Mattoo, A.K., Modi, V.V. (1978):** Stimulation of growth and glucose catabolite enzymes by succinate in some thermophilic fungi. *Arch. Microbiol.* **118**: 49-53
- Wilcke, H.L., Hopkins, D.T., Waggle, D.H. (1979):** Soy protein in human nutrition. Academic Press, New York
- Williams, J., Villarroja, H., Petek, F. (1977):** Purification and properties of an  $\alpha$ -D-galactoside

- galactohydrolase from the seeds of *Trifolium repens* (White Clover). *Biochem. J.* **161**: 509-515
- Williams, J., Villarroya, H., Petek, F. (1978):**  $\alpha$ -Galactosidases II, III and IV from Seeds of *Trifolium repens*. Purification, physicochemical properties and mode of galactomannan hydrolysis *in vitro*. *Biochem. J.* **175**: 1069-1077
- Woese, C.R., Fox, G.E. (1977):** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5088-5090
- Wong, H.C., Hu, C.A., Yeh, H.L., Su, W., Lu, H.C., Lin, C.F., (1986):** Production, purification, and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Monascus pilosus*. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 1147-1152
- Wright, C., Kafkewitz, D., Somberg, E.W. (1983):** Eucaryote thermophily: role of lipids in the growth of *Talaromyces thermophilus*. *J. Bacteriol.* **156**: 493-497
- Yamasaki, R. B., Osuga, D.T., Feeney, R. E. (1982):** Periodate oxidation of methionone in protein. *Anal. Biochem.* **126**: 183-189
- Zapater, I.G., Ullah, A.H., Wodzinski, R.J. (1990):** Extracellular  $\alpha$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.22) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, purification and characterisation. *Prep. Biochem.* **20**: 263-296
- Zaprometova, O.M., Ulezlo, I.V. (1988):** Isolation and purification of a Mold  $\alpha$ -Galactosidase. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* **10**: 232-241
- Zeilinger, S., Kristufek, D., Arisan-Atak, I., Hodits, R., Kubicek, C.P. (1993):** Conditions of formation, purification, and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**: 1347-1353
- Zhu, A., Goldstein, J. (1994):** Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. *Gene (Amst.)* **140**: 227-231
- Zhu, A., Wang, Z.K., Goldstein, J. (1995):** Identification of tyrosine 108 in coffee bean  $\alpha$ -galactosidase as an essential residue for enzyme activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**: 260-264

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton köszönöm **Dr Hoschke Ágoston** tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette kutatásaim elvégzését, valamint segítőkészségével és hasznos szakmai tanácsaival támogatta kutatómunkámat.

Köszönettel tartozom **Dr Nyeste László** egyetemi tanárnak, akinek tanítványaként ismerkedhettem meg a fermentációs eljárásokkal és köteleztem el magam az alkalmazott mikrobiológiai és biomérnöki kutatások mellett. A disszertációban bemutatott kutatások anyagi háttérét a témavezetésével megvalósult „Up stream és down stream biomérnöki kutatások” OTKA témák biztosították. Őszinte személyisége és a tanári pálya iránti elkötelezettsége példaképpül szolgál számomra.

Köszönet közvetlen munkatársaimnak **Dr Nguyen Duc Quang** egyetemi tanársegédnek és **Bujna Erika** okl. élelmiszermérnöknek a kísérletek során nyújtott lelkes segítségükért és pontos, igényes munkájukért. Nagymértékben segítette munkám a Sör- és Szeszipari Tanszék munkatársai között lévő egymást segítő és baráti légkör.

Hálás vagyok hallgatóimnak, akik a fiatalság varázslatával népesítették be a laboratóriumot és hallatlan szorgalommal és kitartással dolgoztak a választott témáikon. Név szerint is meg kell említeni az „ $\alpha$ -galaktozidázosok csapatát”: **Závoczký Zoltán** (1998), **Kálmán László** (1999) **Sinkó Ilona** (2000), **Bokor Viktória** (2001), **Takács Krisztina** (2002), **Kovács Magdolna** (2002), **Bujna Erika** (2002), és **Lefler Dóra Dominika** (2003), akiknek eredményei ebben a dolgozatban is bemutatásra kerültek.

Köszönöm **Dr Mahalingeshwara Bhat** tudományos kutató (Institute of Food Research, Norwich Laboratory, UK) kedvességét, hogy rendelkezésemre bocsátotta értékes *Thermomyces lanuginosus* törzsgyűjteményét. Hálásan köszönöm **Dr Maráz Anna** egyetemi tanárnak, hogy segített ezt a gyűjteményt megtartani, valamint baráti támogatását a munkám folyamán.

Nagyra értékelem **Prof. Dr. Marc Claeysens** (Laboratory of Biochemistry, Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Gent University) szakmai konzultációit és gyakorlati segítségét a téma kidolgozása során.

Köszönöm **Dr. Dobolyi Csaba** egyetemi docens engedélyét, hogy *Thermomyces lanuginosus* fonalas gombáról készített fotóját felhasználhattam a címlaptervhez.

Különösen hálás vagyok **édesanyámnak** türelméért és megbocsátó szeretetéért, mivel az utóbbi időben szegyenletesen kevés figyelmet fordítottam reá. Köszönöm öcsém és húgom, valamint családjaik biztatásait. Őszintén köszönöm gyermekeim, **Rezessy Anna** és **Rezessy Gergely** támogatását, önzetlen segítségét és **férjem** megértő türelmét.

Budapest, 2003. szeptember