



---

Élelmiszertudományi Kar

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

RADVA DÁNIEL  
Doktori (PhD) értekezés tézisei

Készült:  
Budapesti Corvinus Egyetem  
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2013.

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** **Dr. Felföldi József**  
Egyetemi tanár  
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,  
Fizika-Automatika Tanszék

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

**A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. BEVEZETÉS – A MUNKA ELŐZMÉNYEI

A természetben előforduló enzimeket régóta az élelmiszer előállítás során is széleskörűen alkalmazzák (pl. sör-, bor- és sajt készítés esetében). A fermentációs technológiák fejlődésének következtében a múlt század végén nyílt lehetőség az enzimek ipari méretekben történő előállítására, amely lehetővé tette az enzimek felhasználását az ipar számára (pl. textil-, detergens- és élelmiszeripar). A jelenlegi ipari felhasználásban, túlnyomó többségben a 3. enzimosztályba (hidrolázok) tartozó enzimek vannak jelen, amelyek szerepe a különböző biomolekulák hidrolízis lebontása. Ezek egyik nagyobb csoportjába a szénhidrátbontó enzimek tartoznak (főként az amilázok és a cellulázok), mivel a keményítő-, textil-, üzemanyag-, sütő- és detergens ipar nagy mennyiségben használja fel őket.

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

Az Élelmiszertudományi Kar Alkalmazott Kémia Tanszékén Dr. Kosáry Judit egyetemi tanár témavezetésével, illetve közreműködésével már több olyan pályázati projekt futott, amely hidrolázok, közöttük a  $\beta$ -glükozidáz rögzítését, a rögzített enzimek stabilitását, illetve alkalmazhatóságukat tanulmányozta, elsősorban reverz hidrolitikus folyamatokban. Témavezetésével Balogh Teréz PhD dolgozatában kétféle rögzített  $\beta$ -glükozidáz készítményt állított elő. Ezek közül az Akrilex C-100

hordozóra rögzített  $\beta$ -glükózidáz igen alkalmasnak bizonyult az *O*-alkil-glükózidok új, preparatív léptékű reverz hidrolitikus szintézisére. Ezt a készítményt, a felületi réteghez kötött, majd gélbezárt készítménnyel együtt borjavítási kísérletekben is tesztelték.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során egy olyan új, rögzített  $\beta$ -glükózidáz enzimekészítmény előállítására törekedtem, amelynek előállítása olcsó és egyszerű technológiát igényel, valamint az előállított preparátum biztonságosan alkalmazható különböző élelmiszeripari folyamatokban. Különös figyelmet kívántam fordítani az alkalmazott kombinált rögzítési technika (első lépésben adszorpciós rögzítés az Amberlite IRA 900 anioncserélő gyanta felületén, majd keresztkötések kialakítása a felületen megkötődött enzimek között) vizsgálatára, mivel  $\beta$ -glükózidáz enzim esetében először került alkalmazásra, valamint az így kialakított kötőerők és a rögzítési eljárás paramétereinek között fennálló összefüggések vizsgálatát még szintén nem végezték el. Ehhez saját vizsgálati módszer kidolgozása volt szükséges. Ezek értelmében munkám kezdetekor a következő célokat fogalmaztam meg:

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

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A dolgozat kísérleti része a Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszékén történt. A natív és rögzített  $\beta$ -glükozidáz enzimkészítmények, árpa  $\beta$ -glükán lebontásában való felhasználhatósági vizsgálatait a norvégiai Nofima Mat (The Norwegian Institute of Food Research) kutatóintézetben végeztem. Kísérleteim és az azokat kiegészítő munkáim során mindig p.a. minőségű vegyszereket használtam. Munkám során, a rögzítési eljárás és az enzimkészítmények élelmiszeripari felhasználhatósági vizsgálataihoz, Fluka, mandulából izolált  $\beta$ -glükozidáz (EC 3.2.1.21) enzimkészítményt ( $M_r \sim 135000$ ) használtam. Az árpa  $\beta$ -glükán hidrolizátum előállításához a Megazyme által forgalmazott, *Bacillus subtilis* törzsből izolált glükánáz enzimet (EC 3.2.1.73) használtam.

#### 3.1 Enzimrögzítési eljárás

Az enzimrögzítési eljáráshoz alkalmazott *Amberlite IRA 900 OH* (Rohm & Haas) típusú makropórusos anioncserélő gyantát a rögzítési kísérletek előtt, úgynevezett regenerálási eljárásban állítottam elő a gyári, klorid ion fázisban lévő termékből, nátrium-hidroxid oldattal való kezeléssel. Olyan kombinált rögzítési eljárást alkalmaztam, amely két lépésből tevődött össze: előbb a hordozó felületére történő adszorpciós rögzítéssel kapcsoltam az enzim molekulákat (a hordozót, enzimet tartalmazó pufferoldatban rázattam), majd keresztkötések létrehozásával kívántam fokozni a biokatalizátor felhasználási stabilitását, amihez glutáraldehid oldatot használtam. A rögzítési eljárás két lépése számára kedvező paramétereket külön-külön állapítottam meg.

#### 3.2 $\beta$ -glükozidáz enzimaktivitás meghatározása

Egyik esetben a mérési módszerhez szubsztrátként cellóbiózt használtam és az enzimaktivitást a felszabaduló glükóz mennyiségének enzimatis úton történő meghatározásával állapítottam meg. Általánosan viszont a mérési módszerhez szubsztrátként *p*-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozidot (pNPG) használtam és az enzimaktivitást a felszabaduló *p*-nitro-fenol mennyiségének 410 nm hullámhosszon történő fotometráálásával állapítottam meg. Ezt a mérési módszert használtam a rögzítési eljárás kedvező paramétereinek a meghatározására, a rögzített enzimkészítmények felhasználási stabilitásának a vizsgálataira, valamint a rögzített enzimkészítmények jellemzésére (enzimkinetikai állandók, pH és hőmérséklet optimumok meghatározása).

### **3.3 Kinetikus-leoldódási vizsgálat**

A jellemezni kívánt preparátumot közvetlenül a rögzítési eljárás után, több aktivitásmérési cikluson keresztül vizsgáltam. A ciklusok során, a rögzített enzimmolekula aktivitás értékeinek változása alapján lehet következtetni a hordozó és az enzimmolekula között kialakult kötőerő tulajdonságaira. Az egyes aktivitásmérési elegyekben a kezelés hatására „leoldódott enzimaktivitás” is meghatározásra került, amely alapján következtetni lehetett, hogy a rögzített készítmény esetleges aktivitáscsökkenésének hátterében az enzimfehérje hordozón történő inaktiválódása, vagy pedig a felületről való leoldódása állt. Ezt a módszert alkalmaztam a rögzítési eljárás kedvező paramétereinek meghatározásához.

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

A cellobióz bontási folyamatának vizsgálatára olyan modell oldatot hoztam létre, amelyben a szubsztrátként jelen levő cellobióz bontásából keletkező glükóz mennyiségének meghatározásával következtethetem a folyamat hatékonyságára. Mivel az iparban a cellulóz lebontására használt mikroorganizmusok pH optimuma eltérő lehet, ezért az enzimmolekulák (oldott és rögzített) felhasználhatóságát különböző pH értékek alkalmazása mellett vizsgáltam.

### **3.5 Felhasználhatósági vizsgálat borászati körülmények között**

A pH és etanoltartalom katalitikus aktivitásra gyakorolt hatását mind a natív, mind pedig a rögzített enzimmolekula esetében, pNPG szubsztrát alkalmazása mellett vizsgáltam botmintában és különböző modelloldatokban. A rögzített enzimmolekula felhasználási stabilitását, elméleti és gyakorlati megfontolások alapján cellobióz szubsztrát alkalmazása mellett határoztam meg bormintában és különböző modelloldatokban.

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

A glükóz alifás alkoholokkal képzett *o*-glükozidjainak előállításához a reakcióelegyek különböző alkoholokból (n-hexanol, 2-butoxi-etanol, butanol) és 1,2-diacetoxi-etánból tevődtek össze, valamint egy esetben csak butanol volt az összetevő. A reakcióelegyek minden esetben 10 % vizet tartalmaztak és glükózra nézve 10 mM koncentrációjúak voltak. A reverz hidrolitikus folyamat hatékonyságára a rendszerben szabadon levő glükóz mennyiségének csökkenése alapján következtettem, valamint a három napos reakció során, nyomon követtem az enzimmolekulák maradék aktivitását is.

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

A  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharidok meghatározására nagyhatékonyságú anioncserélő kromatográfiát (HPAEC) alkalmaztam, pulzáló amperometrikus detektálással (PAD), amely során a mennyiségi meghatározáshoz a korábbi irodalmi gyakorlattól eltérően belső standardot, valamint a kereskedelemben nem rég hozzáférhető árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid standardokat használtam.

A kidolgozott mérési módszerrel vizsgáltam az enzimmészítmények működését a tiszta árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid, továbbá glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztráton is, valamint meghatároztam az enzimmészítmények kinetikai paramétereit (a felszabaduló végtermék és a szubsztrát mennyisége alapján is) ezekben a rendszerekben.

### 3.8 Mérési eredményeim reprodukálhatósága

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

## 4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### 4.1 A $\beta$ -glükozidáz enzim aktivitásmérési módszerének kiválasztása

Kísérleti munkám első lépéseként ki kellett választanom a számomra legalkalmasabb módszert az enzimaktivitás meghatározására. Ehhez a cellobióz és a *p*-nitro-fenil- $\beta$ -D-glükopiranozidot (pNPG) alkalmazó módszereket vizsgáltam. Mind költségráfordítás szempontjából, mind pedig a mérés időigényét tekintve a pNPG szubsztrátot alkalmazó módszer volt számomra előnyösebb. Emellett azt is meghatároztam, hogy a használt enzimmészítmény pNPG szubsztráton pH 5,50 érték mellett rendelkezik maximális aktivitással ( $10,54 \mu\text{mol perc}^{-1} \text{ enzim mg}^{-1}$ ).

### 4.2 A rögzítési eljárás vizsgálata

A rögzítési eljárás során a  $\beta$ -glükozidáz enzimhez elsőként használtam hordozóként az *Amberlite IRA 900 Cl* típusú anioncserélő gyantát (korábban már alkalmazták hordozóanyagként szénhidrátok hidrolizálására szolgáló enzimkeverék rögzítéséhez, jó mechanikai tulajdonságú, olcsó és könnyen hozzáférhető). Rögzítési kísérleteim során egy olyan kombinált rögzítési eljárást alkalmaztam, ahol első lépésként az enzimet adszorbeáltattam a hordozó pórusszerkezetéhez, amely során Van der Waals kötések, ionos kötések és hidrogénhidak alakulhatnak ki a hordozó és az enzimmolekula között. Ezek a kötések – különösen a magas ion és szubsztrát koncentráció esetén – nem elég stabilak, ezért a

rögzítési eljárás második lépésében glutáraldehides kezelést alkalmaztam, ami egy stabilabb fehérje-struktúra kialakulását eredményezi, a hordozón levő fehérjemolekulák összekapcsolása révén.

Az immobilizálási eljárás kidolgozása során az említett két rögzítési lépés kedvező paramétereinek megállapítását külön-külön végeztem el, és ezek alapján határoztam meg a kombinált rögzítési eljárás számára előnyös feltételeket. Ehhez megalkottam a számomra megfelelő ún. kinetikus-leoldódási vizsgálatot, amellyel egyszerre határozható meg az immobilizált enzimkészítmény aktivitása és a „rögzült enzimaktivitás leoldódása” alapján annak stabilitása.

#### ***4.2.1 Adszorpciós rögzítési eljárás vizsgálata***

Első lépésként, az adszorpciós kötődés kialakulását befolyásoló paraméterek vizsgálatát végeztem el, amelynek során a pH, só koncentráció, hőmérséklet és a szubsztrát jelenlétének hatását vizsgáltam. A kinetikus-leoldódási vizsgálat során tapasztalható, az adszorpciós kötődésre általánosan jellemző „aktivitás leoldódás” kinetika azt mutatta, hogy a rögzítési eljárás után, minden esetben az első aktivitásmérési ciklusban tapasztalható a legnagyobb aktivitás, amely aktivitás a következő ciklusok során egy fordított telítési görbéhez hasonló módon csökken, amit az enzimfehérjék leoldódása okozott. Számomra az első ciklusban mérhető aktivitás volt a legfontosabb, mivel tulajdonképpen ezt a felvitt aktivitást stabilizáltam a rögzítési eljárás második lépésében a glutáraldehides kezeléssel. Nem várt módon a töményebb (0,1 M) nátrium-acetát puffer alkalmazása esetén mértem a legnagyobb aktivitás értéket az első ciklusban. Ennek oka egy részleges hidroxid-actát anion csere lehetett a hordozó és a közeg között, ami a közeg pH értékét (8,2) az enzim izoelektromos pontja (5,5) fölé emelte, így az enzim felületén nagyobb negatív töltés keletkezhetett, amely elősegíthette az enzim kötődésének mértékét az anioncserélő felületéhez. A rögzítés hatásfokára a 24 órás eljárás során sem a hőmérséklet, sem a szubsztrát jelenléte nem volt hatással. Adott mennyiségű hordozó esetében azt is vizsgáltam, hogy a bevitt enzimmennyiség növelésével hogyan változik a rögzült aktivitás. Az elérhető maximális hozam (a rögzített aktivitás értékek alapján) 22,5 % volt, amíg az általánosan alkalmazott hordozó:enzim arány mellett (10:1), 17,7 % értéknek adódott. Az adszorpciós rögzítés számára kedvező paraméterek a következők voltak: 0,1 M töménységű nátrium-acetát puffer (pH 5,50), hordozó:enzim arány 10:1, 24 órás, 25 °C hőmérsékleten való rázatás (150 rpm) mellett.

#### ***4.2.2 A glutáraldehides kezelési eljárás vizsgálata***

Második lépésként annak a glutáraldehides kezelésnek a vizsgálatát végeztem el, amellyel az adszorpciósan rögzített enzimek kötődését stabilizáltam a hordozóhoz. A kezelési idő, kémhatás,



glutáraldehid koncentráció és a szubsztrát jelenlétének hatását vizsgáltam a rögzítés hatásfokára nézve. A kombinált rögzítési eljárással kialakítható kötődésre általánosan jellemző „aktivitás leoldódás” kinetika azt mutatta, hogy a rögzítést követő aktivitásmérési ciklusok során, kezdetben aktivitásnövekedés volt megfigyelhető, amely után az egymást követő ciklusokban az aktivitás értékek közel állandóak voltak és enzimleoldódás nem volt tapasztalható. Ez a növekedés feltehetően a glutáraldehiddel rögzített „enzimréteg” kedvező térszerkezeti módosulásának eredménye, amely minden bizonnyal a szubsztrát jelenlétének a következménye. A rögzítés hatásfokára sem a kezeléshez alkalmazott közeg kémhatása sem a szubsztrát jelenléte nem volt hatással. Az glutáraldehydes kezelés számára kedvező paraméterek a következők voltak: 0,1 M töménységű nátrium-acetát puffer (pH 5,50), 1 perces kezelési idő 25 °C hőmérsékleten, 0,25 % (m/V) glutáraldehyd koncentráció alkalmazása mellett. Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy a túl hosszú kezelési idő vagy a túl magas glutáraldehyd koncentráció nagymértékű csökkenést okozott az elérhető aktivitásokban, amíg a túl alacsony glutáraldehyd koncentráció esetében, a kialakult gyenge kötőerők kapcsán, az adszorpciós kötődésre jellemző leoldódás volt megfigyelhető. Adott mennyiségű hordozó esetében itt is vizsgáltam, hogy a bevitt enzimmennyiség növelésével hogyan változik a rögzült aktivitás. Az elérhető maximális hozam 21,4 % volt, amíg az általánosan alkalmazott hordozó:enzim arány mellett (10:1), 5,4 % értéknek adódott. További kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy a rögzített enzimmennyiség alacsony pH értékkel rendelkező közegben (<5,50) való felhasználása esetén, nagymértékű enzimleoldódással kellett számolni. Ennek oka az enzim és a hordozó közötti elektrosztatikus viszonyok megváltozása lehetett, ami megkívánta a rögzített enzimmennyiség stabilitásának a növelését. A glutáraldehydes kezelési idő 30 percre való emelésével sikerült olyan megnövelt stabilitású rögzített enzimmennyiséget előállítanom, amely még pH 4,00 kémhatású közegben való felhasználás esetében is stabilnak volt tekinthető.

### **4.3 A megnövelt stabilitású rögzített enzimmennyiség jellemzése**

A jellemzés során a rögzített készítmény kinetikai állandóit, aktivitásának pH és hőmérséklet függését határoztam meg. Az elvégzett vizsgálatok alapján a rögzített készítmény  $V_{max}$  állandója 75,64  $\mu\text{mol perc}^{-1}$  száraz hordozó  $\text{g}^{-1}$ , a  $K_m$  állandója 5,03 mM értéknek adódott, amíg a rögzítés hozama mindössze 2,1 % volt az alkalmazott hordozó:enzim arány mellett (10:3). Az oldott enzim esetében a  $V_{max}$  és  $K_m$  állandók 19,61  $\mu\text{mol perc}^{-1}$  enzim  $\text{mg}^{-1}$  és 4,04 mM értékeknek adódtak. Jól szembevetendő, hogy a rögzítési eljárás főként az enzim katalitikus aktivitására volt hatással, amíg a szubsztrátkötő hely működését számottevően nem befolyásolta. Az adatok arra engednek következtetni, hogy a fehérje szerkezetében a rögzítési eljárás számottevő eltérést nem eredményezett, így a fajlagos katalitikus

aktivitásban tapasztalható nagymértékű csökkenés az enzim molekulák nem megfelelő térhelyzetben való adszorpciós rögzülésének, valamint az esetlegesen fennálló diffúziós gátlásoknak tulajdonítható.

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

A rögzített készítmény esetében a katalitikus aktivitás látszólagos hőmérséklet optimuma  $60\text{ }^\circ\text{C}$  értékre növekedett, a natív enzim esetében mért  $50\text{ }^\circ\text{C}$  értékről. Ez a növekedés feltehetőleg a hordozó porózus szerkezetének és a kialakított ionos és kovalens kötéseknek tulajdonítható, ugyanis a diffúziós hatások és a stabilabb konformáció védik az enzimet a hődenaturációval szemben.

#### **4.4 A megnövelt stabilitású rögzített enzimmészítmény élelmiszeripari felhasználhatóságának vizsgálatai**

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

A  $\beta$ -glükozidáz enzim legfontosabb felhasználási területe a cellulózból cellulázzal végrehajtott glükóz-előállítás, amely aztán különböző ipari folyamatokban szolgál alapanyagul. A vizsgálatokhoz létrehozott különböző kémhatással rendelkező modelloldatokban a hozam  $100\%$  értékűnek tekinthető, ha a rendszerben jelen levő cellobióz teljes mértékben átalakításra került. A rögzített enzimmészítmény a pH 5,50 kémhatású közegben végzett bontási eljárás során hatékonyabbnak bizonyult az oldott enzimmél (mivel a reakció végének választott 70. órában magasabb hozamértékkel rendelkezett,  $74,2$  és  $59,9\%$ ), annak ellenére, hogy a rögzített enzimmészítmény pH 4,50 érték mellett rendelkezik maximális aktivitással. Mivel a reakció végén az oldott és a rögzített enzim maradék aktivitásában számottevő eltérés nem volt tapasztalható ( $69,9$  és  $73,6\%$ ), ez a tény arra enged következtetni, hogy a cellobióz szubsztráton a rögzített enzimmészítmény hatékonyabban alkalmazható, mint a mesterséges pNPG szubsztráton. A pH 4,00 kémhatáson végzett bontási folyamat végén az oldott és a rögzített enzim hozamértékeiben ( $44,4$  és  $71,5\%$ ) tapasztalható eltérés jelentősebb volt. Ennek háttérében a rögzített enzim cellobióz szubsztráton való nagyobb hatékonyságán túl, a rögzített enzim alacsonyabb pH optimuma (pH 4,50) és a reakció végén mérhető magasabb megőrzött aktivitása ( $48,5$  és  $67,5\%$ ) állhatott. A rögzített készítmény tehát az oldott enzim esetében optimálisnak tekinthető pH 5,50 érték alatt is megfelelően magas aktivitással rendelkezik, és a rögzítési eljárásnak köszönhetően az alacsony pH okozta inaktíváló hatásnak is jobban ellenáll.

#### **4.4.2 Felhasználhatósági vizsgálat borászati körülmények között**

Mivel a borokban az aromaanyagok túlnyomó többsége alkoholos hidroxilcsoportot tartalmaz, de nagyrészt nem illékony formában, hanem túlnyomó többségében  $\beta$ -glükózidos kötésben, ezért a  $\beta$ -glükózidáz hidrolitikus aktivitásának az aromaanyagok felszabadítása szempontjából döntő a jelentősége. Első lépésben meghatároztam, hogy a borokban jellemző savas pH érték és etanoltartalom milyen hatást gyakorol az oldott és a rögzített enzim katalitikus aktivitására. Az oldott enzim esetében mind a közeg kémhatása (pH 4,00), mind pedig a 10 % (V/V) etanoltartalom jelentős mértékű aktivitásvesztést eredményezett (43 és 55 % maradék aktivitás). Elmondható az is, hogy a kémhatás és az etanoltartalom additív módon fejtették ki az inaktíváló hatásukat az aktivitásra. A modell oldatnak tekinthető [pH 4,00 és 10 % (V/V)] elegyhez képest, az alkalmazott bormintában további jelentős inaktíválódás volt megfigyelhető (5 % maradék aktivitás). A rögzített enzimműködés esetében mind a savasabb kémhatás, mind pedig az etanoltartalom kisebb inaktíváló hatással bírt (82 és 75 % maradék aktivitás), mint az oldott enzim esetében. Ezen felül, a savas kémhatás kevésbé volt hatással a katalitikus aktivitásra, mint az etanoltartalom, amelynek oka a már korábban bemutatott pH optimum savas irányba való eltolódása. A bormintában itt is további inaktíválódás volt megfigyelhető (26 % maradék aktivitás), amelynek mértéke azonban messze elmaradt az oldott enzim vizsgálata során megfigyelt értéktől. Második lépésben a rögzített készítmény működési stabilitását vizsgáltam, amely során azt tapasztaltam, hogy a modell oldatban [pH 4,00 és 10 % (V/V)] a rögzített enzimműködés az első órában mért aktivitásának 66 % értékét őrizte meg a 8. órára, amíg a bormintában ez az érték 40 % volt. A bemutatott eredmények alapján tehát kijelenthető, hogy az előállított rögzített enzimműködés borászati körülmények között való felhasználása előnyösebb lehet, mint az oldott enzim alkalmazása.

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

A reverz hidrolitikus folyamat hatékonyságára a rendszerben szabadon levő glükóz mennyiségének csökkenése alapján következtettem, így a folyamat hozama 100 % értékűnek tekinthető, ha a rendszerben szabad glükóz nem mérhető (mivel azok *O*-glükózid formában vannak jelen). Azt találtam, hogy a rögzített enzimműködés azonnali inaktíválódása minden közegben kisebb mértékű volt, mint az oldott enzimműködés. A rögzítési eljárás 28-42 % értékkel képes volt növelni az enzim megőrzött aktivitását, továbbá elmondható, hogy a különböző közegek inaktíváló hatásai között mutatkozó eltérések sokkal kevésbé érvényesültek, és az enzim rögzített formában az aktivitásának jóval nagyobb részét őrizte meg a reakció végének tekintett 3. napra. Azonos bevitt aktivitásértékek mellett, az oldott enzim esetében a 3 napos reakció végén mérhető hozamok 31-49 %, amíg a rögzített

enzimnél 58-77 % között változtak közegtől függően. A rögzített enzim esetében tapasztalt magasabb hozamértékeknek több oka is lehetett: a nagyobb stabilitás és ezáltal a magasabb megőrzött aktivitás a reakció során, valamint a hordozó enyhe hidrofób tulajdonsága miatt hatékonyabban működhetett ebben a heterogén, alapvetően apoláris jellegű reakcióközegben. Kijelenthető, hogy az előállított enzimkészítmény hatékonyabban volt alkalmazható reverz hidrolitikus reakciókban, mint a natív enzim.

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

Sok esetben az élelmiszeripari technológiák megkívánják a  $\beta$ -glükán degradációját, amelynek legáltalánosabb és legelterjedtebb módja az enzimes hidrolízis. Ezentúl a  $\beta$ -glükán teljes hidrolízise olyan élelmiszeripari területek felé is utat nyithat, amelyek a glükózból való etanol előállításával foglalkoznak. Az árpafélék a  $\beta$ -glükán elsődleges forrásának tekinthetők. A glükánáz katalizált árpa  $\beta$ -glükán lebontási folyamat legfőbb végtermékei tri- és tetraszacharid egységek (általában a keletkezett végtermékek 90 % arányban tartalmazzák ezeket), névlegesen a 3-O- $\beta$ -cellobiozil-D-glükopiranóz (G4G3G) és a 3-O- $\beta$ -cellotriozil-D-glükopiranóz (G4G4G3G). A  $\beta$ -glükán lebontás utolsó lépéseként az előbb bemutatott oligoszacharidok lebontására kerül sor, amelyet a  $\beta$ -glükozidáz és egyéb  $\beta$ -glükán exo-hidroláz enzimek katalizálnak. A  $\beta$ -glükozidáz enzim a nem redukáló láncvégről képes glükóz molekulákat lehasítani. Korábban már folytak kutatások, amelyek során a  $\beta$ -glükozidáz enzim kinetikai paramétereit határozták meg árpából előállított  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid szubsztrátokon. Ezekben a kísérletekben a kinetikai paramétereket hagyományos biokémiai módszerekkel, a felszabaduló glükóz vagy redukáló láncvégek mennyisége alapján határozták meg. Azonban meg kell jegyezni, hogy a felszabaduló glükóz vagy redukáló láncvégek mennyiségének nyomon követésével nem minden esetben kapunk pontos képet a szubsztrát mennyiségének alakulásáról a reakció során. Ez egyes kinetikai paraméterek meghatározása során hibákhoz vezethet, továbbá ez az eljárás nem alkalmazható olyan rendszerekben ahol egyszerre több  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid szubsztrát van jelen (pl. glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán). Erre a problémára jelentett megoldást a reakciók műszeres analitikai (HPAEC-PAD) nyomonkövetése. Ezért kidolgoztam egy olyan új folyadékkromatográfiás mérési módszert, ahol belső standardot (melibióz) alkalmaztam, amivel korrigálni tudtam a detektor válaszjeleinek a mérések során fellépő eltéréseit, valamint a mennyiségi meghatározáshoz a kereskedelemben nem rég hozzáférhető árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid standardokat használtam. A kidolgozott mérési módszerrel elsőként végeztem részletes vizsgálatokat a  $\beta$ -glükozidáz enzim (mind a natív mind pedig az általam előállított rögzített készítménnyel) működésén és kinetikai paramétereinek a meghatározásán glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztrátokon. Az előzetes

feltételezésemmel megegyezően, a kinetikai paraméterekben eltérések voltak tapasztalhatók attól függően, hogy a rendszerben jelen levő szubsztrát vagy pedig a felszabaduló végtermék alapján kerültek meghatározásra. Ezen eltérések mértéke a vizsgált szubsztráttól függően változott. A G3G szubsztráton, ahol csak egy  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) kötés került hidrolizálásra, számottevő eltérés nem volt tapasztalható a kinetikai paraméterekben. A G4G3G szubsztrát esetében a reakció elején felszabaduló és a nagymértékben felhalmozódó G3G jelentősen képes befolyásolni (csökkenteni) a felszabaduló végtermék (glükóz) mennyiségét az idő függvényében, így a kinetikai paraméterekben is jelentős eltérések voltak tapasztalhatók, amikor az irodalomban is alkalmazott módszer szerint a felszabaduló glükóz mennyisége alapján kerültek meghatározásra. Mind a  $K_{cat}$ , mind pedig a  $K_m$  érték közel a fele volt a szubsztrát mennyisége alapján meghatározott értékekhez képest. A G4G4G3G lebontása során kis mennyiségben G4G3G és G3G is felszabadul, amely aztán közel állandó koncentrációban van jelen. Ez a jelenség szintén képes befolyásolni a felszabaduló glükóz mennyiségét és ezáltal a kinetikai paraméterek értékeit, azonban az eltérés lényegesen alacsonyabb, mint a G4G3G esetében. A  $K_{cat}$  értékében mindössze 20 % csökkenés volt megfigyelhető a szubsztráton meghatározott paraméterhez képest, amíg a  $K_m$  értékek közel azonosak voltak. A kidolgozott HPAEC-PAD mérési módszerrel továbbá elsőként követtem nyomon és jellemeztem a  $\beta$ -glükozidáz enzim működését glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztráton. A vizsgálatokat a rögzített enzimkészítménnyel is elvégeztem és azt tapasztaltam, hogy a rögzítési eljárás az enzim katalitikus aktivitásában okozott nagyobb mértékű csökkenést (a korábban ismertett okok miatt), azonban a  $K_m$  értékeiben és ezekben a rendszerekben megfigyelhető alapvető működésében és tulajdonságaiban nem.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

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

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

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

**5. A natív és a rögzített enzimmészítmények működésének vizsgálata és kinetikai paramétereinek meghatározása árpa  $\beta$ -glükán szubsztrátokon.** A kidolgozott új HPAEC-PAD mérési módszernek köszönhetően elsőként végeztem részletes vizsgálatokat a  $\beta$ -glükózidáz enzim (mind a natív mind pedig az általam előállított rögzített készítménnyel) működésén és kinetikai paramétereinek a meghatározásán glükánáz által hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztrátokon. Ennek során tanulmányoztam az enzimmészítmények működését a tiszta árpa  $\beta$ -glükán di- és oligoszacharid, továbbá glükánáz által

hidrolizált árpa  $\beta$ -glükán szubsztráton is, valamint meghatároztam az enzimek készítmények kinetikai paramétereit ezekben a rendszerekben. Ennek során jutottam arra a következtetésre is, hogy ilyen típusú szubsztrátok esetén a kinetikai állandók meghatározására általánosan alkalmazott módszer, miszerint a paramétereket a felszabaduló végtermék alapján állapítják meg, hibához vezethet ezért mindenképpen szükséges a szubsztrát mennyisége alapján történő meghatározás [RADVA et al., 2012].

## 6. KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

### **Impakt faktoros folyóiratcikkek**

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

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

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

### **Magyarnyelvű összefoglaló**

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

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

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

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