



ASPERGILLUS CARBONARIUS-BÓL IZOLÁLT EXTRACELLULÁRIS β -D-XILOZIDÁZ
MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

doktori (Ph.D) értekezés

Kiss Tünde

Debreceni Egyetem, TTK
Biokémiai Tanszék
Debrecen, 2002

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Kémia doktori program K/5 alprogramja keretében készítettem 1995-2002 között és ezúton benyújtom a Debreceni Egyetem TTK doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2002. április 4.

Kiss Tünde

Tanúsítom, hogy Kiss Tünde doktorjelölt 1995-2002 között a fent megnevezett doktori program K/5 alprogramja keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2002. április 4.

Dr. Kiss László
témavezető

Kiss Tünde doktorjelölt és **Dr. Kiss László** témavezető egybehangzóan kijelentjük és aláírásunkkal igazoljuk, hogy az „*Aspergillus carbonarius*-ból izolált extracelluláris β -D-xilozidáz működési mechanizmusának vizsgálata” című doktori értekezésben leírt és a tézisekben összefoglalt tudományos eredmények nem képezték és nem képezik más doktori (Ph. D.) disszertáció részét.

Debrecen, 2002. április 4.

.....

témavezető

.....

doktorjelölt

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm témavezetőnek, Dr. Kiss Lászlónak, hogy lehetővé tette számomra az enzimológiai kutatásokba való bekapcsolódást, munkámat figyelemmel kísérte és hasznos tanácsaival mindvégig segítette.

Külön köszönetemet fejezem ki Dr. Nánási Pál professzor úrnak, aki annak idején a Biokémiai Tanszékre hívott és megszeretette velem a kutatómunkát.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Lipták András professzor úrnak, aki 1995-ben tanszékvezetőként lehetővé tette, később pedig támogatta értekezésem elkészítését.

Külön köszönetem legközvetlenebb munkatársaimnak, Jäger Szilviának és Kertiné Somosi Ritának a munkámban nyújtott segítségükért és a közvetlen, baráti hangulatú munkahelyi légkör megteremtéséért.

Hálás köszönetem Dr. Forgács Katalinnak és Dr. Emri Tamásnak, valamint Nagy Zoltánnak, akik segítséget nyújtottak a mikrobiológiai munkában és akik segítsége, hasznos tanácsai és biztató szavai nélkül ezen értekezés nem készülhetett volna el.

Hálával tartozom Dr. Kerékgyártó Jánosnak, Dr. Szurmai Zoltánnak és Dr. Bajza Istvánnak mint azon legfontosabb embereknek, akik a szintetikus munkában nyújtottak segítséget és értékes tanácsokkal láttak el.

Köszönöm Dr. Gyémánt Gyöngyinek a HPLC-s és MALDI-s vizsgálatok során nyújtott segítségét és jó ötleteit.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Lenkey Bélának, aki biztosította számomra a vizsgálatainkhoz szükséges *Aspergillus* fajokat.

Köszönöm Dr. Somsák Lászlónak az inhibíciós vizsgálatokhoz rendelkezésemre bocsátott vegyületeket és hasznos szakmai tanácsait.

Köszönetet mondok a DE TTK Biokémiai Tanszéke tagjainak, valamint mindazoknak, akik bármilyen módon segítséget nyújtottak értekezésem elkészítéséhez.

S végül hálásan köszönöm szüleimnek, bátyámnak és felülmúlhatatlan Kedvesemnek, Zsoltnak, támogatásukat, türelmüket és szeretetüket, amelyre munkám során mindvégig számíthattam.

Édesanyámnak, aki megtanított rá, hogy „csodák pedig vannak...”,
És mindazon barátaimnak és szeretteimnek, akik meggyőztek erről.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. A xilánok szerkezete és előfordulása	3
2.2. A xilánbontó enzimrendszer tagjai	4
a) β -1,4-Endoxilanázok	6
b) β -D-Xilozidázok	7
c) α -L-Arabinofuranozidázok	7
d) α -D-Glükuronidázok	7
e) Acetilxilán észterázok	8
f) Ferulasav és p-kumársav észterázok	8
2.3 β -D-Xilozidázok	9
2.3.1. Általános jellemzésük	9
2.3.2. A β -xilozidázok működési mechanizmusa	11
3. SAJÁT VIZSGÁLATOK	24
3.1. β -D-Xilozidáz izolálása	25
3.2. <i>A. carbonarius</i> -ből izolált β -D-xilozidáz tisztítása	27
3.3. <i>A. carbonarius</i> β -D-xilozidázának biokémiai jellemzése	35
3.4. Enzimkinetikai vizsgálatok	37
3.4.1. Kinetikai paraméterek meghatározása	37
3.4.2. Kevert szubsztrátos vizsgálatok	38
3.5. Kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata	39
3.6. Karboxil oldalláncok kémiai módosítása	42
3.7. N-brómacetil- β -D-xilopiranozilamin mint potenciális affinitás jelölő	49
3.7.1. Szintézis	49
3.7.2. Inaktivációs vizsgálatok	51
3.8. Inhibíciós vizsgálatok	53
3.9. β -D-Xilozidáz transzferáz aktivitásának vizsgálata	57
4. KÍSÉRLETI RÉSZ	64
4.1. Mikroorganizmusok	64
4.2. Tenyésztés körülményei, enzimizolálás	64
4.3. Enzimaktivitás mérések	64

4.3.1. <i>β-D-Xilozidáz aktivitás meghatározása</i>	64
4.3.2. <i>β-D-Glükózidáz, β-D-galaktozidáz és α-L-arabinozidáz aktivitások meghatározása</i>	65
4.4. Fehérjetartalom meghatározás	65
4.5. Enzimmtisztítás	65
4.6. Molekulatömeg meghatározás	66
4.6.1. <i>SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)</i>	66
4.6.2. <i>MALDI TOF MS módszer</i>	67
4.7. pH- és hőmérséklet hatás vizsgálatok	67
4.7.1 <i>pH optimum és stabilitás meghatározás</i>	67
4.7.2. <i>Hőmérséklet optimum és stabilitás meghatározás</i>	67
4.8. Enzimkinetikai vizsgálatok	67
4.8.1. <i>Kinetikai paraméterek meghatározása</i>	67
4.8.2. <i>Kevert szubsztrátos kísérletek</i>	68
4.8.3. <i>Inhibíciós vizsgálatok</i>	68
4.9. Kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata	68
4.10. Karboxil oldalláncok specifikus kémiai módosítása	68
4.11. Inaktivációs vizsgálatok NBAXA-val	70
4.12. Szintetikus módszerek	70
4.12.1. <i>Általános módszerek</i>	70
4.12.2. <i>NBAXA szintézise</i>	70
4.13. β -D-Xilozidáz transzferáz aktivitásának vizsgálata	72
5. ÖSSZEFOGLALÁS	74
6. SUMMARY	77
7. IRODALOMJEGYZÉK	81
8. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	93

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

absz.	abszolút
Ac	acetyl
Asp	aszparaginsav
BSA	marha szérum albumin
d	dublett
δ	kémiai eltolódás
DEP	dietil-pirokarbonát
DKM	diklórmétán
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DP	polimerizációfok
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
EI komplex	enzim-inhibitor komplex
ES komplex	enzim-szubsztrát komplex
ESI MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
Glu	glutaminsav
HIC	hidrofób kölcsönhatás kromatográfia
His	hisztidin
J	csatolási állandó
MALDI TOF MS	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight tömegspektrometria
Me	metil
MeOH	metanol
NaOMe	nátrium-metilát
NBAXA	N-brómacetyl- β -D-xilopiranozilamin
o.p.	olvadáspont
PAPTG	<i>p</i> -aminofenil 1-tio- β -D-galaktopiranozid
PAPTXyl	<i>p</i> -aminofenil 1-tio- β -D-xilopiranozid
pI	izoelektromos pont
PMSF	fenil-metil-szulfonil fluorid
<i>p</i> NP-Ara	<i>p</i> -nitrofenil- α -L-arabinopiranozid
<i>p</i> NP-Gal	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
<i>p</i> NP-Glc	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glükopiranozid
<i>p</i> NP-Xyl	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-xilopiranozid
py	piridin
RID	refraktív index detektor
s	szingulett
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
TFA	trifluor-ecetsav
VRK	vékonyréteg kromatográfia
WRK	Woodward K reagens (N-etil-5-fenilizoxazolium-3'-szulfonát)
XylN ₃	β -D-xilopiranozil azid

1. BEVEZETÉS

A glikozid hidrolázok (glikozidázok) az enzimek egyik igen nagy változatosságot mutató, jelentékeny csoportját képviselik, amelyek iránt az elmúlt évtizedekben több tudományágban is intenzív érdeklődés mutatkozott. Ez részint az élő szervezetek fiziológiai folyamataiban betöltött jelentős szerepüknek, részint az ebből adódó nagy mértékű ipari alkalmazhatóságuknak köszönhető. A táplálékkal felvett, ill. a sejtekben raktározott poliszacharidok lebontása mellett meghatározó szerepük van a glikolipidek és glikoproteinek oligoszacharid oldalláncainak metabolizmusában is, amely központi jelentőségű a sejtek közötti komplex kommunikációs folyamatok, valamint a membránfehérjék és extracelluláris proteinek transzportjának irányításában. Így ezen enzimek hiánya súlyos következményekkel járhat az élő szervezetek számára. Ugyanakkor, a glikozidáz enzimek működését gátló vegyületek sok esetben hasznos terápiás szerekké váltak kóros folyamatok, mint pl. diabétesz vagy vírusfertőzések megfékezésében. A glikozidáz „kit”-ek ezáltal az orvosi diagnosztika fontos elemeit képezik. Emellett számos széles specifitású glikozidázt bonyolult oligoszacharidok szerkezetének felderítésében hasznosítanak.

A növények és gombák növekedéséhez a rigid, poliszacharid típusú sejtfaletkezésének és lebomlásának állandó dinamikus egyensúlyára van szükség, ami elképzelhetetlen glikozidázok közreműködése nélkül. Ebből a szempontból az egyik legfontosabb csoportjukat az ún. xilanolitikus enzimrendszerek képezik, amelyek a sejtfalet jelentős részét képező xilánok lebontásában vesznek részt. A xilánok a természetben betöltött fontos szerepük mellett számottevő ipari jelentőséggel is bírnak. Az évenként hatalmas tömegekben képződő mezőgazdasági és erdészeti hulladékok jelentős részét képező xilánok, mint megújítható erőforrások, mind a tüzelőanyag, mind a különböző kémiai alapanyagok (pl. furfuralok vagy az alacsony kalóriatartalmú, mesterséges édesítőszerként felhasznált xilitolok) előállításának fontos bázisát adják. A xilánok ilyen jellegű újrahasznosítása ugyancsak elképzelhetetlen xilánbontó enzimrendszerek nélkül. A xilanolitikus enzimeket számos területen pl. textil- és élelmiszeriparban, mezőgazdaságban, újabban gyógyszeriparban is felhasználják. Kutatásuk utóbbi időben tapasztalt fellendüléséhez azonban legnagyobb mértékben a papíripari felhasználásukra irányuló, egyre fokozódó igény járult hozzá. A papírgyártás során a faanyag feldolgozásakor képződő papírpép fehéritésére van szükség, amely lényegében a lignin papírpépből történő eltávolítását jelenti. Ezt hagyományos úton toxikus vegyszerek pl. klór és hipoklorit felhasználásával végzik, napjainkban azonban egyre elterjedtebben alkalmaznak enzimatisztikus úton történő környezetbarát eljárást. Ennek során a

xilán enzimatisz hidrolízise elősegíti a lignin felszabadulását, amely eljárás kettős előnnyel bír: (1) ez által lényegesen csökkenthető a folyamathoz szükséges vegyszerek mennyisége (pl. a felhasználandó klór mennyiségének 20-30%-os csökkentése érhető el), amely jelentős gazdasági haszonnal jár, valamint (2) ily módon a toxikus anyagok (pl. dioxin) képződése is elkerülhető, amely környezetvédelmi szempontból fontos. A papírpép fehérítéséhez elsősorban endoxilanázokat alkalmaznak. Az utóbbi évtizedben azonban egyre nagyobb mértékű érdeklődés mutatkozik a xilanázok hatékony működését elősegítő β -xilozidázok iránt is. Ez utóbbi enzimekre vonatkozó ismereteink azonban igen korlátozottak.

A Debreceni Egyetem TTK Biokémiai Tanszékén folyó enzimés kutatások egyik legjelentősebb témája a különböző eredetű ill. szubsztrátspecifitású glikozidázok (pl. β -glükózidázok, hexózaminidázok) vizsgálata. 1995-ben ebbe a kutatási irányba bekapcsolódva egy újabb glikozidáz csoport, a mikrobiális β -D-xilozidázok tanulmányozását kaptam feladatul. Értekezésem az ezen a téren nyert eredmények összefoglalása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A XILÁNOK SZERKEZETE ÉS ELŐFORDULÁSA

A biotomassza száraz tömegét átlagosan 40% cellulóz, 33% hemicellulóz és 23% lignin képezi (Coughlan és Hazlewood 1993a). A hemicellulózok legjelentősebb részét a xilánok teszik ki, amelyek nagy heterogenitást mutató, komplex vegyületek. A xilánok igen fontos szerepet játszanak a növényi sejtfal kialakításában azáltal, hogy a sejtfal alapállományát, mátrixát képezik. Ebbe a mátrixba ágyazódik be a sejtfal cellulózból felépülő váza. Ezenkívül csírázó magvak, tápláló szövetek sejtfalában tartalék tápanyagként is igen jelentősek (Dekker és Richards 1976). A xilánok döntő többségében az alapvázat β -1,4 glikozidos kötéssel kapcsolódó xilopiranoz egységek építik fel (Stephen 1983). Egyes tengeri algák (pl. *Halimeda cuneata*, *Cauperpa brachypus*) β -1,3-kötésű xilánokat tartalmaznak (Dekker és Richards 1976), míg más fajokban (pl. *Rhodymenia palmata*-ban) β -1,3- és β -1,4-kötések egyaránt megjelennek az alapláncon belül (rhodymenan) (Barry és Dillon 1940, Dekker és Richards 1976). A szárazföldi növények sejtfalát felépítő xilánok alapváza azonban minden esetben β -1,4-kötést tartalmaz.

A xilánokat alkotóegységeik alapján 2 csoportra bonthatjuk: homo- és heteroxilánokra.

I. A *homoxilánok* csak xilozil csoportokat tartalmaznak. Ez a típus csak igen ritkán jelenik meg a természetben, eddig árvalányhajból (*Stipa tenacissima*, L.) (Chanda és munkatársai 1950) és dohány (*Nicotiana tabacum*) szárából (Eda és munkatársai 1976) izolálták.

II. A xilánok legnagyobb része *heteropoliszacharid* formájában fordul elő. Ezek xilopiranoz egységekből felépülő alapvázához különböző szubsztituensek – leggyakrabban acetyl, arabinozil és glükuronopiranozil csoportok – kapcsolódnak (Biely 1985; Whistler és Richards 1970), amelyek további szubsztituenseket hordozhatnak. A heteroxilánok struktúrája eredetüktől függően is változik:

II. A) A *zárvatermők* (*Gymnospermae*) xilánja *O*-acetyl-4-*O*-metilglükuronoxilán. Ez a poliszacharid többnyire 150-200 β -D-xilopiranoz egységből épül fel. Kb. minden tizedik xilopiranoz molekulához C-2 helyzetben 1,2-kötéssel 4-*O*-metil- α -D-glükuronsav kapcsolódik (Woodward 1984). C-2 ill. C-3 helyzetben emellett igen nagy gyakorisággal (70%-ban) acetyl csoportok fordulnak elő (Poutanen és munkatársai 1990). Ezen acetyl csoportok jelenlétének köszönhető, hogy a xilánok kis mértékben vízben oldódnak (Whistler és Richards 1970). A zárvatermők xilánja kis mennyiségben ramnózt és galakturonsavat is tartalmazhat (Johansson és Samuelson 1977).

II. B) A *nyitvatermőkben* (*Angiospermae*) arabino-4-*O*-metilglükuronoxilán fordul elő. Ez rövidebb és kevésbé elágazó, mint a zárvatermők xilánja, polimerizációjának foka (DP) 70 és 130 közötti (Sunna és Antranikian 1997). Vázához lényegesen több 4-*O*-metil- α -D-glükuronsav kapcsolódik C-2 helyzetben, mint a zárvatermőkében. A nyitvatermők xilánja nem tartalmaz acetilcsoportokat, helyette C-3 helyzetben L-arabinofuranóz egységek kötődnek a xilopiranoz molekulákhoz α -1,3-glikozidos kötéssel (Puls és Schuseil 1993). Ez a típusú xilánváz 100:20:13 arányban tartalmazza a β -D-xilopiranoz, 4-*O*-metil- α -D-glükuronsav és L-arabinofuranóz egységeket (Puls és Schuseil 1993).

II. C) Külön csoportot alkot a *pázsitfűfélékben* (*Gramineae*) előforduló xilán: ez szintén arabino-4-*O*-metilglükuronoxilán, melyben a polimerizáció foka 70. A többi zárvatermő xilánjától eltérően azonban kevesebb 1,2-kötésű 4-*O*-metil- α -D-glükuronsav egységet tartalmaz, viszont nagy mennyiségű L-arabinofuranozil oldalláncot hordoz, amelyek C-2 vagy/és C-3 helyzetben kapcsolódnak a xilánvázhoz (Coughlan és Hazlewood 1993a). Ugyanilyen helyzetben, 2-5%-ban, acetilcsoportok is előfordulhatnak (Bacon és munkatársai 1975). Ráadásul az arabinozil oldalláncok maguk is szubsztituáltak lehetnek C-5 helyzetben ferulasav (~6%) vagy *p*-kumársav révén (3%) (Mueller-Harvey és munkatársai 1986). Érdemes megemlíteni, hogy ezen ferulasav szubsztituenseknek köszönhetően *in vivo* a xilán láncok között, ill. xilán és lignin molekulák között kovalens keresztkötések bonyolult hálózata alakulhat ki (Scalbert és munkatársai 1985; Stephen 1983). A pázsitfűfélék arabinoxilánjában a különböző komponensek relatív eloszlása erősen fajfüggő, sőt ugyanazon fajon belül szövetről szövetre is változik (Puls és Schuseil 1993).

2.2. A XILÁNBONTÓ ENZIMRENDSZER TAGJAI

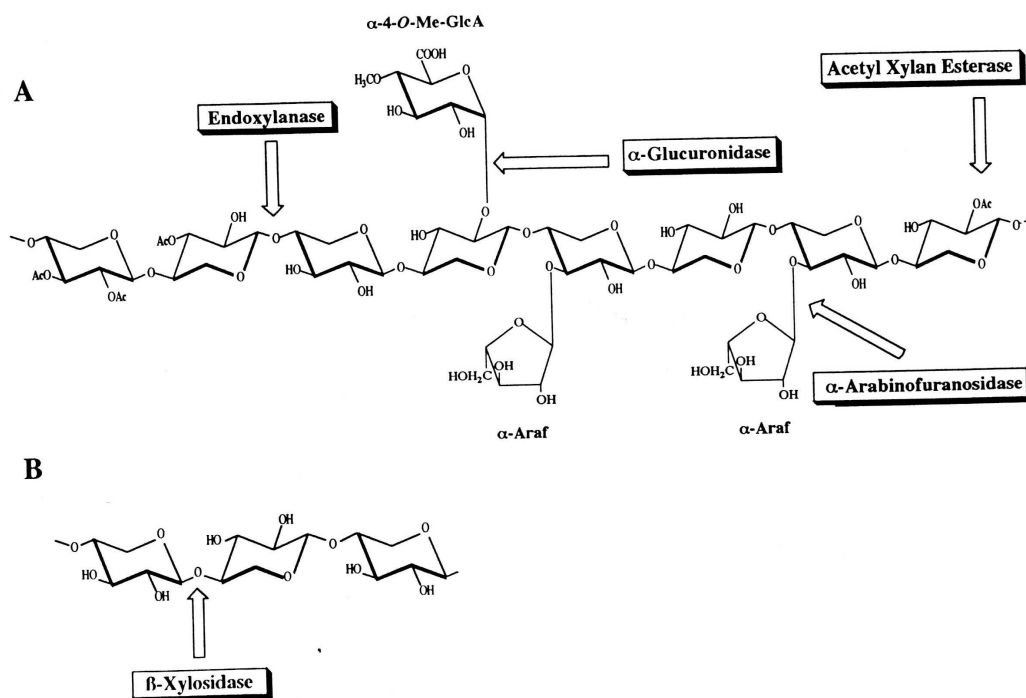
Mint a fentiekből is kitűnik, a különféle forrásokból származó xilánok jelentős variabilitást mutatnak mind összetételüket, mind szerkezetüket illetően, így nem meglepő, hogy teljes mértékű hidrolízisükhöz egy komplex mikrobiális enzimrendszer hatékony működésére van szükség. Ezek az ún. xilánbontó vagy xilanolitikus enzimrendszerek, amelyek igen elterjedtek mind a baktériumok, mind a gombák körében (Woodward 1984; Coughlan és Hazlewood 1993a; Sunna és Antranikian 1997).

A xilanolitikus enzimrendszerek legfontosabb képviselői a β -1,4-*endoxilanázok* (EC 3.2.1.8), amelyek a xilán alapvázát hidrolizálják kisebb xilo-oligoszacharidokra, és a β -D-*xilozidázok* (EC 3.2.1.37), amelyek az így létrejövő xilo-oligoszacharid és xilobióz molekulák nem-redukáló végéről xilózt hasítanak le (Coughlan és Hazlewood 1993a; Sunna és

Antranikian 1997). Ezen enzimek működésük során a szubsztituátlan xilán régiókat részesítik előnyben, mivel az enzim-szubsztrát (ES) komplex kialakulása az oldalláncok jelenléte miatt gyakran sztérikusan gátolt (Kormelink és munkatársai 1993). Így igen fontos, kiegészítő szerepet játszanak az oldalláncokat hasító enzimek is:

- az α -L-arabinofuranozidázok,
- az α -D-glükuronidázok,
- az acetilxilán észterázok, valamint
- a ferulasav és *p*-kumársav észterázok.

Ezeknek a szinergisztikusan ható enzimeknek az együttes jelenléte sokkal hatékonyabb hidrolízist eredményez, mintha hatásukat külön-külön egyszerűen összegeznénk (1. ábra).



1. ábra

(Sunna és Antranikian nyomán, 1997)

- A) Xilanolitikus enzimek részvétele a xilán lebontásában
- B) Xilo-oligoszacharid β -D-xilozidázzal történő hidrolízise

a) β -1,4-Endoxilanázok

Ipari jelentőségükénél fogva az elmúlt évtizedekben igen nagy érdeklődés mutatkozott az endoxilanázok iránt és ebből kifolyólag számos összefoglaló cikk (Dekker és Richards 1976; Dekker 1985; Wong és munkatársai 1988; Vikarii és munkatársai 1994; Kulkarni és munkatársai 1999) és könyv (Ericksson és munkatársai 1990; Visser és munkatársai 1992; Coughlan és Hazlewood 1993b) jelent meg mind bakteriális, mind fungális, mind növényi forrásokból izolált képviselőikről. A β -1,4-endoxilanázok (1,4- β -D-xilán xilohidroláz; EC 3.2.1.8) a xilán alaplánc belsejében lévő β -1,4-glikozidos kötéseket hasítják, csökkenő polimerizáció fokú xilo-oligomereket eredményezve. Egyes endoxilanázok az arabinoxilán hidrolízisekor arabinózt is képesek felszabadítani az α -1,3-glikozidos kötések hasítása révén (Takenishi és Tsujisaka 1975, Wood és McCrae 1986). Ez alapján az endoxilanázok arabinózt felszabadító („debranching”) és arabinózt fel nem szabadító („nondebranching”) csoportokra bonthatók (Dekker és Richards 1976, Kulkarni és munkatársai 1999). Bizonyos organizmusok mindkét típust képesek termelni, így növelve a xilán hidrolízisének hatékonyságát (Wong és munkatársai 1988).

Az endoxilanázok molekulatömege többnyire 11 és 85 kDa közé esik, izoelektromos pontjuk (pI) pedig 3,6 és 10,3 között változik (Coughlan és Hazlewood 1993a; Sunna és Antranikian 1997). Wong és munkatársai érdekes összefüggésre hívták fel a figyelmet, miszerint az endoxilanázok többségénél bázikus pI-hoz alacsony (30 kDa alatti) molekulatömeg társul, míg savas jellegű képviselőik magas (30 kDa feletti) molekulatömegűek (Wong és munkatársai 1988). Természetesen vannak kivételek (Matte és Forsberg 1992, Filho és munkatársai 1993), az endoxilanázok kb. 70 %-ánál azonban valóban érvényes a fenti megállapítás.

Az endoxilanázok általában a szubsztituálatlan xilán régióknál fejtik ki hatásukat. Az esetek többségénél ezt azzal magyarázzák, hogy a kapcsolódó szubsztituens sztérikus gátat jelent az ES komplex kialakulásánál. Ezt az állítást igazolja, hogy megfelelő segédenzim jelenlétében az endoxilanázok számára újabb, potenciális szubsztrátok képződnek. Bizonyos esetekben azonban, éppen adott szubsztituensek jelenléte szükséges az endoxilanázok működéséhez, pl. *Bacillus subtilis*-ből izolált xilanáz csak glükuronsav oldallánc mellett képes a xilán vázát hidrolizálni (Nishitani és Nevins 1991). Ezeknél az eseteknél feltételezik, hogy az adott oldallánc képes a xilanázok aktív centrumába illeszkedni, s ez orientálja a katalitikus csoportokhoz a főlánc megfelelő kötését.

b) β -D-Xilozidázok

Mivel ezen enzimescsoport képezi dolgozatomban vizsgálati tárgyát, így ezekre egy külön fejezetben (2.3. fejezet) térek ki részletesebben.

c) α -L-Arabinofuranozidázok

Mint ahogy a xilánok jelentős része arabinoxilán, így az oldalánccokat hasító enzimek között talán a legnagyobb jelentőséggel rendelkeznek. Legtöbb képviselőjük monomer formában fordul elő, de dimer, tetra-, hexa-, sőt oktamer változataik is ismeretesek (Sunna és Antranikian 1997). Ez utóbbiak a 495 kDa molekulatömeget is elérhetik (Komae és munkatársai 1982). Izoelektomos pontjuk 2,5 és 9,3 között változhat, de többségükben savas jellegű fehérjék (Sunna és Antranikian 1997). Általában mind az 1,3-, mind az 1,5- α -L-arabinofuranozil kötéseket képesek hidrolizálni. *Aspergillus niger*-ből izolált enzim esetében megállapították, hogy először az 1,3-kötésű oldallánccokat hasítja, és csak később, lassabban az 1,5-kötésűeket (Kaji és Tagawa 1970). Természetes szubsztrátjaik az arabinózzal szubsztituált xilo-oligoszacharidok, de ezek mellett polimerek ill. szintetikus *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranozidok (*p*NP-Araf) hidrolízisére is képesek. Szubsztrátspecifitásuk alapján 2 nagyobb csoportra bonthatók (Sunna és Antranikian 1997):

1. exo-típusú α -L-arabinofuranozidázokra (EC 3.2.1.55), amelyek elágazó arabinánokat és *p*NP-Araf-okat is hidrolizálnak; ide tartozik az arabinázok nagy többsége (Dekker és Richards 1976)
2. endo-1,5- α -L-arabinázokra (EC 3.2.1.99), amelyek csak lineáris arabinánokat képesek hasítani. Ilyen típusú enzimet izoláltak pl. *Bacillus subtilis*-ből (Kaji és Saheki 1975), *Trichoderma reesei*-ből (Kaneko és munkatársai 1993), *Aspergillus niger*-ből (Poutanen, K. 1988).

Érdemes azonban megemlíteni, hogy az arabinázok szubsztrátspecifitása ennél jóval összetettebb képet mutat, így a fent említett 2 típus számos további csoportra tagolható (Coughlan és Hazlewood 1993a).

d) α -D-Glükuronidázok

Az α -D-glükuronidázok a xilán váz xilóz egységei és a hozzájuk kapcsolódó glükuronsavak közötti α -1,2 kötést hidrolizálják. Ezen enzimescsoportról csak 1986-ban adtak hírt először (Puls és munkatársai 1986), így az ide vonatkozó ismeretek elég hiányosak. Az α -D-glükuronidázok szubsztrátspecifitása enzimforrásokként eltérő. *Agaricus bisporus*-ból izolált α -D-glükuronidáz csak alacsony molekulatömegű xilo-

oligomerekből (DP 2-6) képes 4-*O*-metil-glükuronsavat felszabadítani, de 4-*O*-metil-glükuronoxilánnal szemben inaktív (Puls és munkatársai 1987). Ugyanakkor az *Aspergillus niger*-ből és a *Schizophyllum commune*-ből izolált α -D-glükuronidáz a 4-*O*-metil-glükuronoxilánt is képes hidrolizálni (Johnson és munkatársai 1989).

e) Acetilxilán észterázok

Az acetilxilán észterázok (EC 3.1.1.6) az α -D-glükuronidázokhoz hasonlóan, nem túl régóta tanulmányozott enzimek, az első közlemény ugyancsak 1986-ban jelent meg róluk (Biely és munkatársai 1985). Kései felfedezésük leginkább a megfelelő szubsztrát hiányára vezethető vissza. A xilanolitikus enzimrendszer tanulmányozásához használt xilánokat ugyanis többnyire alkalikus extrakcióval nyerték, ami az egyébként nagymértékben acetilezett polimerek dezacetileződéséhez vezetett.

Legjobb szubsztrátjaik az acetilezett xilo-oligoszacharidok, de általában az acetilxilán vázból is képesek ecetsavat felszabadítani a C-2 ill. C-3 helyzetű *O*-acetil szubsztituenseinek eltávolítása révén (Biely és munkatársai 1988).

Az acetilxilán észterázok és az endoxilanázok közötti szinergizmusról már több közleményben is beszámoltak (Biely és munkatársai 1986, 1988, Poutanen és munkatársai 1990). Az acetilxilán észterázok az endoxilanázok számára sztérikus gátat jelentő acetilcsoportok eltávolítását végzik a xilánvázról, míg az endoxilanázok működése révén rövidebb láncú, s ezáltal kedvezőbb szubsztrátok képződnek az acetilxilán észterázok számára.

f) Ferulasav és *p*-kumársav észterázok

A pázsitfűfélék (*Gramineae*) arabinoxilánjának arabinozil oldalláncait igen gyakran ferulasav ill. *p*-kumársav *transz* izomerjei észtereszítik (Mueller-Harvey és munkatársai 1986). Ebben a kötött formában (elsősorban a ferulasav) a xilán láncok, ill. a xilán és lignin láncok közötti bonyolult hálózat kialakításáért felelősek, míg szabad formában a növényi növekedés szabályozásában játszanak fontos szerepet. (A ferulasav az indol-ecetsav (IES)-oxidáz inhibitora, míg a *p*-kumársav az IES-oxidáz aktivátora.) Ezeknek a másodlagos növényi hormonoknak is nevezett vegyületeknek a felszabadítását végzik a ferulasav ill. a *p*-kumársav észterázok. Ebben az esetben is viszonylag újonnan felfedezett enzimekről van szó (Mackenzie és munkatársai 1987), meglehetősen kevés információval. Eddig a legjobban néhány *Streptomyces* faj [*S. olivochromogenes* (Mackenzie és munkatársai 1987), *S. commune* (Mackenzie és Bilous 1988), *S. viridosporus* (Deobald és Crawford 1987, Donnelly és Crawford 1988)] és a *Neocallimastix* MC-2 törzs (Borneman és munkatársai 1991, 1992) fenolsav észterázait tanulmányozták.

2.3. β -D-XILOZIDÁZOK

2.3.1. Általános jellemzésük

A β -D-xilozidázok (β -D-xilozid xilohidrolázok, EC 3. 2. 1. 37) – mint azt már korábban említettem – exoglikozidázok, amelyek xilo-oligoszacharidok nem-redukáló végéről ill. xilobióból, az 1,4- β -D-glikozidos kötés hasításával, xilózt szabadítanak fel. Többségük szintetikus szubsztrátok bontására is képes; a leggyakrabban alkalmazott szintetikus kromogén szubsztrátjuk a *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranozid (*p*NP-Xyl) (Coughlan és Hazlewood 1993a). Egyes képviselőik az 1,3- β -D-, ill. az 1,4- α -D-glikozidos kötetést is képesek hidrolizálni, de ezek mind arányukat, mind jelentőségüket tekintve lényegesen háttérbe szorulnak a β -1,4-kötést hasító társaikhoz képest. Az előbbieket a Nemzetközi Enzimbizottság külön csoportba is sorolt (E.C. 3. 2. 1. 72), az 1,3-kötést is tartalmazó xilánok lebontásában, az utóbbiak pedig a xiloglükánok hidrolízisében vesznek részt (Zong és munkatársai 1988, Zong és Yashui 1989).

β -D-Xilozidázok előfordulása

β -D-Xilozidázok igen széleskörűen elterjedtek mind a baktériumok (pl. *Bacillus pumilus*, *B. stearothermophilus*, *Thermoanaerobacter saccharolyticum*, *Clostridium cellulolyticum*), mind a gombák (pl. *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *Penicillium wortmanni*) (Coughlan és Hazlewood 1993a, Sunna és Antranikian 1997), mind a növények körében [árpa – *Hordeum vulgare* (Lincoln és Honigman 1976), cukornád – *Saccharum officinarum* (Chinen és munkatársai 1982), hegyi juhar – *Acer pseudoplatanus* L. (Tezuka és munkatársai 1993)]. Igen figyelemreméltó és funkciójuk sokoldalúságát jelzi, hogy több állati szervben is kimutatták jelenlétüket [pl. csiga (*Charonia lampas*) májban (Fukuda és munkatársai 1969), sertés és patkány vesében (Robinson és Abrahams 1967, Patel és Tappel 1969), egér májban (Stephens 1979)], sőt humán diagnosztikai jelentőséggel bírhat, hogy szisztémás *lupus erythematosus*-ban (SLE – különböző szerveket megtámadó, gyakran bőrijelenségekkel járó kollagénbetegség) szenvedő betegek vérérumában is regisztráltak β -xilozidáz aktivitást (Olczyk és munkatársai 1984).

A bakteriális β -D-xilozidázok többnyire sejtfalhoz kötötten vagy intracelluláris formában, a citoszólban fordulnak elő. A fungális β -D-xilozidázok többsége ugyanakkor a micéliumok növekedésének korai szakaszában sejthez kötötten található, míg a növekedés későbbi időszakában extracelluláris enzimmé válik valódi szekréció vagy a sejt lízise révén (Biely 1985; Yamamoto és munkatársai 2000).

Nem-cellulolitikus baktériumok és gombák β -xilozidáz-szintézisével kapcsolatban figyelték meg, hogy ezen mikroorganizmusokat xilánon növesztve jelentős mértékű xilanolitikus enzimtermelés indukálható, ugyanakkor gyorsan metabolizálható szénforrás (xilóz vagy glükóz) hozzáadása katabolit repressziót eredményez (Biely 1985).

β -D-Xilozidázok általános biokémiai jellemzői, szubsztrátspecifitásuk

A β -D-xilozidázok többnyire mono- vagy dimer formában előforduló savas jellegű proteinek, amelyek molekulatömege 60-360 kDa között, izoelektromos pontja pedig 3,3-7,3 között változik (Sunna és Antranikian 1997, Coughlan és Hazlewood 1993a). Kivételt képez pl. a *Talaromyces emersonii* β -xilozidáza, amelynek izoelektromos pontja 8,9 (Tuohy és munkatársai 1993) vagy a 34 kDa molekulatömegű *Pichia stipitis* β -D-xilozidáz (Öczan és munkatársai 1991).

Természetes szubsztrátjaik közül leghatékonyabban a xilobiózt hidrolizálják, s a xilo-oligoszacharidok iránti affinitásuk a lánchossz növekedésével általában csökken (Rodionova és munkatársai 1983). Xilo-heptaóznál hosszabb oligomereket többnyire már képtelenek szubsztrátjukként elfogadni (Herrmann és munkatársai 1997), így nem meglepő, hogy jelentős részük xilánnal szemben hatástalan. Mindez összhangban van azzal, hogy a β -D-xilozidázok és az endoxilanázok jól kiegészítik egymás hatását, hiszen ez utóbbiak a xilozidázok számára hozzáférhetetlen xilánvázat kisebb egységekre bontják, amelyek iránt azonban egyre csökkenő affinitást mutatnak, ugyanakkor a β -D-xilozidázok éppen ezen molekulák iránt fogékonyak. A β -D-xilozidázok egyben igen fontos szerepet játszanak az endoxilanázok végtermék gátlásának elhárításában (Sunna és Antranikian 1997, Rodionova és munkatársai 1983, Dekker és Richards 1976). Így együttműködésük a xilán alapvázának hatékony és teljes mértékű hidrolízisét eredményezi, mint ahogy erről pl. *Bacillus stearothermophilus*-ból izolált enzimek esetében is beszámoltak (Nanmori és munkatársai 1990).

A β -D-xilozidázok működését a lánchossz mellett jelentősen befolyásolja a xilo-oligoszacharidok szubsztituáltsága is:

- a) Ha a terminális, nem-redukáló végen levő xilóz egység szubsztituált, akkor az sztérikusan gátolja az adott xilóz 1,4- β -D-glikozidos kötésének hidrolízisét (Poutanen és munkatársai 1990, Tenkanen és munkatársai 1996).
- b) Ha a nem-redukáló végen levő szubsztituátlan xilóz egység előtti xilóz szubsztituált, akkor 1,2-kötéssel kapcsolódó szubsztituens (pl. 4-*O*-metil-glükuronsav vagy hexuronsav)

esetében végbemegy, 1,3-kötéssel kapcsolódó szubsztituens (pl. arabinóz) esetében viszont nem megy végbe a hidrolízis (Tenkanen és munkatársai 1996).

- c) Ha viszont legalább 2 szubsztituálatlan xilóz egység van az adott xilo-oligoszacharid szubsztrát nem-redukáló végén, akkor az már kellő távolságot biztosít az enzim aktív centrumától ahhoz, hogy a továbbiakban kapcsolódó szubsztituens(ek) helyzetétől függetlenül, végbemehessen az utolsó xilóz egység lehasítása (Kormelink és munkatársai 1993).

Mint az a fentiekből kitűnik, a kapcsolódó szubsztituensnek elsősorban a pozíciója és nem a jellege a meghatározó, amely egyértelműen arra utal, hogy az adott szubsztituens sztérikusan gátolja az ES komplex kialakulását, s ezáltal a hidrolízist.

A heteroxilánok teljes mértékű hidrolízise megvalósulhat segédenzimek közreműködésével vagy az adott enzim szélesebb szubsztrátspecifitása révén. A β -D-xilozidázok egy része α -L-arabinozidáz aktivitással is rendelkezik (Deleyn és munkatársai 1978, Poutanen és Puls 1988, Saxena és munkatársai 1995) tovább növelve ezáltal enzimatis hatékonyágukat a különböző heteroxilánokkal szemben.

2.3.2. A β -xilozidázok működési mechanizmusa

A β -D-xilozidázok – a többi xilanolitikus enzimmel együtt – az O-glikozid hidrolázok (EC 3.2.1.-) népes csoportjához tartoznak. Mivel a β -D-xilozidázok hatásmechanizmusáról igen kevés információ áll rendelkezésünkre, ezért működésük feltérképezéséhez a glikozid hidrolázoknál általánosan érvényes megállapítások nyújthatnak támpontokat.

A glikozidázok általános áttekintése – Működési mechanizmusuk

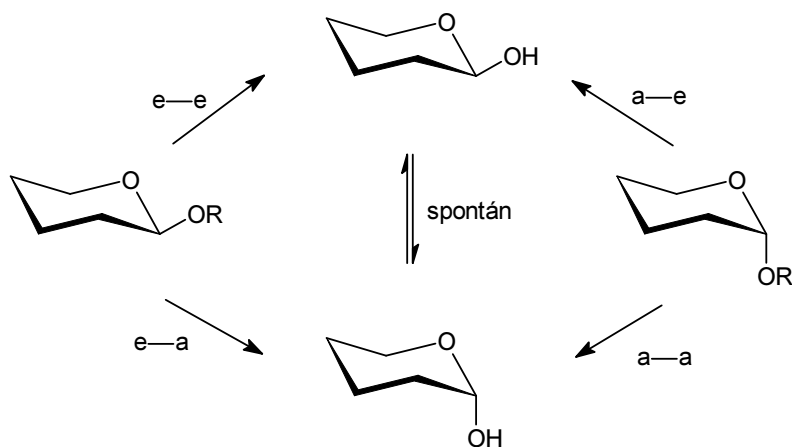
Valamennyi biológiailag jelentős szénhidrátszármazék felépítésében és lebontásában alapvető a glikozidos kötések képződése és hasadása. Ezek *glikozil-transzferázok* és *glikozid hidrolázok (glikozidázok)* által katalizált biokémiai folyamatok, amelyek formálisan a cukorgyűrű anomer szénatomján lezajló nukleofil szubsztitúciós reakciók. Ezek a reakciók végbemehetnek a szubsztrát anomer centruma konfigurációjának megváltozásával (inverzió) vagy megmaradásával (retenció) (Sinnott 1987). Így a katalizált reakció sztereokémiája alapján megkülönböztetnek:

→ *inverzió* és

→ *retenció* enzimeket.

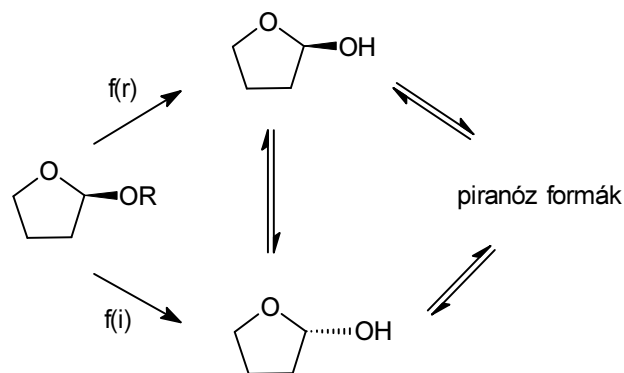
Az inverzió egyetlen, koncentrált lépésben történik, míg a retenció egy kétszeres helyettesítési mechanizmust igényel (kettős inverzió). (3. ábra) A retenciós hidrolázok és a glikozil-transzferázok között lényegében csak a reakció mértékében és az enzim funkciójában van különbség, hiszen számos retenciós glikozidáz képes glikozil csoportot más alkoholokra átvinni, s ugyanakkor glikozil-transzferázok gyakran hidroláz aktivitással is rendelkeznek. Tekintettel arra, hogy a transzferáz aktivitással rendelkező glikozidázoknál a szubsztrát távozó csoportja és az akceptor molekula között nincs lényeges szerkezeti különbség (egyik alkohol molekuláról visznek át glikozil csoportot a másikra), így belátható, hogy transzferáz aktivitású glikozidázoknak retenciós mechanizmussal kell működniük, ellenkező esetben az enzim a szubsztrátnak mindkét anomerjét képes lenne átalakítani. Glikozil-transzferázok esetében (pl. ADP-ribozil transzferáz) viszont a távozó csoport és az akceptor molekula szerkezetileg alapvetően különbözik egymástól, így ezek az enzimek inverziós mechanizmussal is szelektíven működhetnek (Sinnott 1987).

A sztereokémiai szempontok mellett a glikozidázok aszerint is csoportosíthatók, hogy *furanozid* (öttagú) vagy *piranozid* (hattagú) szubsztrátra hatnak-e, illetve, hogy ez utóbbi esetben *ekvatoriális* (*e*) vagy *axiális*-e (*a*) a távozó csoport. Ez alapján a glikozidázok 6 csoportját különböztetik meg: $e \rightarrow e$, $a \rightarrow a$, $e \rightarrow a$, $a \rightarrow e$, $f(r)$, $f(i)$ (2. ábra). Retenciós enzimek $e \rightarrow e$ csoportjához sorolható pl. a lizozim, a β -glükózidázok jelentős része, ill. számos β -xilozidáz, míg az $a \rightarrow a$ csoport legismertebb képviselői az α -amilázok, α -mannozidázok és az α -glükózidázok. Az inverziós enzimek $e \rightarrow a$ csoportjának tagjai a növényi β -mannozidázok és több bakteriális β -xilozidáz, $a \rightarrow e$ inverziós enzimekre pedig jó példaként szolgálnak a β -amilázok, a glükóamilázok vagy az α , α -trehaláz (Sinnott 1987).



2a. ábra

Glikozidázok (piranozidokra hatók) csoportosítása



2b. ábra

Glikozidázok (furanozidokra hatók) csoportosítása

A glikozidázok hatásmechanizmusának felderítése már több évtizede foglalkoztatja a kutatókat. A legjelentősebbek között említendő Koshland, akinek a glikozidázok működésére 1953-ban közzé tett elmélete habár számos finomítással, de lényegében a jelenleg is elfogadott modell alapját képezi (Koshland 1953). Capon 1963-ban először modellezte karboxilcsoport részvételét a glikozid hidrolízisben (Capon 1963). Meghatározó lépést jelentett a glikozidázok mechanizmusának megértésében 1966/67-ben Phillips és munkatársainak munkája, a tojásfehérjében található lizozimnak (ill. a lizozim tri-N-acetil-kitotrióz kompetitív inhibitorával képzett komplexének) röntgenkristallográfiás vizsgálata, amely azóta az $e \rightarrow e$ glikozidázok paradigmájává vált (Phillips 1966, Blake és munkatársai 1967). E szerint az enzim működésében, a hasítandó kötés közelében, két karboxilcsoport játszik esszenciális szerepet: az egyik (Glu-35) protondonorként a glikozidos oxigénatomot protonálja, míg a másik (Asp-52) negatív töltésével az aglikon távozása után visszamaradó glikopiranozil kationt stabilizálja. Ezen glikozilkation képződését a cukorgyűrű székkonformációjának anomer szénatom körüli deformálódása teszi lehetővé. Későbbi vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy ilyen glikozil oxokarbénium ion nukleofil, különösen anionos nukleofil közelében stabilitási okok miatt nem létezhet, hanem helyette – egy oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül – egy jóval stabilabb kovalens glikozil-enzim intermedier képződik (Vocadlo és munkatársai 2001, Zechel és Withers 2001). Ezen felismerés mellett számos, a glikozidázok működése szempontjából igen fontos megállapítás fűződik még Withers és munkatársai nevéhez, akik mechanizmus alapú inaktívátorokkal végzett kísérleteik révén újabb, jelentős lendületet adtak a glikozidázok kutatásának (Miao és munkatársai 1994, Ziser és munkatársai 1995, McCarter és Withers 1996, He és Withers 1997). Az utóbbi években megjelent számos közlemény és összefoglaló

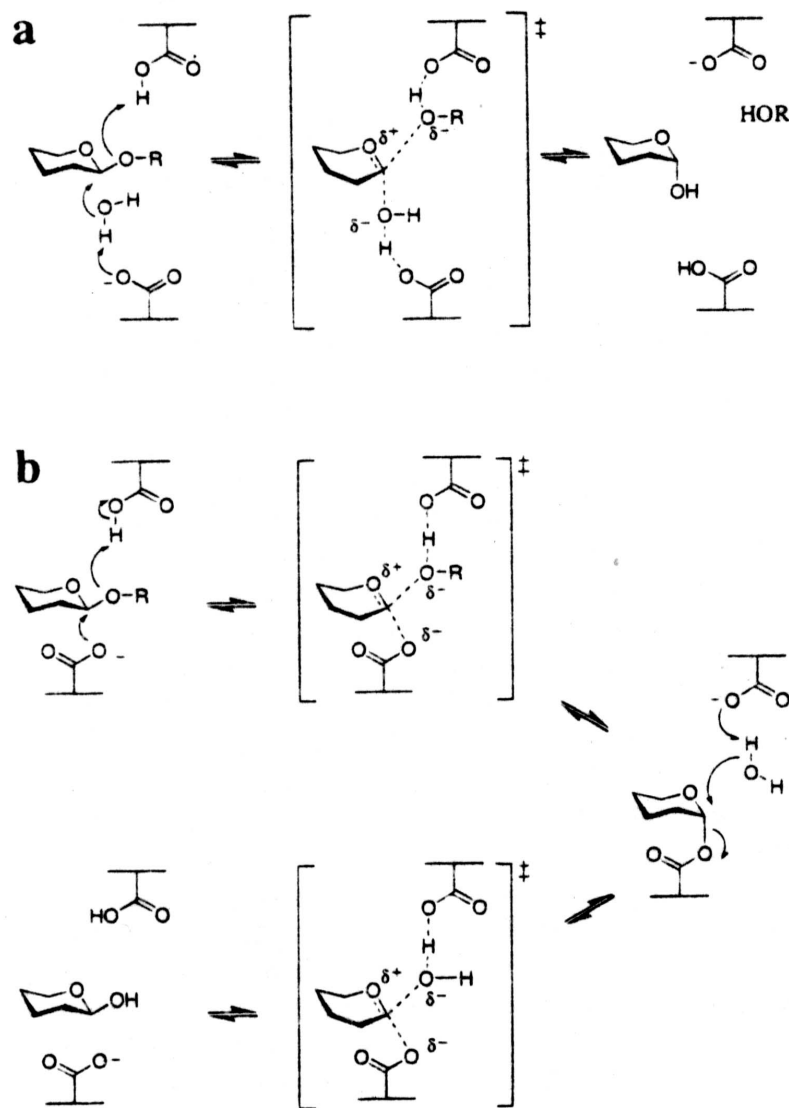
cikk bizonyítja munkájuk eredményességét és jelentőségét (Withers 1999, 2001, Rye és Withers 2000, Joshi és munkatársai 2000, Zechel és Withers 2000, 2001). Az oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapot kialakulásának egyik döntő bizonyítékát az átmeneti állapot analóg inhibitorokkal (pl. aldonolaktonokkal) végzett kísérletek szolgáltatják (Sinnott 1987, Legler 1990, Ermert és munkatársai 1993). Többek között glikozidáz inhibitorokra vonatkozó vizsgálataik, ill. ezekkel kapcsolatos összefoglaló, rendszerező közleményeik révén Sinnott, Legler és Vasella a glikozidáz-kutatás ismert, jeles képviselőivé váltak (Sinnott 1987, 1990, Legler és munkatársai 1980, Legler 1990, 1993, Heightman és Vasella 1999).

A glikozidázok működési mechanizmusára jelenleg elfogadott modell tehát, kisebb módosításokkal, a fent említett Koshland által javasolt sémát követi, amelyet azóta számos szerkezeti és kinetikai analízis is igazolt. A *retenciós* mechanizmus főbb lépései a következők (3b. ábra):

- Az enzim katalitikus centrumában egy karboxilcsoport (katalitikus savként) parciálisan protonálja, s így – a glikozidos O-atom koordinálása révén – aktiválja az aglikont.
- Egy katalitikus nukleofil szerepét betöltő karboxilát anion a piranóz gyűrűt síkjának ellentétes oldaláról támadja, amely folyamat – egy oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül – egy kovalens glikozil-enzim intermedier kialakulásához vezet.
- Az aglikon leválik az aktív centrumról és helyébe egy vízmolekula lép, amely egy reverz folyamatban vesz részt:
- ennek során a vízmolekula a katalitikus sav konjugált bázisa révén parciálisan deprotonálódik,
- majd támadja az anomer centrumot, amely folyamat – egy újabb oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül – a glikozil-enzim intermedier hasadásához vezet. A reakció során végbemenő kettős inverzió eredményezi az anomer centrum konfigurációjának retencióját (Heightman és Vasella 1999). Az első, sav katalizált folyamat a glikozilezési lépés, míg a második, bázis katalizált a deglikozilezési lépés (Withers 1999).

Inverziós glikozidázok esetében szintén két karboxil oldallánc játszik katalitikus szerepet az enzimreakció során. Ezek közül a deprotonált, mint katalitikus bázis, a vízmolekulának a szubsztrát anomer centrumára irányuló támadását segíti, míg a másik, katalitikus savként, az aglikon távozásához, s ezáltal a glikozidos kötés egyetlen lépésben történő hasításához járul hozzá (3a. ábra). A hidrolízis ebben az esetben is oxokarbénium ion jellegű átmeneti állapoton keresztül megy végbe.

Igen lényeges különbség, hogy a retenciós enzimekben a két karboxil oldallánc sokkal közelebb van egymáshoz (a köztük lévő távolság mindössze 5,5 Å), mint az inverziósokban (11 Å). Ez utóbbiaknál a nagyobb távolság teszi lehetővé, hogy az aktív centrumba a távozó csoport mellé egyidejűleg a vízmolekula is beférjen, s ezáltal a folyamat egyetlen lépésben lejátszódhasson (Withers 1999, 2001).



3. ábra

Inverziós (a) és retenciós (b) glikozidázok általános működési mechanizmusa
(Zechel és Withers nyomán, 2000)

Glikozidázok hatásmechanizmusának felderítésére szolgáló módszerek és β -D-xilozidázokra vonatkozó ismereteink

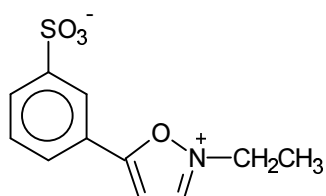
A glikozidázok hatásmechanizmusának tanulmányozását, vagyis a szubsztrát kötésében és a katalízisben szerepet játszó aminosav-oldalláncoknak a vizsgálatát, többféle módszer is lehetővé teszi.

(1) A legpontosabb, s egyben a térbeli szerkezetet is feltáró információkat a szabad enzim, ill. egy ES vagy enzim-inhibitor (EI) komplex közvetlen, röntgenkrisztallográfiás vizsgálata szolgáltatja. Az ilyen irányú kutatásokat a már említett Phillips és munkatársainak endo- β -1,4-glikanázra (lizozimra) vonatkozó vizsgálatai indították el. A módszer komplexitását, valamint a fehérjekristály előállításának nehézségét jelzi, hogy 18 évnek kellett eltelnie a következő glikozidáz-inhibitor komplex (Taka amiláz A maltózzal képzett komplexe) struktúrájának leírásáig. 1992-ig 10 további glikozidáz térbeli szerkezetét sikerült ily módon meghatározni, de az aktív centrum tanulmányozásának ez a közvetlen módja még napjainkban is a ritkábban alkalmazott módszerek közé tartozik (Legler 1993). A 90-es években, az ipari jelentőségükből adódó intenzív tanulmányozásuk végett, néhány xilanáz térbeli szerkezetét is sikerült ily módon meghatározni (Torronen és munkatársai 1994, Wakarchuk és munkatársai 1994, Krengel és Dijkstra 1996). A β -D-xilozidázok azonban ezen a téren teljesen felderítetlen területet képeznek. Eddig csak *Trichoderma reesei*-ből izolált enzimnél végeztek röntgenkrisztallográfiás vizsgálatokhoz szükséges előtanulmányokat (Golubev és munkatársai 2000), de napjainkig még egyetlen β -D-xilozidáz háromdimenziós szerkezete sem ismert.

(2) Mivel a hidrolízisben ionizálható oldalláncok vesznek részt, ezért a pH jelentős hatással van az enzim aktivitására. Ebből adódóan az enzimreakció kinetikájának pH függését tanulmányozó vizsgálatok ugyancsak értékes információkkal szolgálhatnak, hiszen általuk meghatározhatóak az aktív centrumban található ionizálható, katalitikus csoportok pK_a értékei. Ilyen jellegű kísérletek mutattak rá *Bacillus pumilus* β -D-xilozidáza esetében, hogy a katalízisben egy savas jellegű, $pK \sim 8$ savi disszociációs állandójú csoport kulcsfontosságú szerepet játszik. A pK érték alapján feltételezték, hogy egy cisztein szulfhidril-csoportjáról van szó, amely mint protondonor vesz részt az enzim működésében. Ezt a feltételezést későbbiekben inaktivációs reakciókkal is igazolták (Kerstens-Hilderson és munkatársai 1984). *Trichoderma reesei*-ből izolált β -xilozidáz aktivitásának pH függése egyértelműen jelezte, hogy 2 karboxilcsoport vesz részt a hidrolízisben, amelyek közül az egyiknek deprotonálnak (pK_{E1} 3,20 ill. pK_{ES1} 2,40), a másiknak pedig protonálnak (pK_{E2} 5,26 ill. pK_{ES2} 6,26) kell

lennie a hatékony katalízishez. Az enzimaktivitás pH függéséből levonható következtetések tehát jó kiindulási alapként szolgálhatnak a katalitikus csoportok jellegének felderítéséhez, mivel azonban az egyes aminosavakra jellemző pK értékek gyakran igen közel esnek egymáshoz, ill. az adott közeg erőteljesen befolyásolhatja értéküket, így többnyire további vizsgálatok szükségesek a feltételezések megerősítésére (Keleti 1985).

(3) Az enzimek aminosav-oldallánc típusai specifikusan ható reagensekkel szelektíven módosíthatók. Az egyik leggyakrabban tanulmányozott oldallánc típus a karboxilcsoport, amelynek kémiai módosítása manapság már többféle vegyülettel (vegyületcsoporttal) is hatékonyan megoldható (Lundblad és Noyes 1985). Az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a Koshland és Hoare által bevezetett vízzel oldható karbodiimidekkel mint aktiváló ágensekkel történő módosítás, amely során a karboxilcsoport és egy megfelelő nukleofil (pl. glicin-metil-észter) között alakítanak ki kovalens kötést a karbodiimid segítségével (Hoare és Koshland 1966, Carraway és Koshland 1972). Egy másik – ugyancsak gyakran alkalmazott – vegyületcsalád a Woodward és munkatársai által kifejlesztett N-alkil-5-fenilizoxazolium sók (Woodward és Olofson 1966, Bodlaender és munkatársai 1969), amelyek közül leginkább az N-etil-5-fenilizoxazolium-3'-szulfonát (Woodward K reagens, 4. ábra) használata terjedt el (Pétra 1971, Pétra és Neurath 1971, Sinha és Brewer 1985, Bray és Clarke 1990, Komissarov és munkatársai 1995).



4. ábra

Woodward K reagens

Ugyancsak gyakran tanulmányozott aminosav a hisztidin (His), amelynek imidazoil-csoportját szinte mindenesetben dietil-pirokarbonáttal (DEP) módosítják (Wolf és munkatársai 1970).

Az enzimek aminosav-oldalláncainak kémiai módosításaival számos glikozidáznál igazolták, hogy a katalízisben karboxilcsoportok játszanak esszenciális szerepet (Bray és Clarke 1990, Chauthaiwale és Rao 1994, Wen és munkatársai 1999), a szubsztrátkötő hely kialakításában gyakran hidrofób jellegű aminosavak (triptofán, tirozin) oldalláncai vesznek részt (Keskar és munkatársai 1989, Nath és Rao 1998, Kiss és munkatársai 1981), míg az enzim aktív

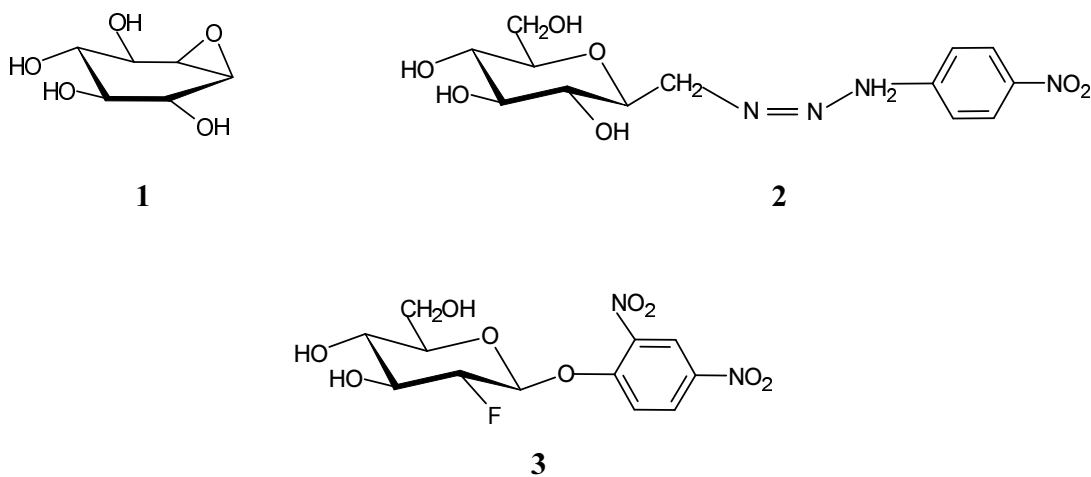
konformációjának fenntartásáért több esetben His oldalláncok a felelősek. *Bacillus pumilus* β -D-xilozidázánál katalitikus cisztein (ld. fentebb), valamint az enzim aktív konformációjának stabilizálásában résztvevő His jelenlétét igazolták (Kerstens-Hilderson és munkatársai 1984). Néhány bakteriális xilanáz esetében ugyancsak ciszteinek aktív centrumbeli előfordulásáról számoltak be (Keskar és munkatársai 1989, Deshpande és munkatársai 1990); ezen aminosavak szerepe azonban még pontosan nem tisztázott: vagy a kovalens glikozil-enzim intermedier kialakításában vesznek részt, vagy az enzim optimális működéséhez szükséges strukturális elrendeződést biztosítják (Kulkarni és munkatársai 1999). Az első fungális β -D-xilozidázzal (*Trichoderma reesei*) végzett kémiai módosításokról csak néhány hónappal ezelőtt (2001 végén) – kutatásainkkal egyidőben – publikáltak Gómez és munkatársai (2001). Közleményükben 2 katalitikus karboxilcsoportról, valamint feltehetőleg a szubsztrát megkötésében szerepet játszó triptofán oldalláncról számoltak be.

Az enzim kémiai módosításával tehát meghatározhatóak a katalízisben és/vagy a szubsztrátkötésben résztvevő aminosav-oldalláncok *típusai*, viszont ez a módszer nem ad lehetőséget ezek azonosítására.

(4) A katalitikus aminosav-oldalláncok azonosításának egyik lehetőségét képezik a mechanizmus alapú inaktivátorok, valamint az affinitás jelölők alkalmazásai.

A mechanizmus alapú inaktivátorok többnyire olyan aktivált glikozidok, amelyek az anomer centrum közelében egy reaktív csoporttal szubsztituáltak, vagy olyan kevésbé reaktív vegyületek, amelyek az enzim mechanizmusa révén aktiválódnak. Ezek a reagensek képesek glikozil-enzim intermedier kialakítására, hidrolízisük viszont nagyon lassú folyamat, ami az intermedier felhalmozódását eredményezi, lehetőséget teremtve ezáltal a kötésben résztvevő nukleofil azonosítására (Blanchard és Withers 2001). Az inaktivátorok ezen típusához tartoznak a konduritol epoxidok (1,2-anhidroinozitolok) (5. ábra, 1), amelyek az enzim katalitikus protondonorja révén protonálódnak, s oxirán gyűrűjük többnyire *transz*-diaxiális felnyílása után kovalens kötést létesítenek a katalitikus nukleofillal. A glikozil-metiltriazenek (5. ábra, 2) ugyancsak ehhez az inaktivátor típusához sorolhatók (Black és munkatársai 1993). Ezen vegyületekből – szintén enzimatis katalízis hatására – glikozil-metildiazónium ionok képződnek, amelyek N_2 kilépés közben igen elektrofil karbénium ionokká alakulnak, s ily módon alkilezni tudják az enzim katalitikus nukleofiljét. A mechanizmus alapú inaktivátorok jelentős csoportját képezik a Withers és munkatársai által kifejlesztett fluoro-glikozidok, amelyek segítségével számos glikozidáz esetében sikerült azonosítani a katalitikus nukleofilt (Miao és munkatársai 1994, Ziser és munkatársai 1995, He és Withers 1997). A 2,4-

dinitrofenil-2-dezoxi-2-fluoro-glikozidok (5. ábra, 3) eredményesen használhatók β -glikozidázok esetében, míg α -glikozidázoknál 5-fluoro-glikozil-fluoridok vagy 2-dezoxi-2,2-difluoro-glikozidok trinitrofenil származékai bizonyultak hatékonyak (McCarter és Withers 1996, Howard és munkatársai 1998, Withers 2001). Ezen reagensek működésének lényegét az képezi, hogy C-2 vagy C-5 helyzetű reaktív csoportjuk destabilizálja mind a glikozilezés, mind a deglikozilezés átmeneti állapotát, hiszen pl. a C-2 hidroxilcsoport eltávolítása kulcsfontosságú hidrogénkötés megszűnését vonja maga után, a helyébe viszont elektronszívó fluoratom kerül. Ugyanakkor jó távozócsoporttal (di-, trinitrofenolát vagy fluorid) rendelkeznek, amely révén a glikozilezés felgyorsul, a deglikozilezés sebessége viszont nem változik, ami a glikozil-enzim intermedier felhalmozódásához vezet. Ez az intermedier viszont katalitikusan kompetens, tehát megfelelő nukleofilitású akceptor molekula jelenlétében transzglikozilezési reakció játszódik le, amely az enzim reaktiválódásához vezet (Blanchard és Withers 2001).



5. ábra

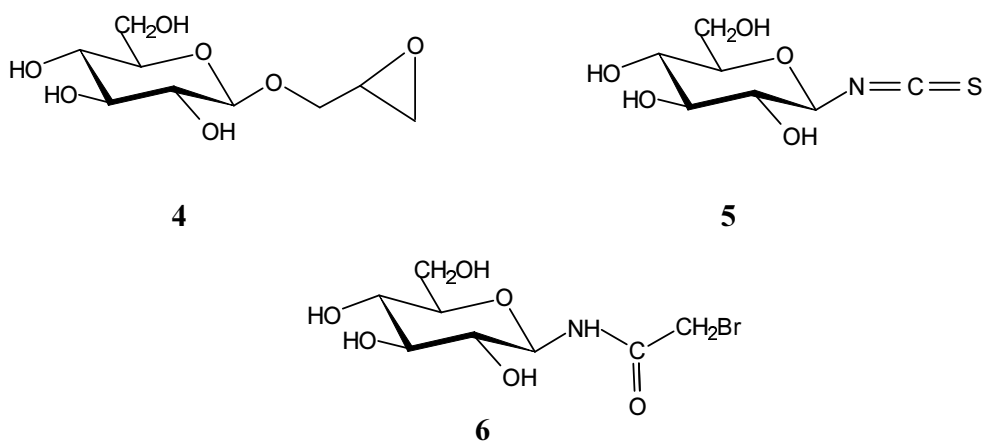
Mechanizmus alapú inaktívátorok

1982-ben végeztek először mechanizmus alapú inaktívátorral, (xilozilmetil)ariltriazénnel, tájékoztató jellegű méréseket β -D-xilozidáz vizsgálatára (Sinnott és munkatársai 1982). Későbbiekben Vocadlo és munkatársai (1998) 2,4-dinitrofenil-2-dezoxi-2-fluoro- β -D-xiloziddal bakteriális β -D-xilozidáz (*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*) katalitikus nukleofiljét (Glu-277) azonosították. Több, hasonló jellegű, β -D-xilozidázokra vonatkozó vizsgálatról nem tudunk.

Az inaktívátorok másik nagy típusát az affinitás jelölők alkotják. Ezek olyan reaktív szubsztrátanalógok, amelyek igen nagy affinitást mutatnak az enzim aktív centruma iránt,

szerkezeti hasonlóságuknál fogva képesek ebbe kötődni, s ott reaktív csoportjuk révén kovalens kötést alakítanak ki a katalitikus aminosav-oldalláncokkal. Az ily módon jelölt aminosav az enzim proteolitikus emésztése után azonosítható. Ez történhet radioaktívan jelölt inaktivátor alkalmazásával vagy a mindinkább elterjedőben lévő elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) segítségével (Tull és munkatársai 1996). Affinitás jelölőkkel, a mechanizmus alapú inaktivátorokkal ellentétben, nemcsak a katalitikus nukleofil, hanem az aktív centrum egyéb reaktív csoportjai is azonosíthatók (Legler 1990). Manióka (*Manihot esculenta* Crantz) β -D-glükózidáza esetében pl. a katalitikus protondonort (Glu-198) sikerült ezzel a módszerrel azonosítani (Keresztessy és munkatársai 1994). Ezen inaktivátorok az enzimekkel a Kitz és Wilson által leírt látszólagos (pszeudo) elsőrendű kinetika szerint reagálnak, feltéve, hogy a reagens az enzimhez képest igen nagy feleslegben van jelen és mellékreakció nem játszódik le (Kitz és Wilson 1962, Legler 1990). Amennyiben szubsztrát vagy reverzibilisen kötődő, kompetitív inhibitor jelenléte megvédi az enzimet az inaktivációtól, az általában kellő bizonyítéka annak, hogy az inaktivátor az enzim aktív centrumában lévő katalitikus oldalláncot módosította (Plapp 1982, Legler 1990).

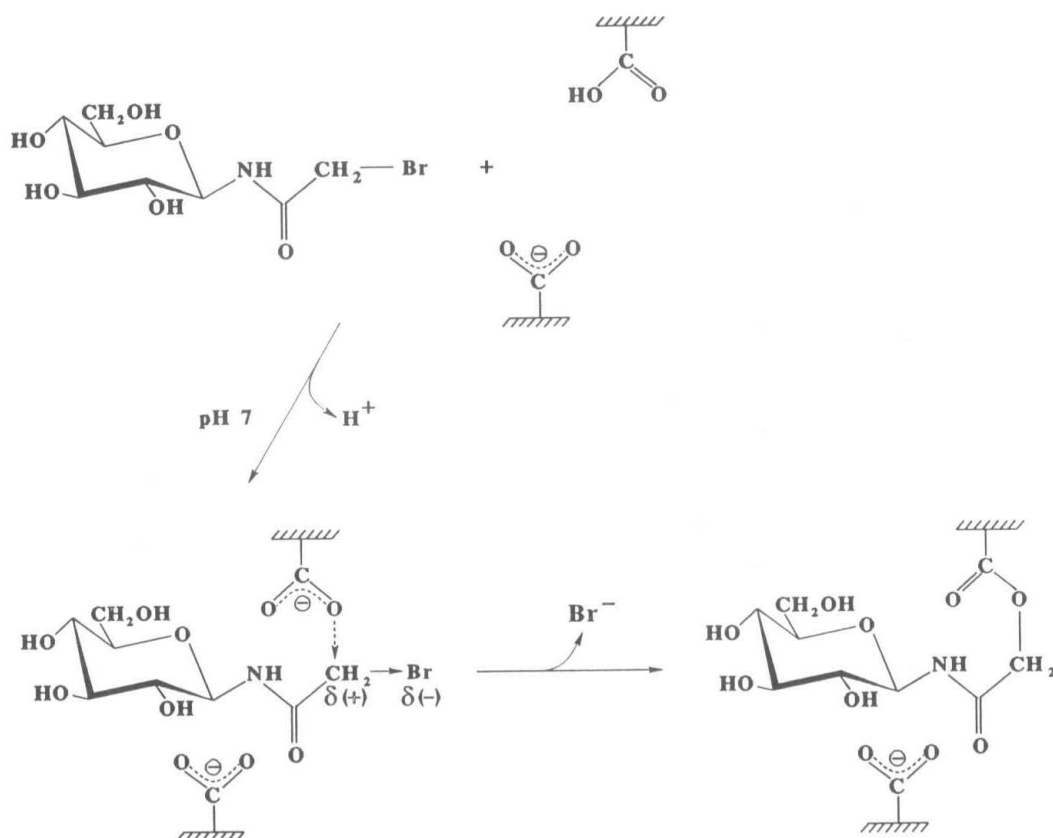
Az elmúlt évtizedekben számos affinitás jelölőt szintetizáltak és használtak enzimek szerkezetének és mechanizmusának tanulmányozására (Plapp 1982). Ide tartoznak a különböző glikozil-epoxid származékok (6. ábra, 4), amelyek –a konditurol epoxidoktól eltérően – exociklikus oxirán gyűrűt tartalmaznak, amely vagy közvetlenül kapcsolódik a piranózgyűrűhöz vagy néhány kötési távolságra. Ez tette lehetővé ezen vegyületek sikeres alkalmazását lizozimnál vagy celluláznál, tehát olyan endoglikozidoknál, amelyeknél egy meghatározott minimális lánc hossz szükséges mind a szubsztrát hatékony kötődéséhez, mind annak hidrolíziséhez (Legler 1990).



8. ábra

Affinitás jelölők

Az affinitás jelölők egy másik csoportját a glikozil-izotiocianátok (6. ábra, 5) alkotják. Ezek a reagensek elektrofil izotiocianát csoportjuknak köszönhetően igen könnyen lépnek reakcióba aminocsoportokkal megfelelő tiourea származék képződése közben. Alkalmazásuk azonban kellő körültekintést igényel a könnyen hozzáférhető, egyéb aminocsoportokkal végbemenő mellékreakcióik miatt (Legler 1990). Az affinitás jelölők további fontos képviselői az N-brómacetil-glikopiranozilaminok. Ezen reagensek működésének alapját az képezi, hogy az aglikonon lévő brómatom elektronszívó hatása révén parciálisan pozitív töltésűvé teszi a szomszédos α -szénatomot, amely –a közeg pH-jától ill. az enzim katalitikus csoportjainak disszociáltságától függően – vagy a katalitikus nukleofillel vagy a deprotonált katalitikus protondonorral létesít kovalens kötést (7. ábra) (Keresztessy és Kiss).



7. ábra

N-Brómacetil-glükopiranozilamin affinitás jelölő működésének feltételezett mechanizmusa
(manióka β -D-glükozidáza esetén, katalitikus protondonor jelölésekor)
(Keresztessy és munkatársai nyomán, 1994)

Első sikeres alkalmazásukról *Escherichia coli* β -D-galaktozidáza esetében számoltak be, ahol egy, a katalitikus helyhez igen közel eső metionint (Met-502) módosítottak (Naider és munkatársai 1972). Azóta már több baktérium és gomba eredetű β -glikozidáz esetében is hatékony, karboxil oldalláncot alkilező inaktívátornak bizonyultak (Thomas 1977, Black és munkatársai 1993, Keresztessy és munkatársai 1994, Keresztessy és Kiss). A *Cellulomonas fimi* exoglükánáza esetében alkalmazott N-brómacetil-cellobiozilamin, a manióka β -D-glükózidázánál leírtakhoz hasonlóan, az enzim katalitikus protondonorját (Glu-127) alkilezte (Tull és munkatársai 1996). Affinitás jelölőket, széleskörű alkalmazásuk ellenére, β -D-xilozidázok aktív centrumának vizsgálatához eddig még nem használtak.

(5) Míg az irreverzibilisen kötődő inaktívátorokat elsősorban a katalitikus oldalláncok azonosításához használják, addig a szubsztrátkötő hely feltérképezéséhez többnyire reverzibilis inhibitorokat alkalmaznak. Ezekre vonatkozóan több összefoglaló munka jelent meg az elmúlt években (Legler 1990, Heightman és Vasella 1999, El Ashry és munkatársai 2000). A leghatékonyabb, s legjelentősebb reverzibilis inhibitorok közé a glikonolaktonok, a glikonolaktámok, ill. a különböző N-tartalmú, bázikus szubsztrátanalógok (pl. glikozilaminok vagy a cukorgyűrűben iminocsoportot tartalmazó származékok) tartoznak. A glikonolaktonokkal végzett vizsgálatok igazolták, hogy a katalízis során oxokarbénium jellegű átmeneti állapotot alakul ki. Ilyen jellegű inhibíciós vizsgálatokból ered Vasella és munkatársainak azon újszerű hipotézise is, miszerint a katalitikus karboxilcsoportok nem feltétlenül „egymással szemben”, a hasítandó glikozidos kötés síkja alatt és felett találhatók, hanem a protondonor „oldalt”, a gyűrű síkjához közelebb is elhelyezkedhet (Heightman és Vasella 1999). Ezen elmélet bizonyítása azonban még folyamatban van.

(6) Modern biotechnológiai eljárásoknak köszönhetően bármelyik, fenti módszerrel nyert feltevés vagy megállapítás egyértelműen igazolható. *Bacillus stearothermophilus* T-6 β -D-xilozidázának sikeres klónozása, szekvenálása és *E. coli*-ban történő expresszálása után irányított mutagenézis vizsgálatokkal bizonyították, hogy a Glu-160 esszenciális sav-bázis katalizátorként szerepel a katalízisben (Bravman és munkatársai 2001a). Egy ugyancsak *Bacillus stearothermophilus* T-6 eredetű másik β -D-xilozidáz esetében pedig ugyanezen kutatók hasonló jellegű, aminosavcserén alapuló vizsgálatokkal igazolták, hogy az enzim működésében a Glu-337 és a Glu-413 katalitikus aminosav-oldalláncokként vesznek részt (Bravman és munkatársai 2001b).

A biotechnológia intenzív fejlődésének köszönhetően az elmúlt néhány évben egyre több enzim teljes aminosavsorrendje vált ismertté. Ez képezte az alapját egy új

enzimbesorolási rendszernek, amelynek megalkotása Henrissat nevéhez fűződik (Henrissat 1991). Ez a rendszer az egyes családok megalkotásánál az enzimek szekvenciája közötti homológiát veszi alapul. Henrissat feltételezte, hogy ezen homológia nemcsak strukturális, hanem funkcionális hasonlóságot is jelenthet. Ezen elmélet szerint az egy családba tartozó enzimek aktív centruma konzervatív blokkokat ill. konzervatív katalitikus aminosavakat tartalmaz, s ily módon az enzim által katalizált folyamatok sztereokémiája is azonos. A szekvenciabeli rokonság alapján jelenleg 87 glikozid hidroláz család létezik (ezek száma azonban ismereteinkkel együtt folyamatosan bővül), amely közül régebben kettő (39, 43), majd három (39, 43, 52), s újabban még további kettő (3, 54) családba soroltak β -D-xilozidázokat (Henrissat és Bairoch 1993, Henrissat és Bairoch 1996, CAZy adatbank). Ezek közül legjobban ismert a 39. család (1), amelynél – az eddig felderített enzimek alapján (Bravman és munkatársai 2001a, Vocadlo és munkatársai 1998) – mind a katalitikus nukleofil, mind a katalitikus protondonor Glu, és a homológia alapján feltételezik, hogy valamennyi ide tartozó enzim retenciós mechanizmussal működik. Ezen enzimek mindegyike bakteriális eredetű. (2) A 43. család tagjai többnyire bifunkcionális, β -D-xilozidáz és α -L-arabinofuranozidáz aktivitással is rendelkező inverziós enzimek, amelyeknél azonban sem a katalitikus nukleofil, sem a katalitikus protondonor nem ismert. (3) Az 52. családban a legújabb közölt eredmények alapján – a 39. családhoz hasonlóan – ugyancsak Glu tölti be mind a katalitikus nukleofil, mind a sav-bázis katalízisben résztvevő aminosav szerepét (Bravman és munkatársai 2001b), és ezek az enzimek is retenciós mechanizmussal működnek. (4) Ugyancsak retenciós enzimekként tartják számon az 54. család tagjait, amelyekről – lévén az egyik újabban leírt csoport – talán a legkevesebb információ áll rendelkezésünkre. Szinte valamennyi ide tartozó enzim gomba eredetű. (5) Az utolsó, β -D-xilozidázokat is tartalmazó család a 3., amelynek azonban viszonylag csak kis részét képezik a β -D-xilozidázok, igen nagy arányban inkább β -D-glükozidázokat tartalmaz. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy az említettek közül a legjobban feltérképezett enzimes család, amelynek ma már nemcsak katalitikus szerepet játszó aminosavai, hanem egyes képviselőinek a háromdimenziós szerkezete is elérhető. Elég sok fungális β -D-xilozidázt sorolnak ide (többek között valamennyi ismert szekvenciájú *Aspergillus* ill. *Trichoderma reesei* β -D-xilozidázát). Ezek közül azonban egynek sem ismert konkrétan az aktív centruma, a család többi tagjával mutatott homológia alapján viszont feltételezik, hogy ez esetekben katalitikus nukleofilként Asp, katalitikus protondonorként pedig Glu működhet. Ezen enzimeknél szintén retenciós mechanizmust valószínűsítene (CAZy adatbank).

3. SAJÁT VIZSGÁLATOK

Az elmúlt évtizedekben mind biotechnológiai, mind ipari szempontból egyre nagyobb érdeklődés mutatkozott – az β -1,4-endoxilázok mellett – az addig háttérbe szoruló β -D-xilozidázok iránt is. Ezt igazolja, hogy napjainkban egyre több, a világ legkülönbözőbb kutató csoportjai által publikált közlemény jelenik meg róluk. Ennek ellenére a β -D-xilozidázokra vonatkozó ismereteink még mindig nagyon hiányosak. Habár számos – elsősorban mikrobiális – forrásból izoláltak már β -D-xilozidázt, a vizsgálatok többsége az enzim tisztítására és többnyire biokémiai jellemzésére, szubsztrátspecifitására vonatkozik. Igen behatárolt azon közlemények száma, amelyek az enzim működési mechanizmusáról közölnek adatokat. Igaz, a modern biotechnológiai eljárásoknak köszönhetően már egyre többet tudunk genetikai hátterükről is, több β -xilozidáz teljes vagy részleges aminosav szekvenciáját sikerült már felderíteni (Mai és munkatársai 2000, SWISS-PROT adatbázis), amely lehetővé teszi a Henrissat-féle glikozidáz családokba történő besorolásukat (Henrissat 1991, Henrissat és Bairoch 1993). Ez további értékes információkat szolgáltat az adott enzimekről, de nem pótolhatja az adott enzimek működési mechanizmusának részletes tanulmányozását. A fenti tények inspiráltak bennünket, hogy β -xilozidázok átfogó jellegű, behatóbb vizsgálatába kezdjünk. Célul tűztük ki

- (1) egy β -D-xilozidáz megfelelő forrásból történő izolálását,
- (2) az enzim homogén, tiszta formában történő kinyerését,
- (3) biokémiai jellemzését.
- (4) Az enzim működési mechanizmusának felderítését, ill. az aktív centrum felépítésében résztvevő, katalitikus szerepet játszó aminosav-oldalláncok vizsgálatát részint enzimkinetikai módszerekkel, részint aminosav specifikus módosító reagensok alkalmazásával terveztük.
- (5) Korábbi, manióka (*Manihot esculenta* Crantz) β -D-glükózidázára vonatkozó tapasztalatok alapján (Keresztessy és munkatársai 1994), terveztük egy katalitikus aminosav-oldalláncok azonosítására alkalmas, β -D-xilozidázokra specifikus inaktivátor (N-brómacetil- β -D-xilopiranozilamin) szintézisét és potenciális affinitás jelölőként való kipróbálását.
- (6) Terveztük az enzim szubsztrát kötőhelyének feltérképezését inhibíciós vizsgálatokkal.

(7) Továbbá arra is szerettünk volna fényt deríteni, hogy az adott enzim vajon rendelkezik-e transzferáz aktivitással, amely révén az enzim által katalizált reakciók sztereokémiája meghatározható, sőt szintetikus vonatkozásban is jelentős lehet.

3.1. β -D-Xilozidáz izolálása

Ahhoz, hogy egy enzim működését tanulmányozhassuk, megfelelő enzimforrásra van szükség, amely révén – lehetőleg kis anyagi ráfordítással, rövid idő alatt – elegendő mennyiségben juthatunk a kívánt enzimhez. A szakirodalomban fellelhető leggyakrabban alkalmazott fungális β -xilozidáz források a különböző *Aspergillus* fajok, elsősorban az *A. niger* (Oguntimein és Reilly 1980, Rodionova és munkatársai 1983), valamint a *Trichoderma reesei* (Poutanen and Puls 1988, Herrmann és munkatársai 1997, Gómez és munkatársai 2001). A Debreceni Egyetem TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszéke a következő *Aspergillus* törzseket bocsátotta rendelkezésünkre: *A. carbonarius* (KLU 93), *A. nidulans* (KLU 94-1), *A. niger* (KLU 94-18) és *A. oryzae* (KLU 95-62), amelyek β -D-xilozidáz aktivitását hasonlítottuk össze. A törzseket először Sabouraud tápoldatban tenyésztettük, de hamarosan áttértünk egy Takenishi és munkatársai által közölt (1973) szilárd táptalajon (vizes búzakorpán) történő tenyésztésre. Ez utóbbi táptalaj nemcsak olcsó volta, könnyű hozzáférhetősége és kezelhetősége szempontjából volt kedvezőbb, hanem azért is, mert ezen az *Aspergillus* törzsek lényegesen jobb (mintegy 2 nagyságrenddel nagyobb) β -xilozidáz termelést mutattak, mint az előző folyékony tápközegben. Ez esetben valószínűleg a búzakorpa magas xilán tartalma – mint egyetlen rendelkezésre álló szénforrás – indukálhatta a fokozottabb β -xilozidáz enzimtermelést, mint ahogy erről már mások is beszámoltak (Coughlan és Hazlewood 1993, Saxena és munkatársai 1995).

Összehasonlítottuk mind az extracelluláris, mind az intracelluláris β -D-xilozidáz aktivitást, mely utóbbihoz a sejtek golyós malommal történő feltárása révén jutottunk. Az intracellulárisan mérhető enzimaktivitás olyan alacsony volt, hogy a továbbiakban csak az extracelluláris enzimtermeléssel foglalkoztunk. Ez könnyebb hozzáférhetősége révén nemcsak a mi vizsgálatainknál volt kedvező, hanem egy későbbi, esetleges ipari felhasználás során is előnyös lehet. Az általunk tapasztalt nagy arányú eltérés az extracelluláris aktivitás javára jó egyezést mutat azzal a ténnyel, hogy a fungális β -D-xilozidázok nagy része a micéliumok növekedésének korai szakaszában még intracellulárisan fordul elő, de jelentős részük a micéliumok növekedésének későbbi időszakában a környező közegbe szekretálódik (Biely 1985).

A négy *Aspergillus* törzs extacelluláris β -D-xilozidáz termelését az 1. táblázat tartalmazza. Az eredményeket összehasonlítva jól látható, hogy az irodalomból eddig ismeretlen *A. carbonarius* igen jó enzimforrásnak bizonyult, mivel a többi törzsnél 2-5-ször nagyobb specifikus β -D-xilozidáz aktivitást mutatott. Így ezt a törzset használtuk további vizsgálatainkhoz.

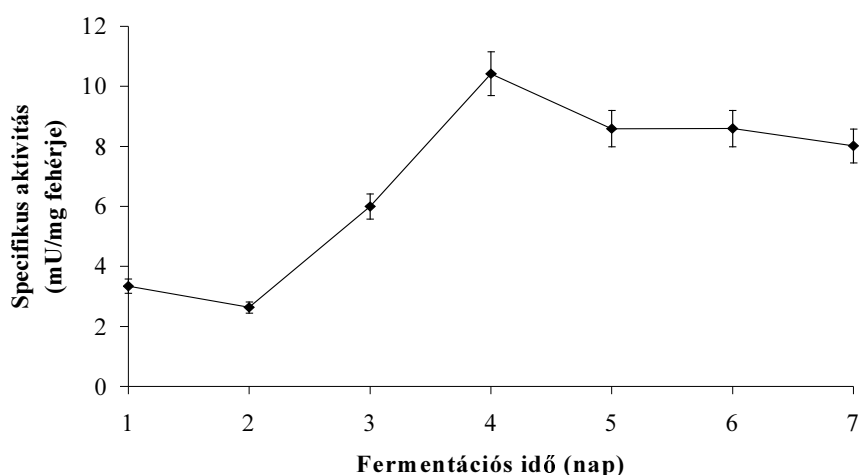
1. táblázat

Különböző *Aspergillus* fajok β -D-xilozidáz termelése*

Faj	Aktivitás (U/ml)	Specifikus aktivitás (mU/mg fehérje)
<i>A. carbonarius</i>	$0,149 \pm 0,007$	$11,2 \pm 0,8$
<i>A. nidulans</i>	$0,033 \pm 0,004$	$4,73 \pm 0,37$
<i>A. niger</i>	$0,022 \pm 0,002$	$2,53 \pm 0,21$
<i>A. oryzae</i>	$0,017 \pm 0,001$	$2,28 \pm 0,25$

* Az *Aspergillus* törzseket szilárd búzakorpás táptalajon tenyésztettük, 27 °C-on, s a mintákat 4 napos tenyészetekből vettük.

Mivel a tenyésztési idő lényegesen befolyásolhatja a mikroorganizmusok enzimtermelését, ezért a fermentációs idő optimalizálására törekedtünk. Egy hétig követtük figyelemmel az *A. carbonarius* β -D-xilozidáz termelését.



8. ábra

A. carbonarius β -D-xilozidáz termelése 7 napos tenyésztés alatt

Ahogy a 8. ábra is mutatja, a specifikus aktivitás a kezdeti növekedés után a 4. napon elérte maximumát (10,4 mU/mg fehérje), majd kis mértékben csökkenve stagnáló szinten maradt. Ezen eredmények alapján az enzimtisztításhoz 4 napos tenyészeteket használtunk.

3.2. *A. carbonarius*ből izolált β -D-xilozidáz tisztítása

Az *A. carbonarius* 4 napos tenyészeinek vizes extrakciója (100 ml desztillált víz, 3 h, 30 °C, 170 rpm), majd szűrése révén egy olyan kiindulási (ún. „nyers”) enzimkivonathoz jutottunk, amely elegendő mennyiségű β -D-xilozidáz aktivitást mutatott, de emellett természetesen még számos más alkotót (egyéb fehérjéket, szénhidrátokat, színanyagokat stb.) is tartalmazott. Így a következő szükséges lépés az extraktumból a β -xilozidáz enzim homogén, tiszta formában történő kinyerése volt.

A kiindulási enzimkivonat a β -D-xilozidáz aktivitás mellett jelentős mértékű β -D-glükozidáz, β -D-galaktozidáz és viszonylag kisebb mennyiségű α -L-arabinozidáz aktivitást mutatott, ezért a tisztítási folyamat során ezek változását is figyelemmel kísértük (2. táblázat). Az enzimtisztítás egyik legfőbb problémáját a β -D-galaktozidáz elkülönítése jelentette, ez az enzim ugyanis több tulajdonságában is (pl. molekulatömeg, izoelektromos pont, pH és hőmérsékleti optimum) igen nagy hasonlóságot mutatott a β -D-xilozidázzal. Sokáig kérdéses is volt, hogy vajon a β -D-xilozidáz és a β -D-galaktozidáz aktivitás nem egy enzimhez tartozik-e, annyira „együtt tisztultak” számos elválasztási módszernél. Végül részint a két enzim hidrofóbicitásában mutatkozó különbségek kihasználásával, részint pedig egy szelektíven ható kompetitív inhibitornak – mint ligandnak – affinitás kromatográfiában történő alkalmazásával sikerült a teljes mértékű elválasztásukat megvalósítani. A β -D-glükozidáz mind molekulatömegében, mind izoelektromos pontjában, mind pedig hidrofób jellegében némi eltérést mutatott a β -D-xilozidáztól, így ezen enzim elkülönítésére több módszer is alkalmasnak bizonyult. Ezen felismerésekig, természetesen, egy hosszú és számos elválasztás-technikai módszer kipróbálását igénylő út vezetett. Végeredményként azonban sikerült kidolgoznunk egy gyors (mindössze 3 lépést igénylő) és hatékony tisztítási eljárást, amely a következő lépéseket tartalmazta:

- 1) hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (HIC)
- 2) kromatofókuszálás
- 3) affinitás kromatográfia.

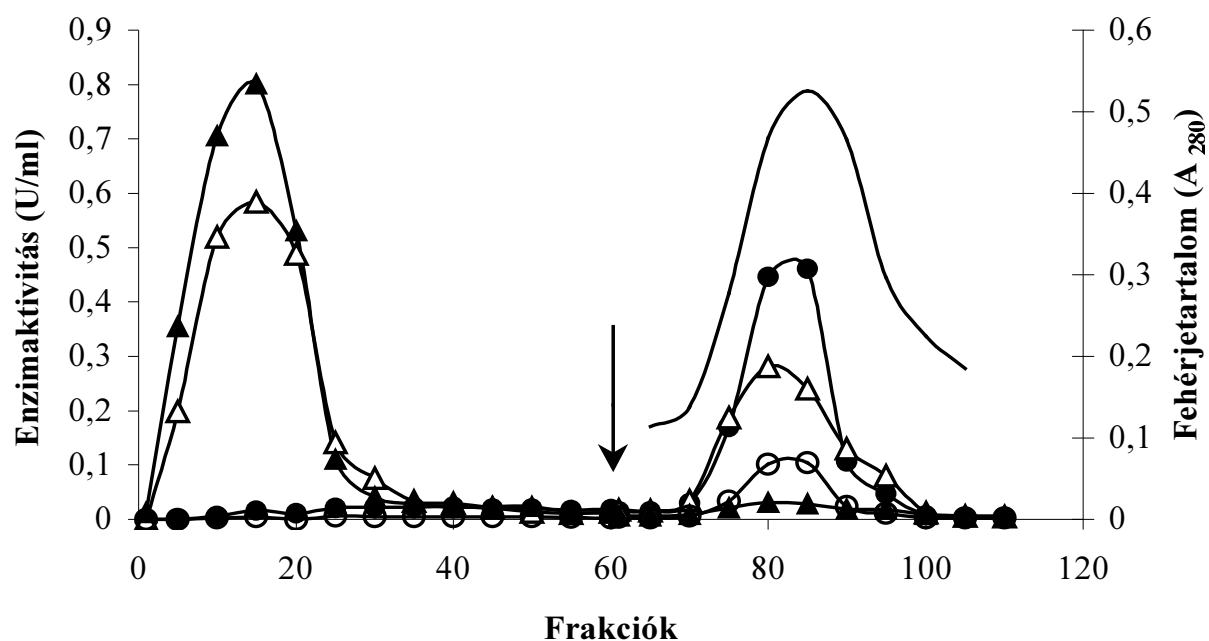
2. táblázat

A. carbonarius glikozidáz aktivitásai a tisztítási folyamat egyes fázisaiban

Tisztítási lépés	Teljes enzim aktivitás (U)			
	β -D-xilozidáz	β -D-glükózidáz	β -D-galaktozidáz	α -L-arabinozidáz
Nyers extraktum	30,5	78,5	95,9	5,4
HIC (Phenyl-Sepharose Cl-4B)	26,4	12,5	1,96	5,3
Kromatofókuszálás (PBE 94)	17,0	—	1,02	3,11
Affinitás kromatográfia	14,8	—	—	3,01

1) A tisztítási folyamat egyik sarkalatos pontja a *hidrofób kölcsönhatás kromatográfia* volt, amelynél az egyes fehérjék hidrofób tulajdonságában rejlő különbségek használhatók fel a sikeres elválasztáshoz. A HIC során Phenyl-Sepharose CL-4B típusú oszloptöltetet használtunk, amelyhez azon fehérjék tudnak hatékonyan kötődni, amelyek felületükön minél több fenilcsoportot tartalmazó oldalláncot (pl. triptofil, tirozil, fenilalanil) hordoznak. Ezek az oldalláncok azonban sok esetben a fehérjemolekula belsejében, elrejtve találhatók. Hasonló képet mutathat az általunk vizsgált β -D-xilozidáz is 20 mM Na-acetát pufferben, mivel ilyen közegben nem kötődött az oszlophoz. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jelenlétében azonban az oldat ionerősségének növekedése a fehérje harmadlagos szerkezetének változását vonta maga után, s így egyes, addig elrejtett oldalláncok is hozzáférhetővé váltak felszíni, hidrofób kölcsönhatások kialakításához. Az alkalmazott $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mennyisége lényeges tényezőnek bizonyult a tisztítási lépés sikeres kivitelezésében. 20% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oldatnál mind a négy, fent említett enzimaktivitás megkötődött az oszlopon, így ezek elválasztását nem lehetett elérni. 10% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alkalmazása viszont eltérő változásokat indukált az elkülönítendő enzimek szerkezetében: míg a β -D-xilozidáz ilyen közegben is maradéktalanul kötődött a HIC oszlophoz, addig a β -D-galaktozidáz aktivitás több, mint 95%-a, a β -D-glükózidáz aktivitásnak pedig mintegy 85 %-a eluálódott az oszlopról (2. táblázat). Ebben a lépésben egyúttal a kiindulási enzimkivonat színyanyagait is sikerült eltávolítani. Ezeknek köszönhetően, a HIC 2. fázisában 10→0% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó 20 mM acetát pufferrel végzett grádiens elúció révén már sokkal tisztább formában nyerhettük vissza enzimünket (9. ábra). Ily módon a hidrofób kromatográfia a β -xilozidáznak mintegy 30-szoros tisztulását eredményezte igen jó (86,6%-os) hozammal.

2) A tisztítási folyamat következő lépése a *kromatofókusztálás* volt. Ennek során PBE 94 töltetű oszlopon, 6,25→3,5 pH grádiens elúcióval az eltérő izoelektromos pontú fehérjéket különítettük el egymástól. Ezen eljárással további, számunkra felesleges komponenseket, többek között a maradék β -D-glükózidáz aktivitást is, sikerült eltávolítanunk az enzimkivonatból (10. ábra). Ez a módszer egyúttal lehetőséget teremtett a β -D-xilozidáz izoelektromos pontjának meghatározására (pH 4,4).



9. ábra

A. carbonarius β-D-xilozidázának frakcionálása Phenyl-Sepharose CL-4B oszlopon

A nyíl az eluens váltást jelzi. Az extraktumban előforduló sötét színanyagok erős UV abszorbanciája miatt a fehérjetartalmat csak az eluens váltás után ábrázoltuk.

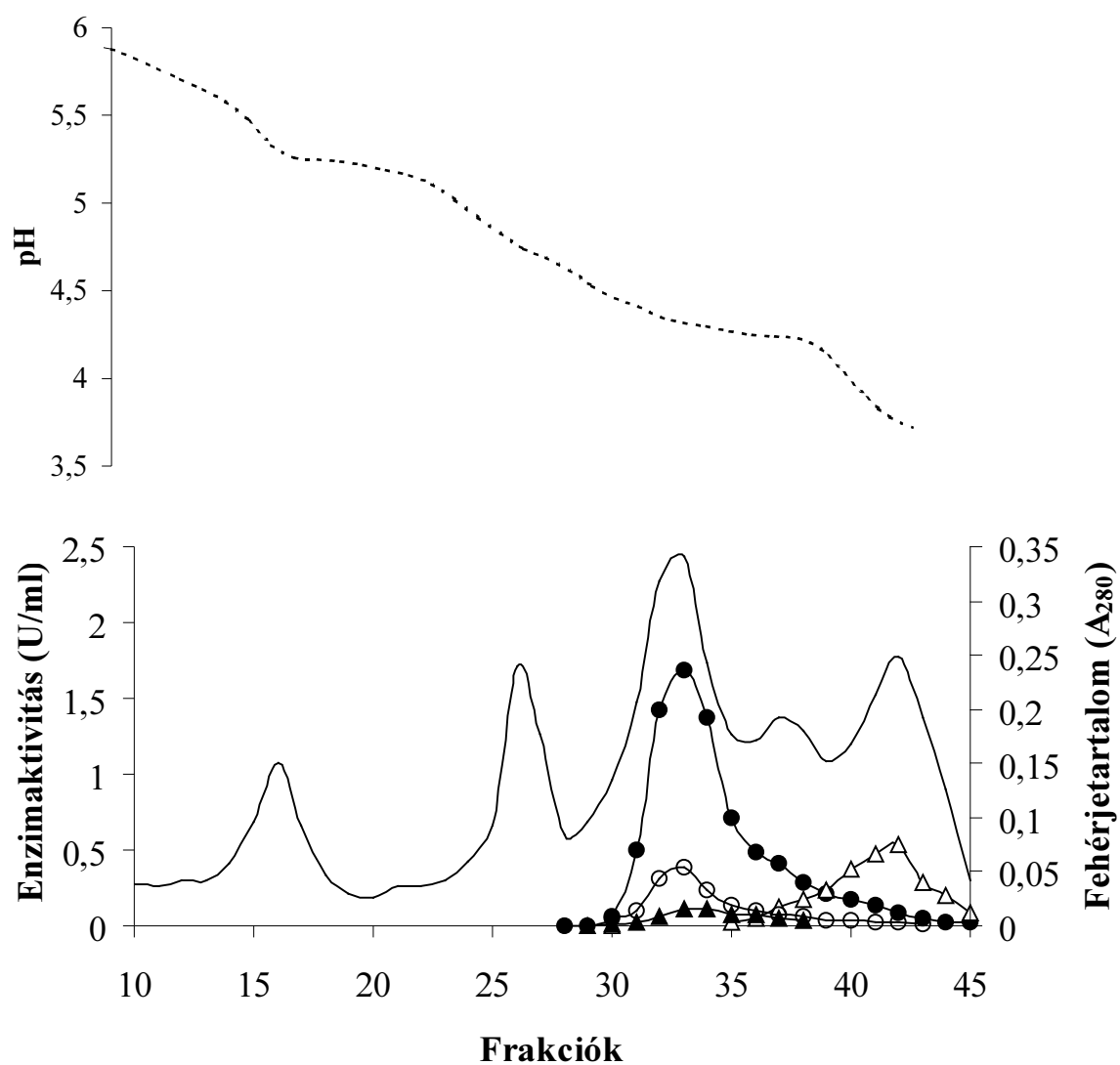
(●): β-D-xilozidáz aktivitás

(○): α-L-arabinozidáz aktivitás

(Δ): β-D-glükózidáz aktivitás

(▲): β-D-galaktozidáz aktivitás

— : A₂₈₀



10. ábra

A. carbonarius β -D-xilozidázának kromatofókuszálása

(●): β -D-xilozidáz aktivitás

(○): α -L-arabinozidáz aktivitás

(Δ): β -D-glükózidáz aktivitás

(▲): β -D-galaktozidáz aktivitás

— : A₂₈₀

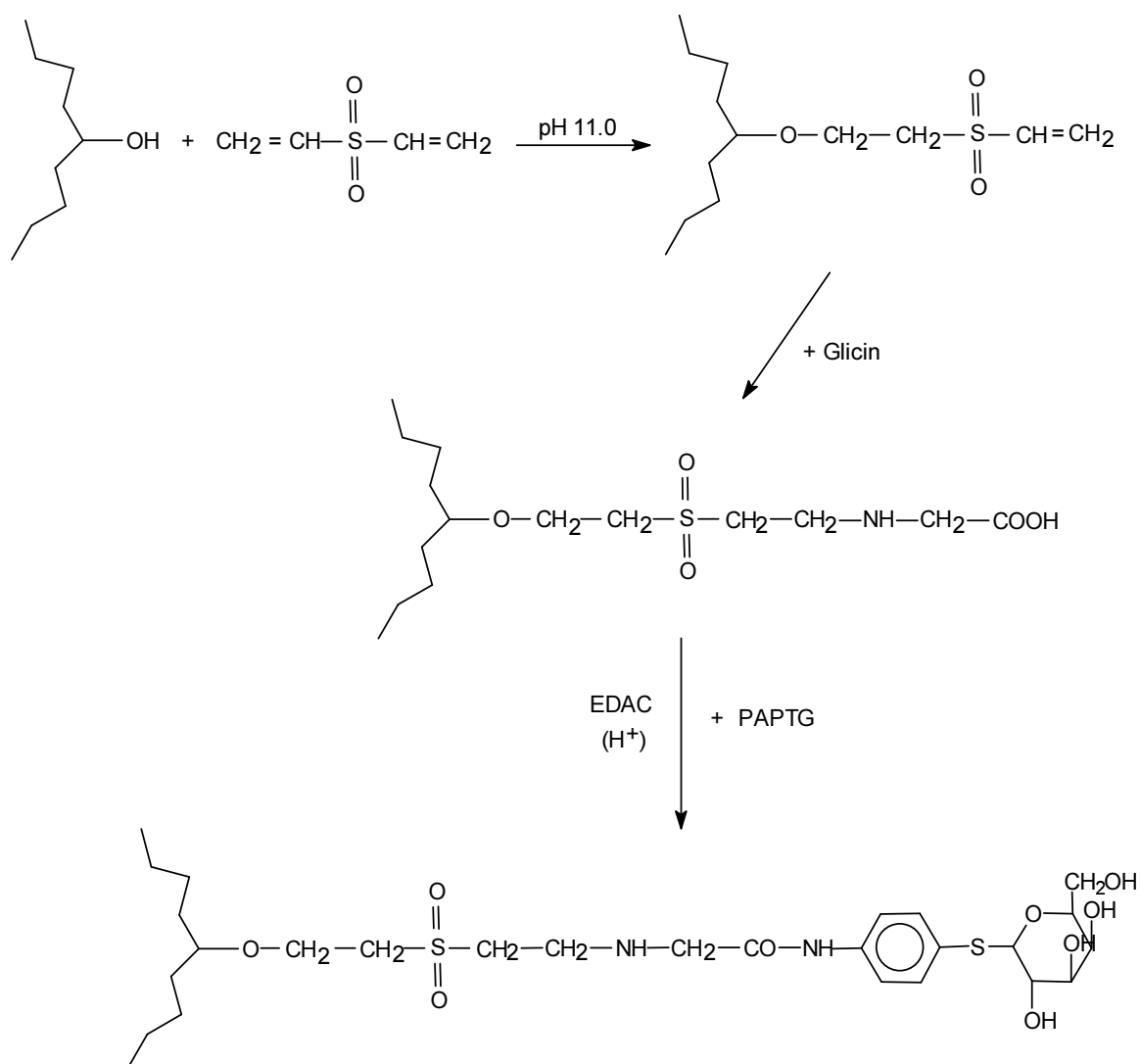
----: pH

3) A β -D-xilozidáz és a β -D-galaktozidáz izoelektromos pontjának nagyfokú hasonlósága miatt a kromatofókuszálás után kimutatható volt még β -D-galaktozidáz jelenléte az enzimkivonatban. Ennek eltávolításához az *affinitás kromatográfia* módszerét használtuk. Inhibíciós vizsgálatok révén sikerült egy szelektíven ható inhibitorral találkozni, a *p*-aminofenil 1-tio- β -D-galaktopiranozidot (PAPTG), amely hatékonyan, kompetitíven gátolta a β -D-galaktozidáz aktivitást (K_i 1,2 mM), ugyanakkor hatástalannak bizonyult β -D-xilozidázzal szemben. Ezen inhibitor egy hatékony liganddal szemben támasztott minden követelménynek megfelelt:

- képes volt stabil, de reverzibilis kapcsolatot kialakítani a szelektálandó vegyülettel
- megfelelő szelektivitást mutatott
- megfelelő méretű volt ahhoz, hogy kiemelkedjen a mátrixból, s ezáltal hozzáférhető legyen az enzim számára
- rendelkezett olyan csoporttal ($-NH_2$), amely révén stabil, kovalens kötéssel rögzíthető volt az oszlop mátrixához.

Ezek alapján PAPTG-ot alkalmazva ligandként affinitás kromatográfias oszlopot készítettünk, amelyen a β -D-galaktozidáz megkötődött, a β -D-xilozidázt viszont könnyen eluálhattuk róla. Felvetődhet a kérdés, hogy vajon miért nem a β -D-xilozidázt koncentráltuk az oszlopon. Elsőlegesen ilyen jellegű törekvéseink voltak, de a β -D-xilozidáz esetében a *p*-aminofenil 1-tio- β -D-xilopiranozid (PAPTXyl) nem gátolta megfelelő mértékben az enzimet (K_i 27 mM) és a későbbi inhibíciós vizsgálatok során sem találtunk a fent említett valamennyi elvárásnak megfelelő vegyületet. Az affinitási oszlopot Scouten (1981) munkája nyomán készítettük. Mátrixnak divinil-szulfonnal aktivált Sepharose 4B gélt használtunk, amelyhez glicin kapcsolókaron keresztül 90 %-os hatékonysággal (Robinson és munkatársai, 1972) kötöttük a PAPTG ligandot (11. ábra). Az affinitás kromatográfia révén a β -D-galaktozidázt is sikerült teljes mértékben eltávolítanunk az enzimkivonatból (2. táblázat).

A fentiekben vázolt 3 lépéses tisztítási folyamat eredményeképpen sikerült *A. carbonarius* extraktumából homogén, tiszta β -D-xilozidázt nyernünk. A folyamat jó hozammal (48,5%-os) a β -D-xilozidáz specifikus aktivitásának 61-szeres növekedését eredményezte (3. táblázat). Az enzim tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) révén ellenőriztük (12. ábra). A tisztítás folyamán a β -D-xilozidáz aktivitást sikerült teljes mértékben elkülöníteni mind a β -D-glükózidáz, mind a β -D-galaktozidáz aktivitásoktól, az α -L-arabinozidáz aktivitás azonban az összes lépésben végigkísérte (2. táblázat).



11. ábra

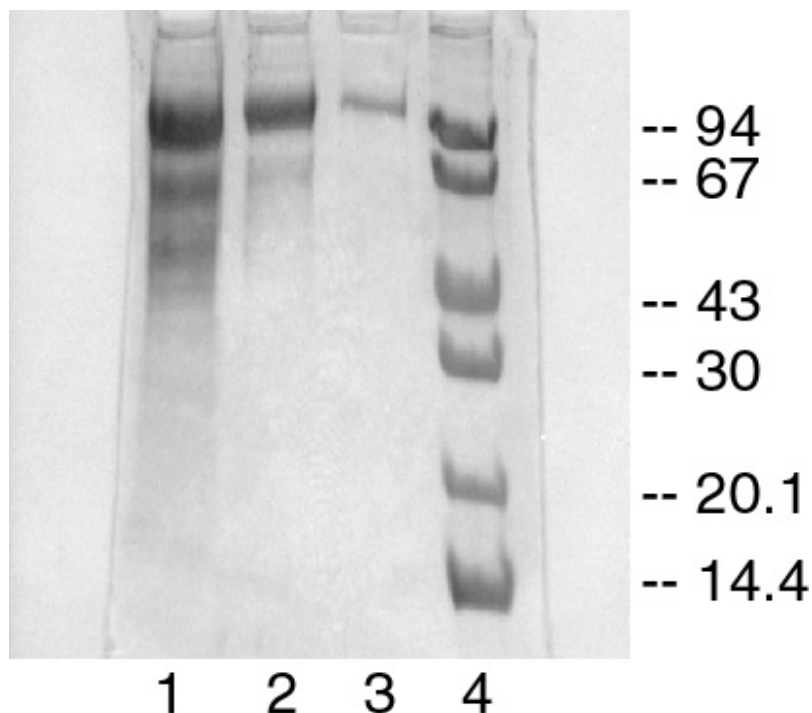
Affinitási oszlop készítésének folyamatábrája (Scouten nyomán 1981)

Mivel a tisztított enzim SDS-PAGE-nál egyetlen, homogén fehérjesávként jelent meg (12. ábra), így feltételeztük, hogy a β -D-xilozidáz és az α -L-arabinozidáz aktivitás egyetlen enzimhez tartozik. Ezen feltételezésünket a későbbiekben kevert szubsztrátos méréseink is igazolták (3.4. fejezet). Hasonló, alacsony α -L-arabinopiranozidáz aktivitást is mutató β -xilozidázról számoltak be *Penicillium wortmanni* (Deleyn és munkatársai 1978) esetében is.

3. táblázat***A. carbonarius* –ből izolált β -D-xilozidáz tisztítási folyamata**

Tisztítási lépés	Teljes fehérje- tartalom (mg)	Teljes enzim- aktivitás (U)	Specifikus aktivitás (U/mg)	Tisztulás mértéke	Hozam[*] (%)
Nyers extraktum	568	30,5	0,054	1,0	100
HIC (Phenyl-Sepharose CL-4B)	16,7	26,4	1,58	29,3	86,6
Kromatofókuszálás (PBE 94)	5,6	17,0	3,04	56,3	55,7
Affinitás kromatográfia	4,5	14,8	3,29	60,9	48,5

^{*}A hozamot a teljes enzimaktivitás alapján számoltuk.



12. ábra

A. carbonarius β -D-xilozidázának tisztítási folyamatát jellemző SDS-PAGE kép

Az 1→3 minták az egymást követő tisztítási lépésekből származó preparátumok: 1: HIC utáni minta, 2: kromatofókuszálás utáni minta, 3: affinitás kromatográfia utáni minta.

4: molekulatömeg standard sorozat: foszforiláz b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), szénsavanhidráz (30 kDa), szójabab tripszin inhibitor (20,1 kDa) és α -laktalbumin (14,4 kDa).

3.3. *A. carbonarius* β -D-xilozidázának biokémiai jellemzése

Az SDS-PAGE az enzim tisztaságának ellenőrzése mellett molekulatömegének meghatározását is szolgálta, amely ilyen módon 100 kDa-nak adódott (12. ábra). Ez jó egyezést mutatott a tisztított, natív enzim MALDI TOF MS technikával meghatározott tömegével (108 kDa). Hasonló molekulatömegű β -D-xilozidázokat izoláltak *Penicillium wortmanni*-ből (100 kDa) (Deleyn és munkatársai 1978), *Trichoderma koningii* G-39-ből (104 kDa) (Li és munkatársai 2000) és *Aspergillus niger*-ből is (110 kDa) (van Peij és munkatársai 1997).

Mivel az SDS-PAGE denaturáló körülményei között a tisztított enzim egyetlen egységes sávként jelent meg, így feltételeztük, hogy az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza monomer vagy két, esetleg több azonos molekulatömegű alegységből felépülő fehérje. A natív enzim MALDI TOF MS technikával történő vizsgálata azonban egyértelműen kizárta az utóbbi lehetőséget.

Az enzim kromatofókuszálással meghatározott izoelektromos pontja 4,4-nek adódott, tehát az *A. carbonarius*-ból izolált β -D-xilozidáz savas karakterű fehérje. Hasonló izoelektromos pont értékekről számoltak be *Trichoderma viride*-ből (4,4) (Matsuo és Yashui 1984), *Neocallimastix frontalis*-ből (4,5) (Garcia-Campayo és Wood 1992) és *A. oryzae*-ből (4,1) (Golubev és munkatársai 1993) izolált β -xilozidázok esetében is.

Vizsgáltuk a pH-nak és a hőmérsékletnek a β -D-xilozidáz aktivitására és stabilitására gyakorolt hatását. 1) Az enzim viszonylag széles pH tartományban (pH: 3,0–4,0) mutatott maximális aktivitást és 3,5–6,5 közötti pH tartományban bizonyult stabilnak. Ezek az értékek jó egyezést mutatnak más fungális β -xilozidázokra közölt adatokkal (Takenishi és munkatársai 1973, Deleyn és munkatársai 1978, Poutanen és Puls 1988, Herrmann és munkatársai 1997). Általában helytálló azon megállapítás, miszerint, a bakteriális β -D-xilozidázok pH optimuma pH 7,0-hez közeli érték, míg gombából izolált enzimeknél ez sokkal savasabb tartományba esik ($< \text{pH } 5,0$) (Bravman és munkatársai 2001b, Poutanen és Puls 1988). 2) A hőmérsékletnek az enzim aktivitására gyakorolt hatását 20–80 °C közötti tartományban vizsgáltuk. Az enzim 60 °C-on hidrolizálta leghatékonyabban a szubsztrátként alkalmazott *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranozidot (*p*NP-Xyl). A hőmérséklet stabilitási vizsgálatok alapján az enzim 30 perces inkubáció után 50 °C-ig stabilnak bizonyult, 60 °C-on azonban már maximális aktivitásának 25%-át elvesztette. 60 °C felett igen gyorsan csökkent aktivitása, 70 °C-on történő inkubáció pedig az enzim teljes inaktiválódásához vezetett. Ugyanakkor 37 °C-on az enzim több napon keresztül is stabil volt. Hasonló, magas hőmérsékleti optimummal rendelkező β -xilozidázokról számoltak be *Trichoderma reesei* (60 °C) (Poutanen és Puls 1988, Herrmann és munkatársai 1997) és *T. koningii* G-39 (55–60 °C) esetében is (Li és munkatársai 2000).

3.4. Enzimkinetikai vizsgálatok

3.4.1. Kinetikai paraméterek meghatározása

A kinetikai vizsgálatok során elsőként a tisztított β -xilozidáz által katalizált reakciók jellemző kinetikai paramétereit határoztuk meg nem-lineáris regresszió révén. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaltam össze. Az enzim *p*NP-Xyl iránti affinitását jellemző K_m érték 0,198 mM volt, amelyhez hasonló értéket közöltek *A. niger* β -xilozidáza esetén is (0,23 mM) (Rodionova és munkatársai 1983). A 4. táblázat értékeit összehasonlítva jól látható, hogy a *p*NP-Xyl szubsztrát sokkal jobban kötődik az enzimhez (K_m értéke több mint egy nagyságrenddel kisebb), mint a *p*-nitrofenil- α -L-arabinopiranozid (*p*NP-Ara) és az enzim sokkal hatékonyabban is hidrolizálja, mint az utóbbi szubsztrátot (V_{max}/K_m értékek alapján). Ugyanakkor az arabinozid szubsztrátnál az enzimreakció maximális sebessége (V_{max}) nagyobb, mint a xilozidnál. Ezek az adatok arra mutatnak rá, hogy a β -D-xilozidáz működését jelentős mértékben befolyásolhatja a cukorgyűrű C-4 helyzetű hidroxilcsoportjának térállása. Amennyiben ez ekvatoriális térállású, az a szubsztrát megkötésének kedvez, az axiális térállás viszont a hasításnál lehet előnyösebb.

4. táblázat

A. carbonarius-ból izolált β -D-xilozidáz kinetikai paraméterei*

Szubsztrát	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m (U $\times$ mg ⁻¹ $\times$ mM ⁻¹)
<i>p</i> NP-Xyl	0,198 $\pm$ 0,002	3,64 $\pm$ 0,01	18,4 $\pm$ 0,19
<i>p</i> NP-Ara	5,5 $\pm$ 0,64	6,3 $\pm$ 0,26	1,2 $\pm$ 0,14

* A táblázatban feltüntetett kinetikai paraméterek 3 független mérés adataiból számolt középértékek és azok szórása (S. D.).

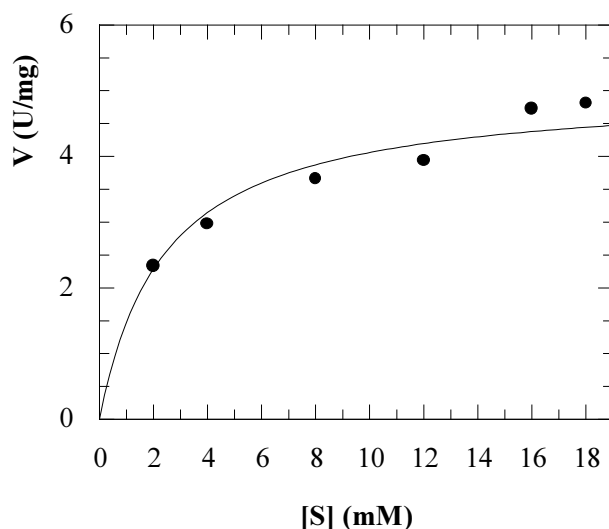
Figyelemreméltó, hogy a tisztított enzim β -D-xilozidáz aktivitása mellett α -L-arabinozidáz aktivitást is mutatott, viszont a szerkezetükben igen hasonló *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid (*p*NP-Glc) és *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (*p*NP-Gal) szubsztrátok glikozidos kötését nem tudta hasítani. Ez azt jelzi, hogy a cukorgyűrű C-5 helyzetű CH₂OH-csoportjának hiánya esszenciális a szubsztrát hidrolíziséhez. Valószínűleg ennek a csoportnak a jelenléte szterikus gátat jelent a szubsztrát kötődése során.

3.4.2. Kevert szubsztrátos vizsgálatok

Mint ahogy az enzimtisztításnál már szó esett róla, a tisztított enzim egységes SDS-PAGE képe alapján feltételeztük, hogy mind a β -D-xilozidáz, mind az α -L-arabinozidáz aktivitás ugyanazon enzimhez tartozik. Ezt a feltételezésünket igazolták a kevert szubsztrátos mérések is, amelyek révén tulajdonképpen arra kaphatunk választ, hogy a megfelelő szintetikus szubsztrátok hidrolízise egyetlen katalitikus helyhez köthető-e vagy sem. Ezen vizsgálatok során a kétféle szubsztrát egyidejű alkalmazásával, adott szubsztrát koncentrációknál reakciósebességeket határoztunk meg mind elméleti úton, mind kísérletek révén. Az egyetlen katalitikus helyet feltételező elméleti görbe értékeit Pócsi és Kiss nyomán (1988) az (1) egyenlet felhasználásával, a 4. táblázatban megadott kinetikai paraméterekből számoltuk:

$$v = \frac{V_{\max 1} K_{m 2} [S_1] + V_{\max 2} K_{m 1} [S_2]}{K_{m 1} K_{m 2} + K_{m 1} [S_2] + K_{m 2} [S_1]} \quad (1)$$

ahol $[S_1]$ és $[S_2]$ az alkalmazott *p*NP-Xyl és *p*NP-Ara koncentrációk.



13. ábra

Kevert szubsztrátos vizsgálatok *p*NP-Xyl és *p*NP-Ara szubsztrátokkal

A kísérletek során a *p*NP-Ara koncentrációt 2 és 18 mM ($0,5$ - $3 K_m$) között változtattuk állandó, 0,2 mM (K_m) koncentrációjú *p*NP-Xyl jelenlétében. A folytonos vonal a szubsztrátok közötti kompetíciót feltételező elméleti görbét mutatja, (•): kísérleti adatok. Valamennyi értéket 3 független mérés átlagaként adtuk meg.

Ahogy a 13. ábrán is látható, az elméleti úton számított és a kísérletek során mért reakciósebesség értékek igen jó egyezést mutatnak, ami egyértelműen bizonyítja, hogy a *p*NP-Xyl és *p*NP-Ara szubsztrátok hasítása az enzim ugyanazon katalitikus centrumában történik. Ezt a megállapítást inhibíciós vizsgálatok is megerősítették. Ezek során valamennyi vizsgált inhibitor (5. táblázat) kompetitív módon gátolta mind a β -D-xilozidáz, mind az α -L-arabinozidáz aktivitást, amely egyben azt is jelezte, hogy nemcsak a hasítóhely, hanem a kötőhely is azonos az adott szubsztrátok számára.

5. táblázat

A. carbonarius β -D-xilozidáz és α -L-arabinozidáz aktivitására vonatkozó inhibíciós vizsgálatok

Inhibitor	β -D-xilozidáz aktivitás		α -L-arabinozidáz aktivitás	
	K_i (mM)	Inhibíció típusa	K_i (mM)	Inhibíció típusa
D-xilóz	1,9	kompetitív	2,4	kompetitív
5-tioxilóz	0,99	kompetitív	2,3	kompetitív
β -D-xilopiranozil azid	0,35	kompetitív	0,54	kompetitív

Hasonló jellegű, kevert szubsztrátos kinetikai vizsgálatokat α -L-arabinopiranozidáz aktivitást is mutató β -xilozidázok esetében még nem végeztek. β -D-Xilozidáz és β -D-glükózidáz aktivitással is rendelkező, *Chaetomium trilaterale*-ből izolált enzimmél, kevert szubsztrátos mérésekkel, szintén egyetlen katalitikus hely jelenlétét mutatták ki. Az inhibíciós vizsgálatok alapján azonban ebben az esetben két elkülönülő kötőhely létezését valószínűsítik (Uziie és munkatársai 1985).

3.5. Kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata

A katalitikus csoportok felderítésére irányuló vizsgálataink során elsőként az *A. carbonarius*-ból izolált β -D-xilozidáz kinetikai paramétereinek pH függését tanulmányoztuk. A $V_{\max}$ pH függéséből a katalízisben résztvevő ionizálható aminosav-oldalláncokra lehet következtetni, míg a $V_{\max}/K_m$ pH függése a szubsztrát megkötésében, az ES komplex kialakításában szerepet játszó aminosav-oldalláncokra utal.

Vizsgáltuk különböző pH értékeknél (pH 2,0-7,0) a β -xilozidáz által katalizált *p*NP-Xyl hidrolízisét és meghatároztuk az egyes folyamatokat jellemző $V_{\max}$ és $V_{\max}/K_m$ értékeket (14A. és 14B. ábra). Az ábrákon látható elméleti görbéket a kísérleti úton meghatározott $V_{\max}$ és $V_{\max}/K_m$ értékek alapján, diprotikus enzim-modell alkalmazásával, nem-lineáris

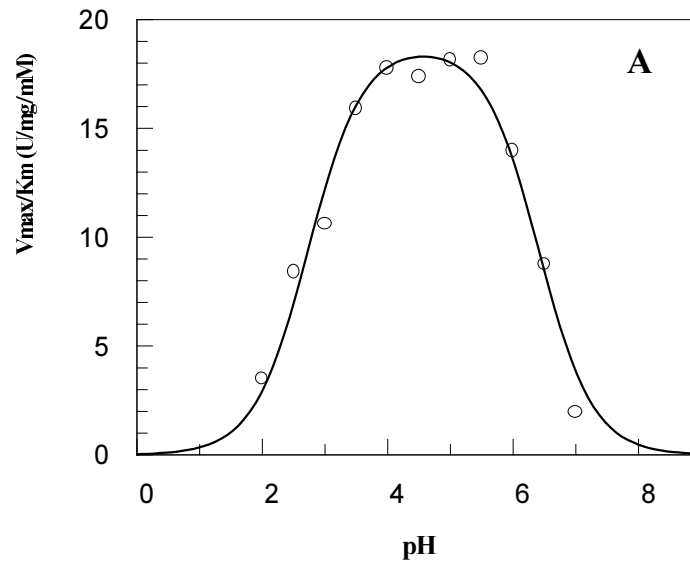
illesztőprogram (GraFit) segítségével adtuk meg. Ezek alapjául a (2) és a (3) egyenletek szolgáltak (Cornish-Bowden 1995a):

$$V_{\max} = \frac{\tilde{V}_{\max}}{1 + ([H^+] / K_{ES1}) + (K_{ES2} / [H^+])} \quad (2)$$

$$V_{\max} / K_m = \frac{\tilde{V}_{\max} / \tilde{K}_m}{1 + ([H^+] / K_{E1}) + (K_{E2} / [H^+])} \quad (3)$$

ahol $\tilde{V}_{\max}$ és $\tilde{V}_{\max} / \tilde{K}_m$ a pH-tól független kinetikai paraméterek, K_{ES1} és K_{ES2} a katalízisben résztvevő aminosav-oldalláncok savi disszociációs állandóit jelölik az ES komplexben, míg K_{E1} és K_{E2} a szabad enzim esetében.

Az enzim hatékonyságát jellemző $V_{\max}/K_m$ állandó pH függését *pNP-Xyl* hidrolízisének a 14A. ábra mutatja. A kísérleti adatok igen jó egyezést mutatnak az elméleti úton meghatározott haranggörbével, amely azt jelzi, hogy a Peller-Alberti-féle diprotikus enzim-modellnek megfelelően 2 ionizálható aminosav-oldallánc vesz részt az ES komplex kialakításában (Peller és Alberty 1959). Ezek közül az egyiknek ionizálnak, a másiknak protonálnak kell lennie a hatékony katalízis érdekében (Cornish-Bowden 1995a). A legjobban illeszkedő haranggörbét $pK_{E1} = 2,7$ és $pK_{E2} = 6,4$ esetében kaptunk (14A. ábra).



14A. ábra

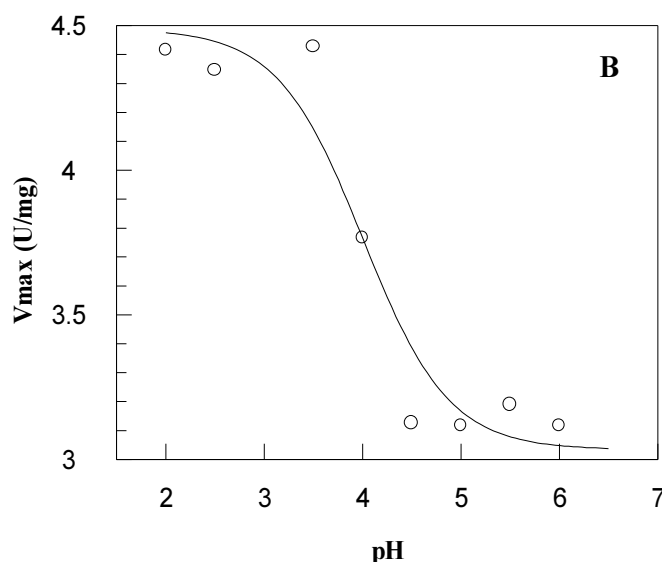
$V_{\max}/K_m$ pH függése *pNP-Xyl* hidrolízisének

(o): kísérleti adatok

—: elméleti görbe, amelyet kísérleti adatokból a (3) egyenlet alapján nem-lineáris illesztőprogrammal határoztunk meg

Kísérleti adatainkat egybevetve a szakirodalomból ismert aminosav-oldalláncok disszociációs állandóival arra a következtetésre jutottunk, hogy a β -D-xilozidáz aktív centrumában, a *p*NP-Xyl megkötésében ionizált oldalláncként egy karboxilát anion, protonáltként pedig egy másik karboxilcsoport vagy esetleg egy hisztidin (His) oldallánc vehet részt.

A *p*NP-Xyl hidrolízisére jellemző $V_{\max}$ pH függése a 14B. ábrán látható. Ebben az esetben csak a $pK_{ES1} = 4,0$ állandót tudtuk meghatározni, mivel a $V_{\max}$ pH 5,0 felett már nem függött a $[H^+]$ -tól. Ez arra utalt, hogy a szubsztrát hidrolízisében egy protonált aminosav-oldallánc fontos szerepet játszik, s ennek deprotonálódása az enzim működése szempontjából kedvezőtlen. A fenti pK_{ES1} érték alapján feltételeztük, hogy ez egy glutaminsav (Glu) vagy egy aszparaginsav (Asp) oldallánc lehet.



14B. ábra

$V_{\max}$ pH függése *p*NP-Xyl hidrolízisének

(o): kísérleti adatok

—: elméleti görbe, amelyet kísérleti adatokból a (2) egyenlet alapján nem-lineáris illesztőprogrammal határoztunk meg

A kinetikai paraméterek pH függéséből származó eredmények tehát arra utaltak, hogy a *p*NP-Xyl megkötésében egy deprotonált és egy protonált aminosav-oldallánc vesz részt, amelyek közül az egyik feltehetően egy karboxilát, a másik pedig egy karboxil maradék (vagy utóbbi esetleg egy His imidazolil csoportja), a szubsztrát glikozidos kötésének hasításában pedig egy ionizálható oldallánc – igen nagy valószínűséggel egy Glu vagy Asp karboxil oldallánc – közreműködése elengedhetetlen. Hasonló kinetikai vizsgálatokat végeztek a

közelmúltban Gómez és munkatársai (2001) *Trichoderma reesei* QM 9414 β -xilozidázával. Nevezett kutatók arra a megállapításra jutottak, hogy az általuk vizsgált enzim aktív centrumában 2 karboxilcsoport vesz részt a pNP-Xyl hidrolízisében (mind a szubsztrát megkötésében, mind annak hasításában), amelyek közül az egyiknek deprotonált (pK_{E1} 3,20, ill. pK_{ES1} 2,40), a másiknak protonált állapota (pK_{E2} 5,26, ill. pK_{ES2} 6,26) szükséges a katalízishez.

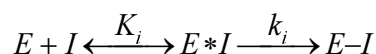
3.6. Karboxil oldalláncok kémiai módosítása

Annak eldöntésére, hogy a fent említett esszenciális ionizálható csoportok valóban karboxil oldalláncok-e, enzimünket oldallánc specifikus reagensek alkalmazásával, kémiaileg módosítottuk. Vizsgálatainkhoz vízoldható 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimidet (EDAC) nukleofilként pedig glicin-metil-észtert, és Woodward K reagenst (WRK) használtunk (Lundblad és Noyes 1985).

Mind a glicin-metil-észter jelenlétében alkalmazott EDAC, mind a WRK inaktíválta a β -D-xilozidázt. Az EDAC esetében a módosulás gyorsabban játszódott le: 3 mM reagens 0,25 mM glicin-metil-észterrel együtt már 10 perc inkubáció után az eredeti β -D-xilozidáz aktivitást az egy harmadára csökkentette. WRK alkalmazásánál az inaktiváció lassabban ment végbe, de 50 mM reagenssel, 50 °C-on történő inkubáció révén 40 perc elteltével a katalitikus aktivitás ebben az esetben is több, mint 90%-kal csökkent. Figyelemreméltó volt a WRK-s módosítás hőmérséklet függése, amelyről eddig még nem számoltak be. Míg 50 °C-on gyors inaktiváció játszódott le, 37 °C-on ugyanolyan körülmények között végzett inkubáció 6 óra után is csak 50 %-os módosulást eredményezett, 25 °C-on pedig szinte egyáltalán nem inaktiválódott az enzim. Hasonló eredményekkel szolgáltak a későbbiekben, N-brómacetil- β -D-xilopiranozilaminnal végzett inaktivációs vizsgálataink is (3.7. fejezet). Feltételezzük, hogy a hőmérséklet növelése elősegíti az enzim működése szempontjából optimális fehérjekonformáció kialakulását, s ezáltal az ES komplex, ill. esetünkben az enzim-inaktivátor komplex képződését, ami a fenti megfigyelések magyarázatául szolgálhat. Ezt a feltevést alátámasztja az a tény is, hogy az enzim hőmérsékleti optimuma 60 °C.

A módosítási reakciók kinetikai analízise során különböző inaktivátor koncentrációkat alkalmazva figyeltük az enzimaktivitás változását az idő függvényében. Mind az EDAC, mind a WRK esetében a maradék aktivitás természetes alapú logaritmusait az idő függvényében ábrázolva egyeneseket kaptunk (15A és 16A ábra), amelyek arra utaltak, hogy az inaktiváció minden esetben látszólagos elsőrendű (pszeudo-elsőrendű) kinetika szerint

ment végbe. A reagens valószínűleg reverzibilisen kötődik az enzimhez egy átmeneti jellegű enzim-inaktivátor komplexet képezve, mielőtt végbe megy a kovalens módosítás, ahogy erről már más enzimek esetében is beszámoltak (Pétra 1971, Komissarov és munkatársai 1995):



ahol E a β -D-xilozidáz, I az adott inaktivátor (pl. WRK), $E * I$ az enzim inaktivátorral képzett komplexe, $E - I$ a módosított enzim, K_i a látszólagos inhibíciós állandó, k_i pedig az inaktivációs sebességi állandó.

A módosítási reakciók látszólagos sebességi állandóit (k_{app}) Kitz és Wilson módszere (1962) szerint, a (4) egyenlet alapján, a 15A és 16A ábrán látható egyenesek meredekségéből határoztuk meg.

$$\ln \frac{V_0}{V} = \frac{k_i \cdot t}{1 + K_i/[I]} = k_{app} \cdot t \quad (4)$$

ahol V_0 a kezdeti sebességet, V a t időpontban mért sebességet, $[I]$ pedig az inaktivátor koncentrációját jelöli.

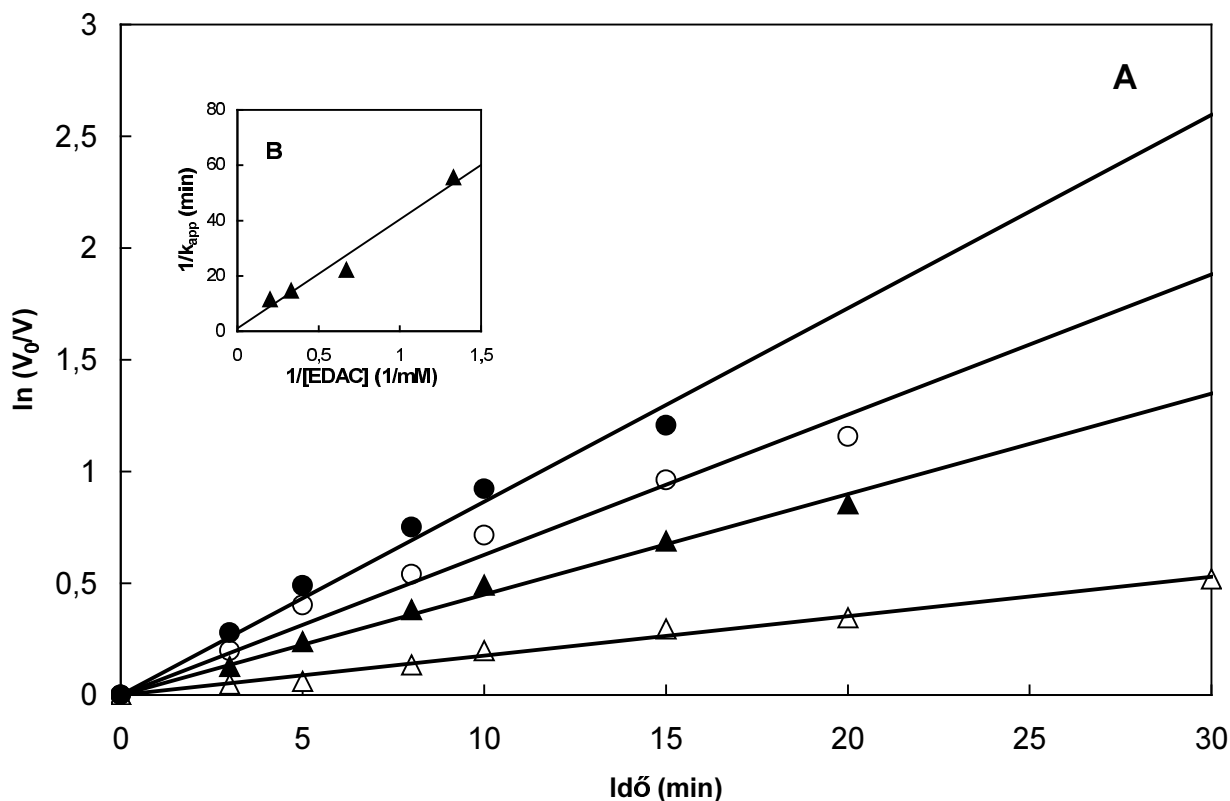
Az k_{app} értékek révén egyben lehetőség nyílt az inaktivációs folyamatokat jellemző többi kinetikai paraméter (K_i , k_i és k_i/K_i) meghatározására is (Kitz és Wilson 1962, Pétra 1971), hiszen k_{app} megadható, mint:

$$k_{app} = \frac{k_i \cdot [I]}{K_i + [I]}, \quad (5)$$

amelyből a k_{app} inaktivátor koncentrációtól függése kifejezhető:

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{K_i}{k_i} \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_i} \quad (6)$$

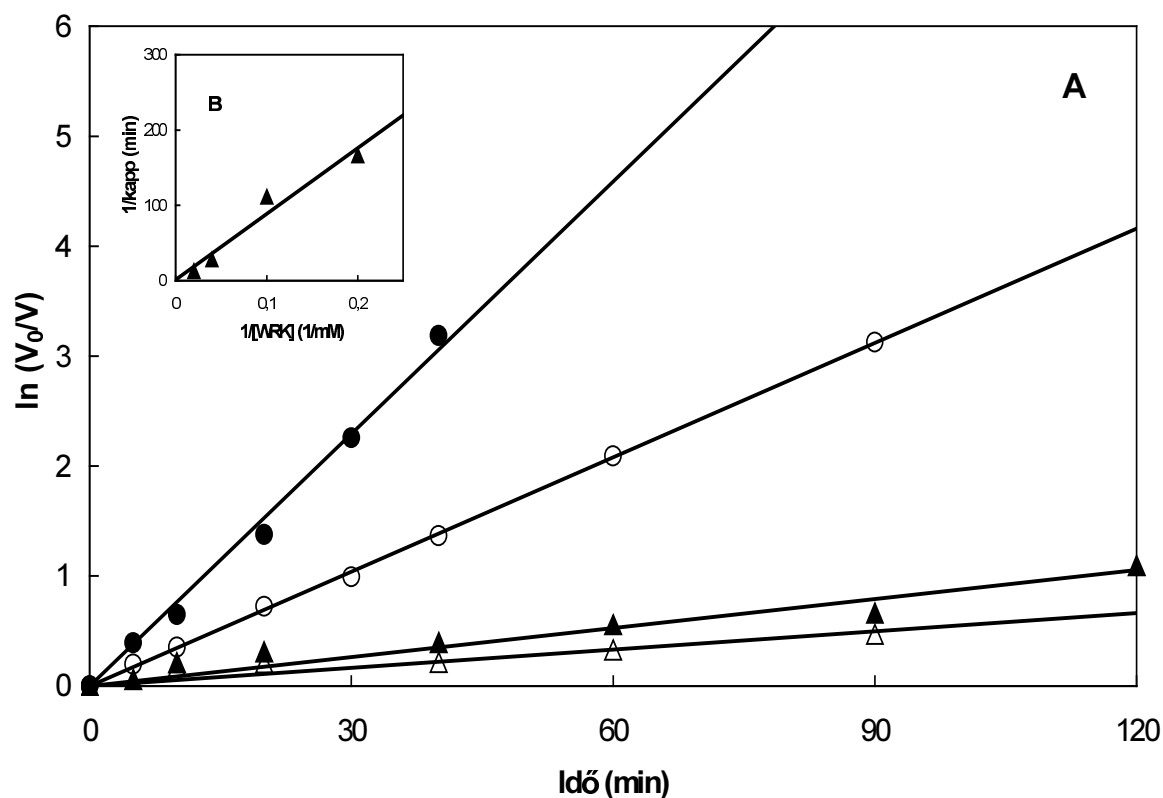
A (6) egyenlet alapján szerkesztett függvényeket a 15B és 16B ábrák mutatják, az általuk meghatározott kinetikai paramétereket pedig a 6. táblázatban adtam meg.



15. ábra

β -D-xilozidáz EDAC révén történő módosítása.

- (A) Az enzim (20 μ g/ml) módosításánál 0,25 mM glicin-metil-észter jelenlétében a következő EDAC koncentrációkat alkalmaztuk: 0,75 mM (Δ), 1,5 mM ($\blacktriangle$), 3 mM ($\circ$) és 5 mM ($\bullet$). A jelzett időpontokban mintákat vettünk a reakcióelegyből és meghatároztuk a maradék β -D-xilozidáz aktivitást (*p*NP-Xyl szubsztráttal, 20 mM Na-acetát pufferben (pH 4,0), 50 °C-on, 15 perces inkubációs időt alkalmazva).
- (B) A 15A ábra alapján számolt k_{app} értékek reciprokai az EDAC koncentrációk reciprokának függvényében.



16. ábra

β -D-xilozidáz Woodward K reagenssel történő módosítása.

- (A) Az enzim (20 $\mu\text{g/ml}$) módosításához a következő WRK koncentrációkat alkalmaztuk: 5 mM (Δ), 10 mM ($\blacktriangle$), 25 mM ($\circ$) és 50 mM ($\bullet$). A jelzett időpontokban mintákat vettünk a reakcióelegyből és meghatároztuk a maradék β -D-xilozidáz aktivitást.
- (B) A 16A ábra alapján számolt k_{app} értékek reciprokai a WRK koncentrációk reciprokának függvényében

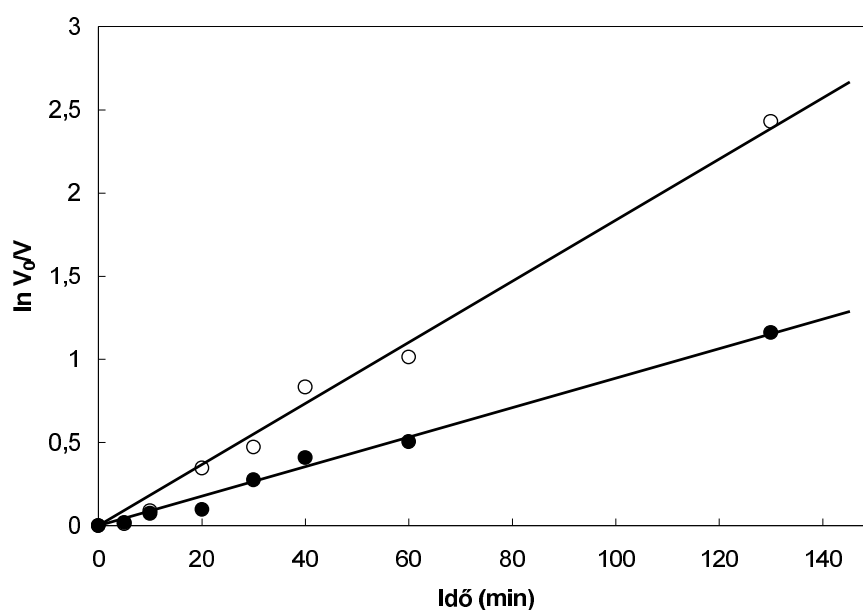
6. táblázat

A. carbonarius β -D-xilozidázának inaktivációs reakcióit jellemző kinetikai paraméterek

Inaktivátor	K_i (mM)	k_i (min^{-1})	k_i/K_i ($\text{min}^{-1}/\text{mM}$)
EDAC	23,3	0,60	$2,6 \times 10^{-2}$
WRK	677	0,78	$1,2 \times 10^{-3}$

A k_{app} értékek révén felvilágosítást nyertünk a reakció rendűségére vonatkozóan is: k_{app} értékek logaritmusát az inaktivátor koncentrációk logaritmusának függvényében ábrázolva egyeneseket kaptunk, amelyek meredeksége EDAC esetében 1,16, WRK-nál pedig 0,90 volt. Ezek az értékek jó egyezést mutattak a reakciók rendűségével (Cornish-Bowden 1995b), jelezvén, hogy a módosítás során egy enzim molekulával egy WRK ill. EDAC molekula reagált. Mindez arra utal, hogy az *A. carbonarius* β -D-xilozidázában legalább egy esszenciális karboxil oldalláncnak kell működnie.

Eddigi vizsgálataink bizonyították, hogy az enzimből valóban van legalább egy olyan karboxil oldallánc, amelynek működése elengedhetetlen a hatékony katalízishez. Annak eldöntésére, hogy ez az enzim aktív centrumában lokalizálódik-e, a β -D-xilozidáz egyik hatékony kompetitív inhibitorát, a β -D-xilopiranozil azidot (XylN₃, $K_i = 0,35$ mM) (ld. 3. 8. fejezet) használtuk. Mértük az inaktivációs folyamatok sebességét az inhibitor jelenlétében (2 mM XylN₃) és hiányában. WRK esetén az inaktiváció sebessége XylN₃ jelenlétében $1,84 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ -ről $8,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ -ra redukálódott, ahogy azt a 17. ábra is mutatja.



17. ábra

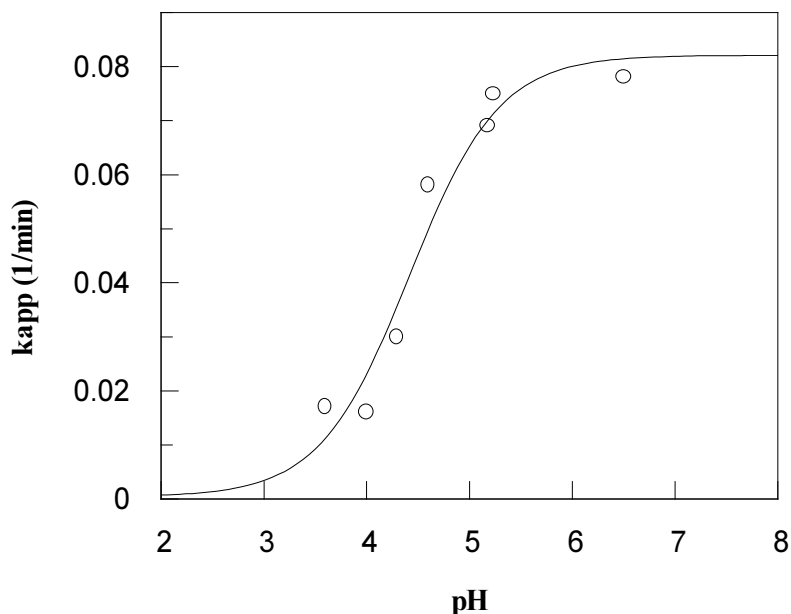
Kompetitív inhibitor nyújtotta védelem az enzim WRK-s módosításával szemben. Az enzimet (20 $\mu\text{g/ml}$) 20 mM WRK-val reagáltattuk, 50 °C-on, XylN₃ mint kompetitív inhibitor jelenlétében (2 mM) (●) és hiányában (○). A jelzett időpontokban a maradék β -D-xilozidáz aktivitást a 15. ábra magyarázatánál feltüntetett módon határoztuk meg.

A XylN_3 , kötődése révén tehát részleges védelmet nyújtott a β -D-xilozidáznak mind a WRK (20 mM), mind az EDAC (3 mM) okozta inaktivációval szemben, ami egyértelműen bizonyította, hogy a reagensek által módosított karboxil oldallánc az enzim aktív centrumában található.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a módosított karboxil oldallánc savi disszociációs állandóját, a karbodiimides módosítás sebességét különböző pH értékeknél határoztuk meg. A fentiekben ismertetett módon (Kitz és Wilson 1962) kiszámoltuk az egyes reakciókat jellemző látszólagos sebességi állandókat (k_{app}) és ábrázoltuk ezeket a pH függvényében (18. ábra). Az ábrán látható elméleti görbét a kísérleti k_{app} adatok felhasználásával, illesztőprogram segítségével (GraFit), a (7) egyenlet (Tipton és Dixon 1979) alapján határoztuk meg:

$$k_{app} = \frac{\tilde{k}_{app} x}{1 + [\text{H}^+] / K_A} \quad (7)$$

ahol x a reagens (EDAC) koncentrációja, K_A pedig a módosított csoport savi disszociációs állandója. Az elméleti görbe $K_A = 3,98 \times 10^{-5}$ értéknél illeszkedett a legjobban a kísérleti adatokhoz, vagyis a módosított oldallánc $\text{p}K_A$ értéke 4,4-nek adódott (18. ábra), amely hasonló volt a $V_{\max}$ pH-függésénél meghatározott $\text{p}K$ értékhez ($\text{p}K_{\text{ESI}} = 4,0$).



18. ábra

β -D-xilozidáz EDAC-os módosításának pH függése

Ezen vizsgálataink tehát azt mutatták, hogy az inaktivációs reakciókban egy olyan aminosav karboxil oldallánca módosult, amely pK_A értéke alapján jó eséllyel lehet Asp vagy Glu és – mint az korábban kiderült – az enzim aktív centrumában lokalizálódik. Figyelembevéve a $V_{\max}$ pH függésénél kapott hasonló pK értéket, feltételeztük, hogy az *A. carbonarius* β -D-xilozidázának aktív centrumában, egy a katalízisben szerepet játszó Glu vagy Asp karboxil oldallancát módosítottuk. Hasonló, katalitikus szereppel bíró Glu-ról számoltak be *Bacillus stearothermophilus* T-6 β -xilozidázánál, ahol a Glu-160-at mint katalitikus protondonort azonosították (Bravman és munkatársai 2001a), *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* β -D-xilozidáza esetében pedig katalitikus nukleofil szerepét betöltő Glu-277-ről publikáltak (Vocadlo és munkatársai 1998).

Vizsgáltuk, hogy a katalitikus karboxil oldallánc blokkolása hogyan befolyásolja a β -D-xilozidáz által katalizált reakció kinetikai paramétereit (K_m , $V_{\max}$). WRK-s módosítás során meghatározott időközönként vett mintákból meghatároztuk a *pNP*-Xyl hidrolízisét jellemző $V_{\max}$ és K_m értékeket. Az eredményeket a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat

Kinetikai paraméterek változása a β -D-xilozidáz WRK-val történő módosítása során

Reakció idő (min)	Módosított β -D-xilozidáz*	
	$V_{\max}$ (U/mg)	K_m (mM)
0	1,83	0,22
5	1,75	0,22
10	1,15	0,19
20	0,85	0,17
30	0,26	0,17
40	0,19	0,21

* A kontroll kísérletekben meghatározott $V_{\max}$ érték $1,82 \pm 0,21$ U/mg, a K_m pedig $0,24 \pm 0,03$ mM volt.

A módosított enzimnél szembevetve a $V_{\max}$ jelentős csökkenése, amely 40 perces inkubáció után a tizedére redukálódott. Ugyanakkor a K_m értéke gyakorlatilag nem változott az inaktiváció során, jelezvén, hogy az érintett katalitikus oldallánc módosítása nincs hatással az ES-komplex kialakulására. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyították, hogy a módosított karboxil oldallánc a szubsztrát hasításában és nem a kötésében játszik szerepet.

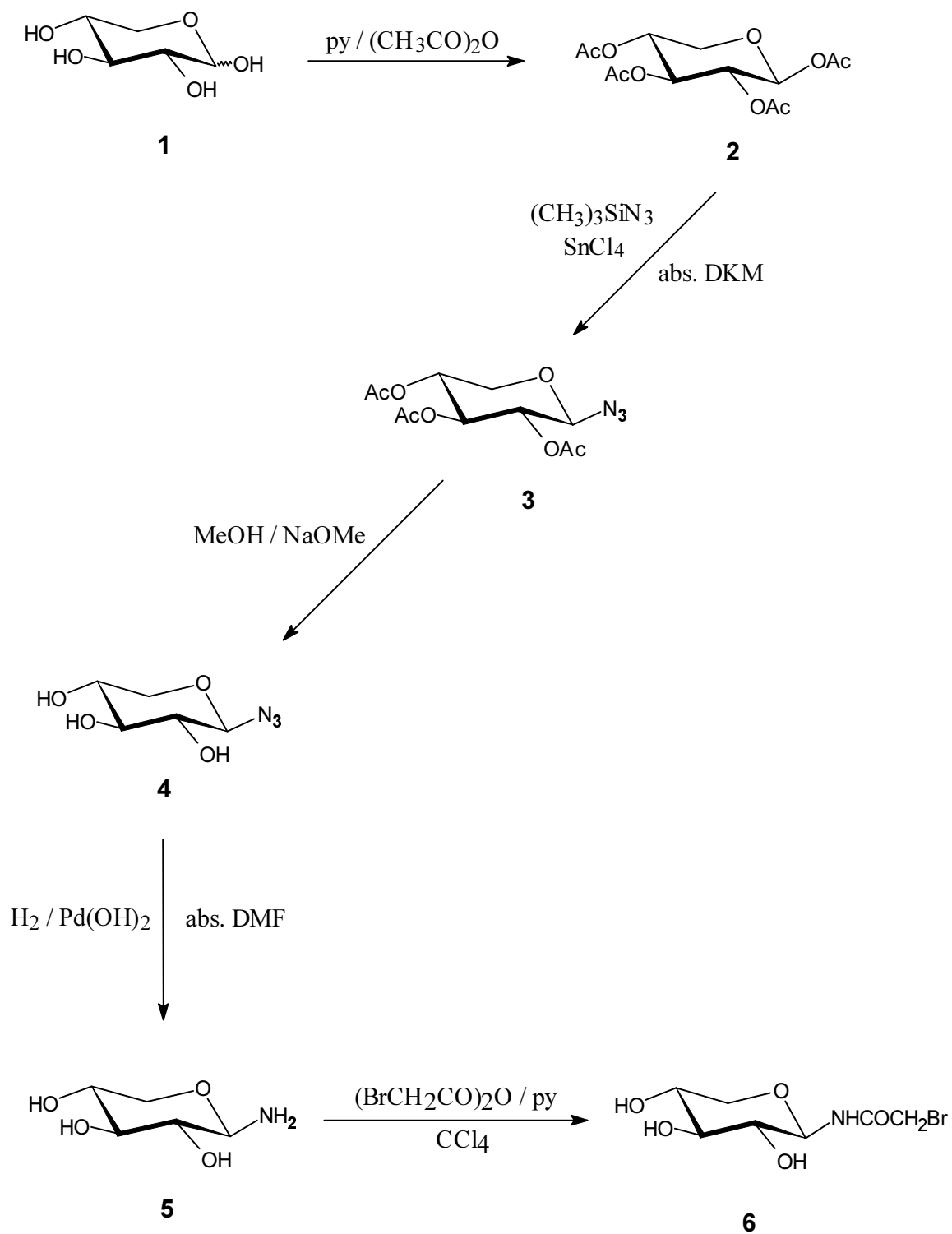
Összegezve a WRK és EDAC reagensekkel végzett inaktivációs kísérleteink eredményeit megállapíthatjuk, hogy az irodalmi adatokkal összhangban az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza tartalmaz olyan karboxil oldalláncokat, amelyek működése elengedhetetlen a hatékony katalízishez, ezek közül legalább egy – igen nagy valószínűséggel Glu vagy Asp – az enzim aktív centrumában található és feltehetően protondonorként esszenciális szerepet játszik a pNP-Xyl glikozidos kötésének hasításában.

3.7. N-brómacetil- β -D-xilopiranozilamin mint potenciális affinitás jelölő

3.7.1. Szintézis

Mint az irodalmi áttekintésben már szó esett róla, glikozidázok esetében a katalitikus aminosavak azonosításának egyik lehetséges módja affinitás jelölők használata. Az elmúlt években számos affinitás jelölőt szintetizáltak és használtak sikerrel több glikozidáz esetében is (Plapp 1982, Black és munkatársai 1993, Tull és munkatársai 1996), a β -D-xilozidázok viszont ilyen szempontból egy teljesen felderítetlen területet képeznek. β -D-Xilozidázok katalitikus csoportjainak (karboxil oldallánc) azonosításához egy potenciális affinitás jelölőt, N-brómacetil- β -D-xilopiranozilamint (NBAXA) szintetizáltunk. A szintézis lépéseit a 19. ábra mutatja.

D-Xilóz piridin/ecetsavas (1:1) acetilezésével 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl- β -D-xilopiranozt (**2**) állítottunk elő. A **2** anomer centrumán Paulsenék (1974) módszere szerint, $(\text{CH}_3)_3\text{SiN}_3$ -dal Lewis sav (SnCl_4) jelenlétében, azidocsoportot alakítottunk ki. A reakció során 60 %-os hozammal 2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-xilopiranozil azid (**3**) képződött, amelynek acetylcsoportjait, a következő lépésben Zemplén-féle módszerrel (MeOH/NaOMe , pH 8-9) távolítottuk el. Az ily módon, 92 %-os hozammal előállított β -D-xilopiranozil azidot (**4**) katalitikus ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$) hidrogénezéssel redukáltuk. A reakcióban képződött β -D-xilopiranozilamint (**5**) instabilitása miatt nem izoláltuk, hanem – más glikozil aminokkal ellentétben – a redukciót követően közvetlenül brómacetileztük. A főtermékként izolált NBAXA-t (**6**) – tisztítása és szerkezetazonosítása után – használtuk a továbbiakban inaktivációs vizsgálatinkhoz.

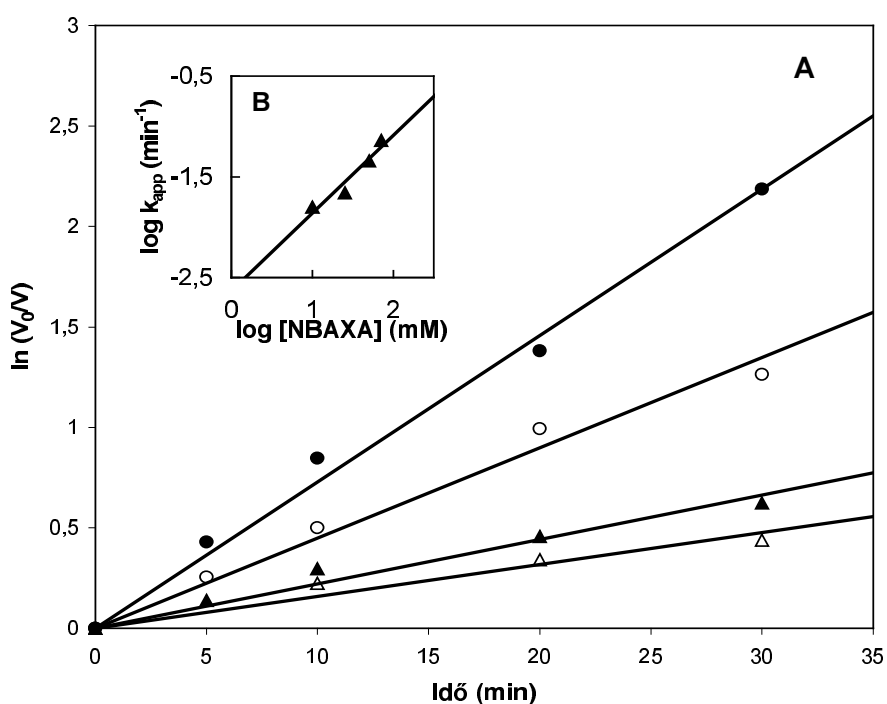


19. ábra

N-brómacetil-β-D-xilopiranozilamin (NBAXA) szintézise

3.7.2. Inaktivációs vizsgálatok

Az NBAXA inaktiválta az *A. carbonarius*-ból izolált β -D-xilozidázt. A reakció a WRK-nál tapasztaltakhoz hasonlóan hőmérsékletfüggést mutatott és csak 50 °C-on, hosszabb inkubációs idő alkalmazásával vezetett az enzim teljes inaktiválásához. A reakció kinetikáját a WRK-s módosításokhoz hasonlóan elemeztük. Az inaktiváció ebben az esetben is pszeudo-elsőrendű kinetika szerint ment végbe (20A ábra). Feltételezve, hogy az inaktivátor az enzim aktív centrumában található oldallánccal reagált, az inaktiváció kinetikai paramétereit Kitz és Wilson módszere szerint (a 3.6. fejezetben ismertetett módon) határoztuk meg (Kitz és Wilson 1962).



20. ábra

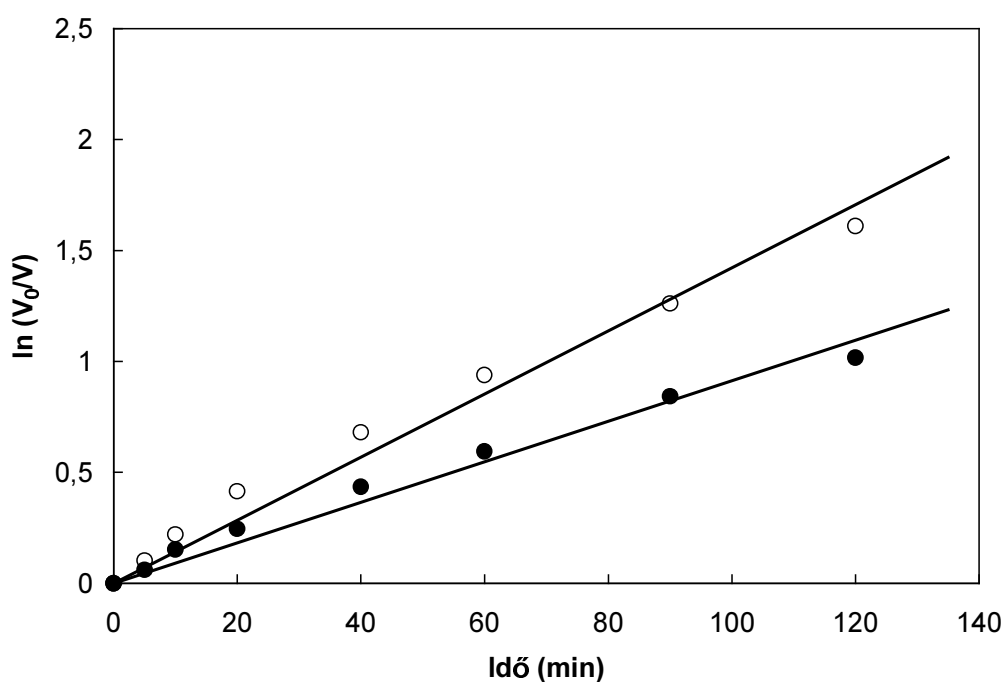
A. carbonarius β -D-xilozidázának inaktiválása NBAXA-val

- (A) Az enzim (20 $\mu\text{g/ml}$) módosítási reakcióiban a következő NBAXA koncentrációkat használtuk: 10 mM (Δ), 25 mM ($\blacktriangle$), 50 mM ($\circ$) és 70 mM ($\bullet$). A reakciókat 50 °C-on (pH 4,0) végeztük, a maradék β -D-xilozidáz aktivitást pedig a 15. ábránál megadott módon határoztuk meg.
- (B) A 20A ábra alapján számolt látszólagos sebességi állandók (k_{app}) logaritmusai az inaktivátor koncentrációk logaritmusának függvényében.

Az inaktiváció kinetikai analízise alapján a látszólagos inhibíciós állandó, $K_i = 42 \text{ mM}$, az inaktivációs sebességi állandó, $k_i = 0,08 \text{ min}^{-1}$, míg az inaktiváció hatékonyságát jellemző k_i/K_i állandó $1,90 \text{ min}^{-1}/\text{M}$ -nak adódott. Ez utóbbi egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint amit manióka β -D-glükozidázának hasonló jellegű, N-brómacetil- β -D-glükopiranozilaminnal végzett inaktivációs vizsgálatainál megállapítottak ($k_i/K_i = 0,108 \text{ min}^{-1}/\text{M}$, *p*NP-Glc szubsztrát esetén) (Keresztessy és munkatársai 1994).

A reakció rendűségét vizsgálva egyhez közeli értéket kaptunk (az egyenes meredeksége 0,77-nek adódott) (20B ábra), ami azt jelezte, hogy egy enzim molekula inaktiválásához egy NBAXA molekula szükséges.

Az NBAXA-s módosítás esetében is megvizsgáltuk, hogy kompetitív inhibitor jelenléte védelmet nyújt-e az inaktivációval szemben. Inhibítorként ez esetben is XylN_3 -ot (3 mM) alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy az inaktiváció sebessége redukálódott, a k_{app} értéke $1,41 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ -ről $9,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ -ra csökkent (21. ábra). Tehát az NBAXA a reakció során valóban egy, a β -D-xilozidáz aktív centrumában lévő oldalláncot alkilezett.



21. ábra

A β -D-xilozidáz NBAXA-val történő inaktivációja XylN_3 mint kompetitív inhibitor jelenlétében (3 mM) (●) és hiányában (○).

Az enzimet (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 25 mM NBAXA-val reagáltattuk, 50 °C-on. A jelzett időpontokban a maradék β -D-xilozidáz aktivitást a 15. ábra magyarázatánál feltüntetett módon határoztuk meg.

Habár az N-brómacetil-glikozilamin típusú affinitás jelölőket karboxil oldalláncra specifikus vegyületekként tartják számon, *Escherichia coli* β -galaktozidáza esetében metionil csoport módosulásáról számoltak be (Naider és munkatársai 1972). Annak megállapítására, hogy az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza esetében milyen jellegű oldallánc módosult, az inaktivált enzimet – az NBAXA feleslegének eltávolítása után – 2-merkaptóetanollal reagáltattuk. A tiolos reagenssel történő kezelés nem regenerálta az enzimet, bizonyítva, hogy esetünkben az NBAXA nem metionil csoportot, hanem karboxil maradékot alkilezett.

Fenti eredményeink alapján tehát megállapíthatjuk, hogy elsőként szintetizáltunk β -D-xilozidázok katalitikus csoportjának jelölésére alkalmas N-brómacetil- β -D-xilopiranozilamint. Ez a vegyület *A. carbonarius* β -D-xilozidáza esetében az enzim aktív centrumában lévő katalitikus karboxil oldalláncot módosította, ezáltal gátolva az enzim működését. Egyben lehetőséget teremtve arra, hogy az enzim szekvenálása, majd proteolitikus emésztése után pl. elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) alkalmazásával (Tull és munkatársai 1996) a módosított katalitikus csoport egyértelműen azonosítható legyen.

3.8. Inhibíciós vizsgálatok

A 3.6. és 3.7. fejezetekben ismertetett módosítások révén a β -D-xilozidáz aktív centrumában elhelyezkedő, katalitikus szerepet játszó aminosav-oldalláncokról nyertünk információkat. Az enzim működése szempontjából ugyancsak releváns a szubsztrátkötő hely feltérképezése. Ennek tanulmányozására inhibíciós vizsgálatokat végeztünk.

Már az enzim szubsztrátspecifitásának vizsgálatakor kiderült, hogy az *A. carbonarius*-ból izolált β -D-xilozidáz érzékenyen reagál a szubsztrát cukorgyűrűjének sztereokémiájára (3.4. fejezet), jelezvén a glikon rész jelentőségét a szubsztrát kötődésében. Mivel az enzim sem a *p*NP-Glc-ot, sem a *p*NP-Gal-ot nem tudta hidrolizálni, ill. sem a D-glükóz, sem a D-galaktóz nem gátolta működését, bizonyította, hogy a cukorgyűrű C-5 helyzetű hidroxilmetil csoportja feltehetően sztérikus gátat jelent, s így hiánya esszenciális a szubsztrát sikeres kötődéséhez. Ugyanakkor maga a D-xilóz hatékony, kompetitív inhibitornak bizonyult (K_i 1,9 mM, 8. táblázat). Ez élettani szempontból is jelentős lehet, hiszen a nagy mennyiségben jelenlevő xilóz, negatív feedback mechanizmus révén, szabályozni tudja a β -D-xilozidáz működését. A D-xilóz hatékony gátló hatása viszont meglepő jelenség volt a tanszékünkön korábban vizsgált glikozidázokhoz képest (*E. coli* β -D-galaktozidáz, sertés vese β -D-glükozidáz), ez esetekben ugyanis a megfelelő monoszacharid

komponens egyáltalán nem vagy alig gátolta az enzimek működését és az aglikon bázicitása, valamint hidrofóbicitása bizonyultak az inhibíció szempontjából fontos tényezőknek (Kiss és Somsák 1996, Pócsi és Kiss 1988). Ezen kísérletek analógiájára mi is kipróbáltunk több, eltérő bázicitású ill. hidrofóbicitású aglikonnal rendelkező glikozidot mint lehetséges inhibitorokat (8. táblázat). Valamennyi inhibitoroként ható vegyület kompetitív módon gátolta a β -D-xilozidázt. A vizsgált vegyületek közül a legjobb inhibitoroknak a β -D-xilopiranozil cianid (**1**) (K_i 0,29 mM), a β -D-xilopiranozil azid (**2**) (K_i 0,35 mM), valamint az 5-metil-2-(β -D-xilopiranozil)-1,3,4-oxadiazol (**3**) (K_i 0,46 mM) bizonyultak. Az *E. coli* β -D-galaktozidázától való eltérés az aglikon bázicitásának vizsgálatakor is megmutatkozott. Míg a gyengén bázikus 5-(β -D-xilopiranozil)tetrazol (**6**) (az aglikon pK_a értéke: -3) a β -xilozidáz esetében viszonylag jó inhibitornak mutatkozott, addig az analóg galaktozil vegyület nem gátolta a β -galaktozidáz aktivitását. A bázikusabb jellegű C- β -D-xilozil-formamidnál (**7**) (pK_a : -1) gyengül a β -xilozidáz gátló hatása, ugyanakkor a β -galaktozidáz esetében az analóg vegyület már közepes mértékű inhibíciót mutat (K_i 9,85 mM). A megfelelő benzotiazol származékoknál (pK_a 1,2) pedig β -D-xilozidáznál a gátlás mértékének további csökkenése, a β -D-galaktozidáznál viszont igen jelentős mértékű javulása (K_i 0,65 mM) volt megfigyelhető. Az aglikon bázikus jellegének növekedése tehát az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza esetében nem kedvez, sőt megnehezíti az E-I komplex kialakulását.

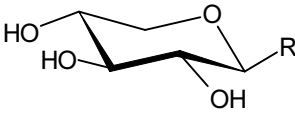
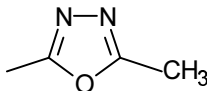
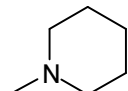
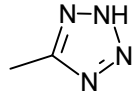
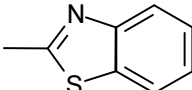
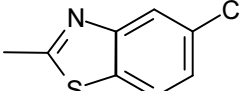
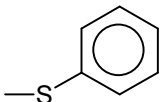
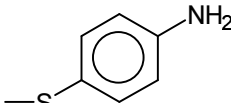
Viszonylag kevés β -D-xilozidázra, különösen fungális β -D-xilozidázra vonatkozó inhibíciós vizsgálatot végeztek eddig. A rendelkezésre álló eredmények jelentős részben különböző alkil- és aril-1-tio- β -D-xilopiranozidokra vonatkoznak. Ezek révén azt állapították meg, hogy az aglikon és az enzim aktív centruma között ható kölcsönhatások elsősorban hidrofób jellegűek és kevésbé specifikusak. Ugyanakkor a glikon rész kötődése erőteljes specifikitást mutat (Kerstens-Hilderson és munkatársai 1970). A mi megfigyeléseink is hasonló eredményre vezettek. 1-Tio-szubsztrátanalógokkal végzett kísérleteink azt mutatták (8.b táblázat), hogy az aglikon hidrofób jellege szerepet játszik a szubsztrát kötődésében (hiszen mind a metil-, mind a fenil-1-tio- β -D-xilopiranozid meglehetősen jól gátolta az enzimet), de nem befolyásolja olyan nagymértékben a kötődés erősségét, mint azt *A. niger* és *A. oryzae* β -D-xilozidázánál leírták (Kerstens-Hilderson és munkatársai 1970). Enzimünk inkább a *Penicillium wortmanni*-ből izolált β -D-xilozidázzal mutat hasonlóságot: (1) egyrészt abban, hogy a fenil-1-tio- β -D-xilopiranozid gyengébb inhibitora, mint a metil-1-tio- β -D-xilopiranozid (*P. wortmanni*-nál a K_i értékek: 9,71 és 3,06 mM, *A. carbonarius*-nál: 4,3 és 1,86 mM), (2) másrészt pedig abban, hogy a szubsztrát kötődésekor a hidrofób erők mellett valószínűleg

sztérikus tényezők és elektrosztatikus kölcsönhatások is fontos szerepet játszanak (Deleyn és munkatársai 1980). Ezt látszik igazolni az a tény is, hogy nagy térkitöltésű aglikonok alkalmazásánál lényegesen rosszabb a gátló hatás (8. táblázat: **8, 9, 12**). Ugyanakkor, míg a *P. wortmanni* β -D-xilozidázánál azt állapították meg, hogy aril-glikozidok esetében *para* helyzetű szubsztituensek nincsenek lényeges hatással a kötődésre (Deleyn és munkatársai 1980), addig esetünkben, az *A. carbonarius* β -D-xilozidázánál az egyébként is nagy méretű hidrofób aglikonoknál egy újabb szubsztituens bevezetése (pl. $-\text{NH}_2$, 8. táblázat: **11**→**12**; $-\text{Cl}$, 8. táblázat: **8**→**9**) a gátlás drasztikus csökkenését vagy teljes mértékű megszűnését eredményezte. Ezt okozhatja az aglikon kötőhely korlátozottabb mérete vagy az, hogy a szubsztituensek révén létrejövő elektroneloszlás olyan kedvezőtlen elektrosztatikus kölcsönhatások kialakulásához vezethet, amelyek miatt az adott származékok már nem képesek az enzim aktív centrumába illeszkedni. Figyelembe véve, hogy az enzim egyik legjobb szubsztrátja a *p*NP-Xyl, valószínűleg az utóbbi elképzelés a helytálló.

Tekintettel arra, hogy enzimünk esetében a szubsztrát ill. az inhibitorok kötődésében a glikon rész játszik meghatározó szerepet, ezért további vizsgálatokat végeztünk a glikozil rész változtatásával (8.c táblázat). 1,2-kettős kötés kialakítása a cukorgyűrűn belül (8. táblázat: **13, 14**) lényegesen lerontotta az inhibíció mértékét: míg a β -D-xilopiranozil cianid az enzim legjobb inhibitorának számít (K_i 0,29 mM), az 1-ciano-xilál több mint egy nagyságrenddel rosszabb gátlószernek mutatkozott (K_i 4,8 mM), maga a D-xilál pedig már egyáltalán nem gátolta az enzim működését. Mindez összhangban van azzal a megfigyeléssel, miszerint a glikálok általában rosszabbul kötődnek a glikozidázokhoz, mint a megfelelő glikozidok (Legler 1990). Ez magyarázható (1) egyrészt az anomer centrum körül, a piranózgyűrű szerkezetében kialakuló rigiditással, amely megnehezíti vagy teljesen lehetetlenné teszi a glikon kötőhelyhez való illeszkedést (Kiss és Somsák 1996), (2) másrészt a C-2 hidroxilcsoport hiányával, amely csoporttal kialakuló kölcsönhatások (pl. kulcsfontosságú hidrogénkötések) – Koshland „indukált illeszkedés” elmélete alapján – mindenképpen szükségesek a katalitikus csoportok optimális orientációjának a kialakulásához (Legler 1990, Tanaka és munkatársai 2000). Ez utóbbit igazolták a 2-dezoxi-D-xilózzal végzett kísérleteink is (8. táblázat: **15**), amelyek azt mutatták, hogy a C-2 hidroxilcsoport hiányában egyáltalán nem tudott E-I komplex kialakulni.

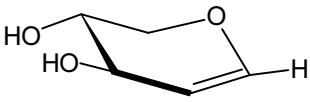
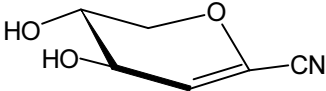
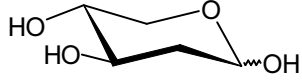
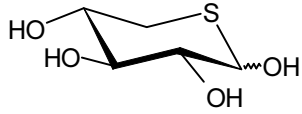
8. táblázat

A. carbonarius β -D-xilozidázának inhibíciós vizsgálataiban tesztelt vegyületek és inhibíciós hatásuk

Sorszám	Aglikon (R)		p <i>K</i> _a
<i>K_i</i> (mM)			
a)			
1	–CN	0,29	-10
2	–N ₃	0,35	
3		0,46	
4	–OH	1,9	
5		2,9	
6		3,1	-3
7	–CONH ₂	6,9	-1
8		10,4	1,2
9		nincs gátlás	
b)			
10	–SCH ₃	1,86	
11		4,3	
12		27	

8. táblázat (folyt.)

***A. carbonarius* β -D-xilozidázának inhibíciós vizsgálataiban tesztelt vegyületek és inhibíciós hatásuk**

Sorszám	Vegyület	K_i (mM)
c)		
13		nincs gátlás
14		4,8
15		nincs gátlás
16		0,99

Érdekes megfigyelésre adott alkalmat a gyűrűs oxigén kénatomra történő cseréje. Az 5-tio-D-xilóz (8. táblázat: **16**) jobb inhibitornak bizonyult (K_i 0,99 mM), mint maga a D-xilóz, ami arra utal, hogy a piránózyűrűben lévő heteroatom is érdemleges szerepet játszik a szubsztrát kötődésében. Ennek egyik lehetséges magyarázata a kén „soft” jellegéből, nagyobb mértékű deformálhatóságából adódik, amely révén a C-S kötésszög nagyobb mértékű flexibilitást mutat, mint a C-O kötésszög (Kerstens-Hilderson és munkatársai 1970), s ez elősegítheti a piránózyűrű aktív centrumba való illeszkedését.

3.9. β -D-Xilozidáz transzferáz aktivitásának vizsgálata

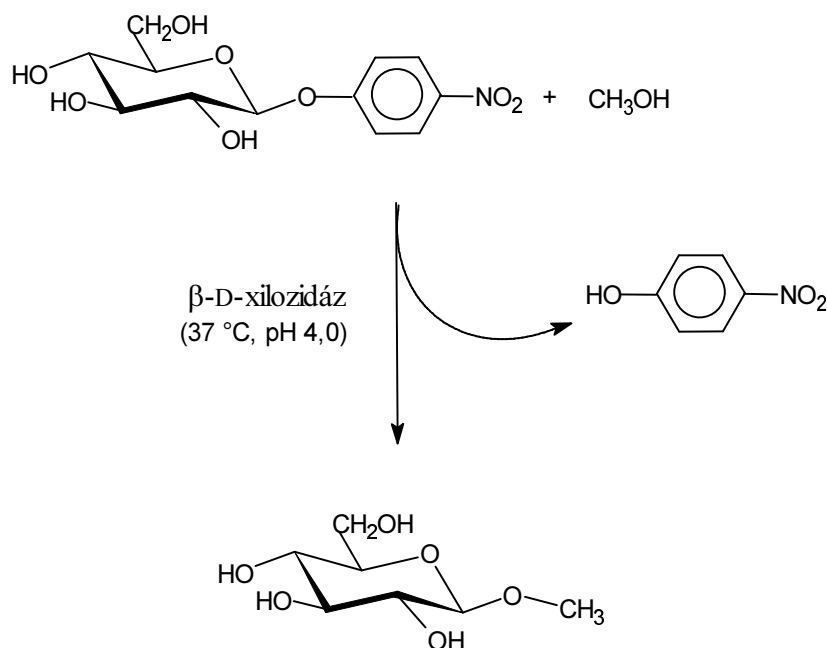
A szakirodalomban fellelhető β -D-xilozidázok egyik része inverziós, másik része retenciós mechanizmussal működik. Inverziós képviselők elsősorban baktériumokból izoláltak [*Bacillus pumilus* (Kerstens-Hilderson és munkatársai 1976), *Butyrivibrio fibrisolvens* (Braun és munkatársai 1994)], míg a retenciósok között előfordulnak mind bakteriális [*Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Armand és munkatársai 1996), *B.*

stearothemophilus (Bravman és munkatársai 2001b)], mind fungális eredetű enzimek [*Penicillium wortmanni* (Deleyn és munkatársai 1985) *Trichoderma koningii* (Li és munkatársai 2000)]. Ez utóbbi csoport tagjai, megfelelő körülmények között, általában transzglykozilezési reakciókat is képesek katalizálni. Annak érdekében, hogy meghatározzuk az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza által katalizált reakciók sztereokémiáját, transzferáz aktivitásra irányuló vizsgálatokat végeztünk.

Kísérleteinkben donorként az enzim szintetikus, kromogén szubsztrátját, a *p*NP-Xyl-ot, valamint természetes szubsztrátját, a xilobiózt használtuk. Akceptoroként részint különböző alkoholokat, részint különböző szabad cukrokat és glikozidokat alkalmaztunk. Vizsgálataink a következő eredményekre vezettek:

- 1) Kísérleteink egyik részében donorként *p*NP-Xyl-ot, akceptorokként pedig különböző alkoholokat alkalmaztunk (9. táblázat). A reakcióelegy összetételét, előzetes vizsgálataink alapján, minden esetben úgy választottuk meg, hogy a megfelelő alkohol és a Na-acetát puffer (pH 4,0) térfogati aránya 1:2 legyen (az alkohol arányának növelése lényegesen rontotta vagy teljesen megszüntette az enzim aktivitását). A reakciók vékonyréteg kromatográfiás (VRK) nyomon követése egyértelműen mutatta a *p*NP-Xyl teljes mértékű átalakulását (néhány órás, 37 °C-on történő inkubálás után), s a folyamat minden alkoholnál egy új – de D-xilózzal nem azonos – vegyület és UV aktív *p*NP keletkezéséhez vezetett. Metanol mint akceptor esetében – izolálható mennyiségű termék kinyerése céljából – nagyobb anyag mennyiségekkel is végrehajtottuk a reakciót. A tisztított termék ¹H-NMR spektroszkópiával történő szerkezetelemzése egyértelműen metil- β -D-xilopiranozid keletkezésére mutatott (22. ábra). A metil aglikon jelenlétét a 3,51 ppm-nél levő 3 proton intenzitású szingulett jel bizonyította, míg az anomer centrum β -konfigurációját az anomer proton 4,28 ppm-nél jelentkező dublettje igazolta, amelynek $J_{1,2}$ csatolási állandója (7,9 Hz) a H-1 és H-2 proton *transz*-diaxiális állására utalt.

Ezen kísérleteink eredményei tehát azt mutatták, hogy az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza *p*NP-Xyl donor és 20% (v/v) alkohol mint akceptor jelenlétében hatékonyan katalizálja a xilozil-egységek átvitelét megfelelő alkil- β -D-xilopiranozidok képződése közben. A reakciók során a szubsztrát molekula anomer centrumának konfigurációja nem változott, tehát az általunk vizsgált *A. carbonarius* β -D-xilozidáza a retenciós mechanizmussal működő ($e \rightarrow e$) glikozidázok csoportjába sorolható.



22. ábra

A. carbonarius $\beta\text{-D-xilozidáza}$ által katalizált metil- $\beta\text{-D-xilopiranozid}$ képződés

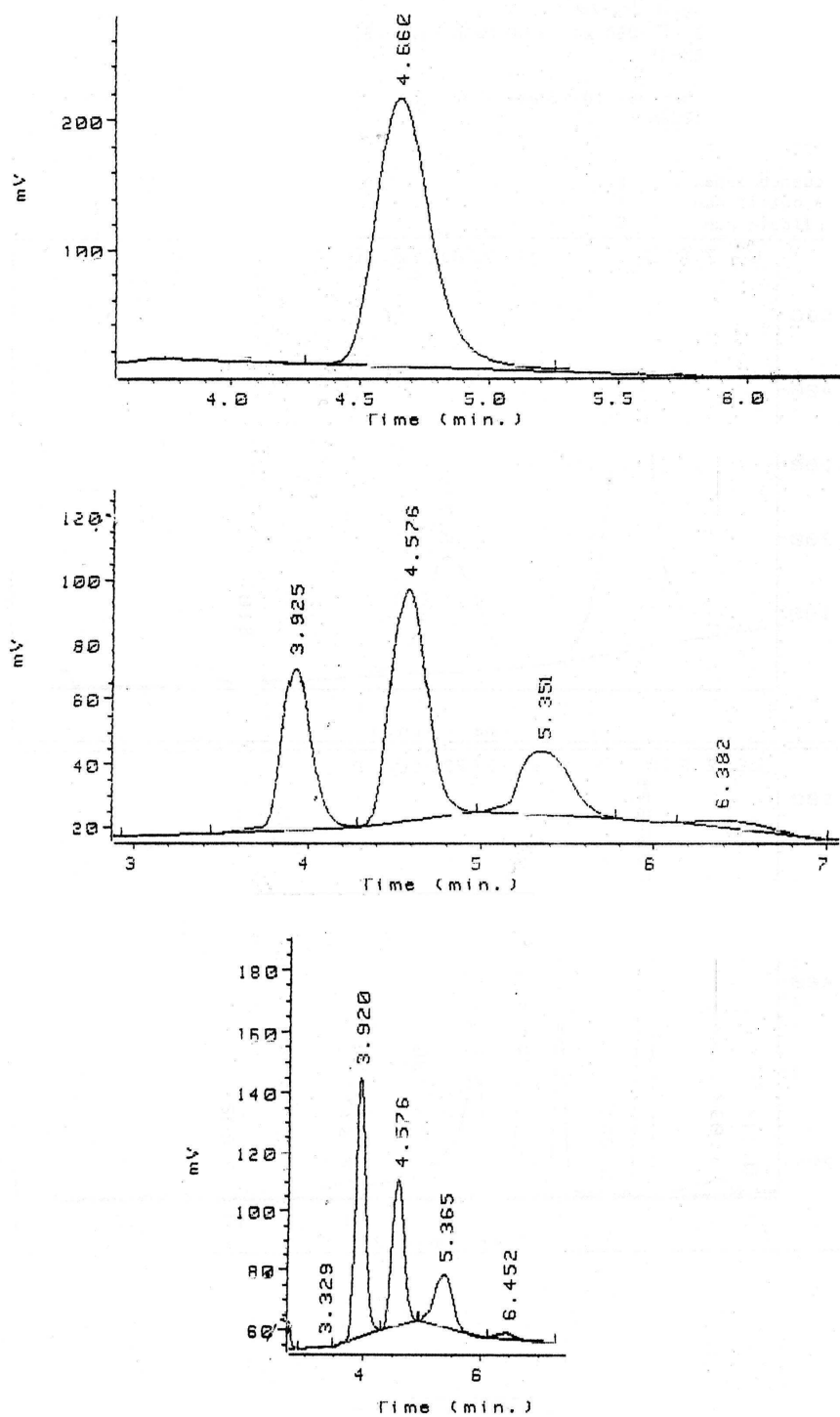
- 2) Transzferázos vizsgálataink másik részében arra vonatkozóan végeztünk előzetes kísérleteket, hogy az enzimünk a xilozil egységeket képes-e szénhidrát egységekre is átvinni. Ezáltal ugyanis az enzim kemoenzimátikus szintézisekben való felhasználására nyílhat lehetőség. Így ezen kísérleteinkben *pNP-Xyl* donor mellett – irodalmi adatok alapján (Kizawa és munkatársai 1991) – különböző szabad cukrokat (D-xilózt, D-glükózt, D-galaktózt, D-mannózt, L-arabinózt) ill. glikozidokat (pl. MeS-Xyl-ot) alkalmaztunk akceptorként (9. táblázat). Ez esetekben azonban a $\beta\text{-D-xilozidáz}$ csak hidrolitikus aktivitást mutatott és a reakciókörülmények változtatása (donor-akceptor arány, hőmérséklet, pH változtatása) sem eredményezett változást. Mivel ismeretes, hogy egyes glikozid hidrolázok szerves oldószer jelenlétében fokozottabb transzferáz aktivitást mutatnak, így a reakcióközeg változtatásával is próbálkoztunk: a Na-acetát puffer (pH 4,0) mellett különböző arányokban acetonitrilt alkalmaztunk, de transzglikozilezési reakciók ez esetekben sem játszódtak le.

9. táblázat***A. carbonarius* β -D-xilozidáz transzferáz aktivitásának vizsgálata**

Donor	Akceptor	Aktivitás jellege
<i>p</i> NP-Xyl	metanol	Transzferáz
<i>p</i> NP-Xyl	etanol	Transzferáz
<i>p</i> NP-Xyl	1-propanol	Transzferáz
<i>p</i> NP-Xyl	2-propanol	Transzferáz
<i>p</i> NP-Xyl	1-butanol	Transzferáz
<i>p</i> NP-Xyl	1-pentanol	Transzferáz
<i>p</i> NP-Xyl	1-hexanol	Transzferáz
<i>p</i> NP-Xyl	D-xilóz	Hidrolitikus
<i>p</i> NP-Xyl	MeS-Xyl*	Hidrolitikus
<i>p</i> NP-Xyl	xilobióz	Hidrolitikus
xilobióz	xilobióz	Hidrolitikus és Transzferáz
xilobióz	xilotrióz	Hidrolitikus és Transzferáz

*MeS-Xyl: metil-1-tio- β -D-xilopiranozid

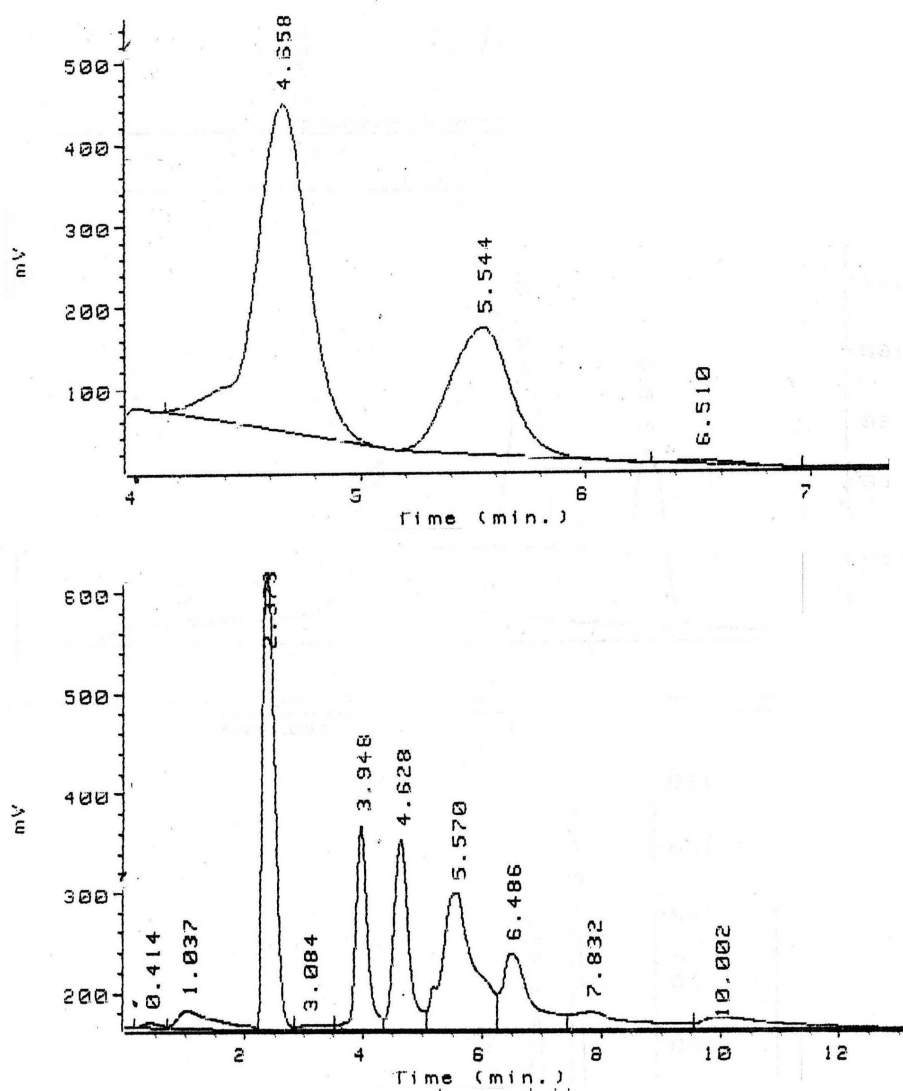
Más eredményre vezettek viszont a β -D-xilozidáz természetes szubsztrátjaival (xilobiózzal és xilotriózzal) végzett kísérleteink. Az enzim xilobióz jelenlétében a glikozidos kötés hasítása révén egyrészt xilózt termelt, másrészt az így képződő xilozil egységeket újabb xilobióz molekulákhoz kapcsolta, s ezáltal újabb molekulát, xilotriózt szintetizált. Habár a hidrolízis mértéke nagyobb volt (különösen hosszabb reakcióidő alkalmazásakor), mint a transzglikozilezése, de ez utóbbi lejátszódása is egyértelműen megmutatkozott (23. ábra). Xilobióz és xilotrióz (mint donor ill. mint akceptor) együttes alkalmazása további xilo-oligoszacharidok képződéséhez vezetett (24. ábra).



23. ábra

β -D-xilozidáz által katalizált reakciók xilobióz jelenlétében

A reakciókat (pH 4,0, 37 °C) HPLC-vel követtük nyomon. Az ábrán a reakció t = 0 min, 6 h és 23 h időpontban regisztrált állapota látható.



24. ábra

β -D-xilozidáz transzferáz aktivitásának vizsgálata xilobióz és xilotrióz jelenlétében
A reakciót (pH 4,0, 37 °C) HPLC-vel követtük nyomon. A felső ábra a reakció kiindulási állapotát mutatja (t = 0 min), az alsón pedig a 12 órával későbbi (t = 12 h) állapot látható

A 23. és a 24. ábrán látható reakcióelegyek komponensei retenciós idejük (R_t) alapján:

Xilóz: R_t : 3.925; 3.920 (23. ábra); 3.948 (24. ábra)

Xilobióz: R_t : 4.660; 4.576 (23. ábra); 4.658; 4.628 (24. ábra)

Xilotrióz: R_t : 5.351; 5.365 (23. ábra); 5.544; 5.570 (24. ábra)

A β -D-xilozidáz *p*NP-Xyl, ill. xilobióz donor jelenlétében tapasztalt eltérő viselkedését feltehetően az okozza, hogy a *p*NP-Xyl – lévén igen jó szubsztrátja az enzimnek – lényegesen gyorsabban elhidrolizál, mint ahogy a transzfer reakció lejátszódna. A xilobióz esetében viszont a hidrolízis sebessége valószínűleg összemérhető a transzglykozilezési reakció sebességével, s így lehetőség nyílik transzfer reakció végbemenetelére is. Hasonló jelenséget figyeltek meg Fang és munkatársai β -galaktozidázoknál. Az általuk vizsgált enzimek glükózamin hidroklorid akceptor mellett csak laktóz donor jelenlétében katalizálták laktózamin szintézisét, gyorsabban hidrolizáló *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (*o*NP-Gal) alkalmazásánál viszont nem (Fang és munkatársai 1998).

Ezen előzetes vizsgálataink egyértelműen azt mutatták, hogy az *A. carbonarius*-ból izolált β -D-xilozidáz, megfelelő körülmények között, képes di- vagy esetleg nagyobb tagszámú oligoszacharidok szintézisére is, amely révén a napjainkban egyre nagyobb jelentőségre szert tevő kemoenzimatis oligoszacharid szintézisek hasznos eszköze lehet.

4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. Mikroorganizmusok

Kísérleteinkhez a következő mikroorganizmusokat használtuk: *Aspergillus carbonarius* (KLU 93), *A. nidulans* (KLU 94-1), *A. niger* (KLU 94-18) és *A. oryzae* (KLU 95-62), amelyeket a Debreceni Egyetem TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszéke bocsátott a rendelkezésünkre. Valamennyi törzset Sabouraud-dextóz-agar (SDA; 4% glükóz, 1% pepton, 2% agar) ferde tenyészetben, 4 °C-on tartottunk fenn. Az átoltás 2-3 havonta történt.

4.2. Tenyésztés körülményei, enzimizálás

A kísérleteinkben használt β -D-xilozidáz tisztításához szükséges enzimkivonatot Takeneshi módosított módszerével (Takeneshi és munkatársai, 1973) nyertük. A mikroorganizmusok tenyésztéséhez használt táptalajok 100 ml (~20 g) búzakupát és 100 ml vizet tartalmaztak. A táptalajok beoltását 2 ml spóraszuszpenzióval (5×10^6 spóra/ml) végeztük, majd 27 °C-on 4 napig (ill. a tenyésztési idő hatásának vizsgálatakor 7 napig) inkubáltuk. Az inkubációt követően a tenyészeteket 100 ml desztillált vízzel, 3 órán át, 30°C-on, 170 min^{-1} fordulatszámmal extraháltuk, majd az extraktumokat szűrtük. A szűrletekhez proteázgátlónak PMSF-et adtunk (a végső koncentráció 3 mM volt). Az így kapott „nyers” enzimkivonatokat használtuk a β -D-xilozidáz tisztításához.

4.3. Enzimaktivitás mérések

4.3.1. β -D-Xilozidáz aktivitás meghatározása

A mérések során szubsztrátként *p*NP-Xyl-ot használtunk, s a hidrolízis sebességét az enzimreakció során felszabaduló *p*-nitrofenolát ionok (*p*NP) mennyiségének fotometriás mérésével határoztuk meg.

A reakcióelegy (1 ml) 0,5 mM *p*NP-Xyl-ot és megfelelő mennyiségű enzimoldatot tartalmazott 20 mM Na-acetát pufferben (pH 4,0). Az inkubációt 37 °C-on, 30 percig ill. az inaktivátoros kísérleteknél 50 °C-on, 15 percig folytattuk. A reakció leállítását 2 ml 0,2 M Na-borát pufferrel (pH 10,0) végeztük. A felszabadult *p*NP mérése 400 nm-en történt Beckman-DU[®]-65 spektrofotométerrel. Az összehasonlító oldat nem tartalmazott enzimet, a többi komponense megegyezett a mintákban levőkkel. A minták abszorbanciáját mindig 3 párhuzamos mérés átlagaként adtuk meg.

Egy U az az enzim mennyiség, amely 1 μ mol *p*NP-ot szabadít fel 1 perc alatt a fenti reakció körülmények között.

4.3.2. β -D-Glükózidáz, β -D-galaktozidáz és α -L-arabinozidáz aktivitások meghatározása

A β -D-xilozidázéval azonos, fentiekben leírt körülmények között végeztük, de szubsztrátként *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozidot (*p*NP-Glc), *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidot (*p*NP-Gal) ill. *p*-nitrofenil- α -L-arabinopiranozidot (*p*NP-Ara) használtunk.

4.4. Fehérjetartalom meghatározás

A minták fehérjetartalmát Hartree által módosított Lowry-féle módszerrel (Hartree, 1972), ill. az enzimsztítás kromatográfiás lépéseinél UV abszorbancia (280 nm) alapján határoztuk meg. A Lowry-féle módszernél marha szérum albumin (BSA) oldatsorozatot használtunk a kalibrációhoz.

4.5. Enzimsztítás

1. lépés: Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (HIC)

A hidrofób kölcsönhatás kromatográfiához Phenyl-Sepharose CL-4B típusú oszloptöltetet használtunk (1 $\times$ 8 cm), amelyet 10% (w/v) (NH₄)₂SO₄-ot tartalmazó 20 mM Na-acetát pufferrel (pH 5,0) ekvilibráltunk. A kiindulási enzimkivonathoz szilárd (NH₄)₂SO₄-ot adtunk 10% (w/v) koncentráció eléréséig 4 °C-on, kevertetés közben, majd a képződött csapadékot centrifugálva (10000 $\times$ g, 10 min) a felülúszót a hidrofób oszlopra vittük. Eluensként első lépésben az ekvilibráló pufferrel azonos oldatot (250 ml) használtunk, majd az oszlopon megkötődött enzimeket 10 $\rightarrow$ 0% (w/v) (NH₄)₂SO₄-ot tartalmazó 20 mM acetát pufferrel (pH 5,0) (150 ml), gradiens elúció révén eluáltuk az oszlopról. 120 ml/h áramlási sebességet alkalmazva 4 ml frakciókat gyűjtöttünk, majd a legmagasabb β -D-xilozidáz aktivitásúakat egyesítettük. Az így kapott eluátumot 25 mM hisztidin/HCl pufferben (pH 6,25) 4 °C-on, egy éjszakán át dializáltuk.

2. lépés: Kromatofókuszálás

A dializált enzimoldatot PBE 94 oszloptöltetre (1 $\times$ 18 cm) vittük, amelyet előzőleg 25 mM hisztidin/HCl pufferrel (pH 6,25) ekvilibráltunk. A pH gradienst 8-szoros hígítású Polybuffer 74 (pH 3,5) oldattal alakítottuk ki, 30 ml/h áramlási sebességet alkalmazva. A legmagasabb β -D-xilozidáz aktivitású frakciókat (3 ml) egyesítettük.

3. lépés: Affinitás kromatográfia

Az eljárás során alkalmazott oszloptöltetet Scouten leírása alapján (Scouten, 1981) készítettük. 10 ml Sepharose 4B gél 10 ml 1 M Na-karbonát pufferben (pH 11,0) szuszpendáltunk. A gél aktiválását 2 ml divinil-szulfonnal szobahőmérsékleten, 1 ½ órán át, enyhe kevertetés közben végeztük. Az aktivált gélhez ligandként *p*-aminofenil 1-tio- β -D-galaktopiranozidot (PAPTG) kötöttünk glicin kapcsolókaron keresztül. A kapcsolókar kialakításához az aktivált gél szűrés, majd desztillált vízzel történő mosás után 2,5 g glicint tartalmazó 10 ml 1 M Na-karbonát pufferben (pH 11,0) egy éjszakán át lassan kevertettük. A felesleges, valamint a gél felületén adszorbeálódott glicin eltávolításához a gél szűrtük, majd a következő oldatokkal mostuk át:

- a) 10 ml 1 M Na-karbonát puffer (pH 11,0)
- b) 500 ml 1 M NaCl tartalmú 0,2 M Gly/HCl puffer (pH 3,0)
- c) 500 ml 1 M NaCl oldat.

A ligand kapcsolásához a gél 20 ml desztillált vízben szuszpendáltuk, majd 200 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDAC) hozzáadása után, savas közegben (pH 4,0) 40 mg PAPTG-dal reagáltattuk. A reakció szobahőmérsékleten, enyhe kevertetés közben, kb. 4 óra alatt ment végbe. A megkötődött PAPTG mennyiségét Robinson módszerével (Robinson és munkatársai, 1972) határoztuk meg.

Az elkészített affinitási oszlopot (1×7 cm) 10 mM Na-acetát pufferrel (pH 5,0) ekvilibráltuk. A β -D-xilozidázt ugyanezen pufferrel eluáltuk az oszlopról, míg a megkötődött β -D-galaktozidázt 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 10 mM Na-acetát pufferrel (pH 5,0) távolítottuk el az oszlopról. 60 ml/h áramlási sebességet alkalmaztunk, 2 ml frakciókat gyűjtöttünk, amelyek közül a legmagasabb aktivitásúakat egyesítettük.

4.6. Molekulatömeg meghatározás

4.6.1. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A gélelektroforézist részben az enzim minták tisztaságának ellenőrzésére, részben molekulatömeg meghatározásra használtuk. Az eljárás során gradiens (5→20%) poliakrilamid géleket használtunk, amelyeket Laemmli módszere alapján készítettünk (Laemmli, 1970). A mintafelvitelt követően (kb. 30-50 μ g fehérje/minta) a futtatást gélenként 20 mA alkalmazásával és 200 V állandó egyenfeszültségen végeztük. A géllapokat Coomassie Brilliant Blue R-250 oldattal festettük 50 °C-on, 60 min-ig, majd a felesleges festék eltávolítását 2-propanol–ecetsav–desztillált víz meghatározott arányú elegyével (I. mosóoldat:

25:10:65, II. mosóoldat: 10:10:80) végeztük. Kalibrációhoz a következő molekulatömeg standard sorozatot (Pharmacia Biotech) használtuk: foszforiláz b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), szénsavanhidráz (30 kDa), szójabab tripszin inhibitor (20,1 kDa) és α -laktalbumin (14,4 kDa).

4.6.2. MALDI TOF MS módszer

A vizsgálatokat Bruker Biflex III tömegspektrométerrel végeztük. A vizsgálatokhoz affinitás kromatográfia utáni, homogén, dializált, majd liofilizált mintákat használtunk. A mintákat 0,1% TFA-t tartalmazó $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 2:1 arányú elegyében oldottuk fel (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), majd ezeket SA (sinnapic acid) mátrix-szal, 1:1 arányban hígítottuk. A kalibrációhoz BSA-t használtunk.

4.7. pH- és hőmérséklet hatás vizsgálatok

4.7.1 pH optimum és stabilitás meghatározás

Az enzimaktivitás méréseket pH 1,1-7,8 tartományban 20 mM Na-citrát/HCl puffert és 20 mM citrát-foszfát puffert használva, a 4.3.1. fejezetnél megadottak szerint (1 ml reakcióelegyben 0,5 mM *p*NP-Xyl-dal, 37 °C-on, 30 percig) végeztük. A pH stabilitás vizsgálatoknál az enzimet 24 órán át, különböző pH értékeken (2,5-7,8 pH tartományban), 4 °C-on tartottuk, majd mértük a maradék β -D-xilozidáz aktivitást (37 °C, 30 min, pH 4,0).

4.7.2. Hőmérséklet optimum és stabilitás meghatározás

A méréseket 20-80 °C tartományban, 0,5 mM *p*NP-Xyl-dal 20 mM Na-acetát pufferben (pH 4,0), 30 percig végeztük. A stabilitás vizsgálatoknál az enzimet 30 percig 4-80 °C között különböző hőmérsékleteken 20 mM Na-acetát pufferben (pH 4,0) inkubáltuk, majd mértük a maradék β -D-xilozidáz aktivitást (37 °C, 30 min, pH 4,0).

4.8. Enzimkinetikai vizsgálatok

4.8.1. Kinetikai paraméterek meghatározása

A reakciósebességet *p*NP-Xyl esetében 0,5-5 K_m , *p*NP-Ara pedig 0,5-3 K_m tartományban 6 különböző szubsztrátkoncentrációnál határoztuk meg. Az aktivitásméréseket a 4.3.1. fejezetnél megadottak szerint, 20 mM Na-acetát pufferben (pH 4,0), 37 °C-on, 30 percig tartó inkubációval végeztük. Valamennyi kísérleti adatot 3 független mérés átlagaként adtuk meg. A kísérleti adatokból a K_m és V_{max} értékeket a klasszikus Michaelis-Menten egyenlet alapján, nem lineáris regresszióval, GraFit program alkalmazásával határoztuk meg (Leatherbarrow 1990).

4.8.2. Kevert szubsztrátos mérések

A fentiekkel azonos reakciókörülményeket alkalmaztuk, a reakcióelegy azonban ez esetben állandó mennyiségű, 0,2 mM (K_m) *p*NP-Xyl-ot, valamint 2 és 18 mM közötti (0,5-3 K_m) tartományban, 6 különböző koncentrációban *p*NP-Ara-ot tartalmazott. Az elméleti görbét, a kinetikai paraméterek felhasználásával, Pócsi és Kiss módszere szerint határoztuk meg (Pócsi és Kiss 1988).

4.8.3. Inhibíciós vizsgálatok

A reakciósebességet a 8. táblázatban megadott inhibitorok felhasználásával 0,5-5 K_i tartományban 6 különböző inhibitor-koncentrációnál határoztuk meg. Szubsztrátként *p*NP-Xyl-ot használtunk 3 különböző koncentrációban, 0,5-3 K_m tartományban. Az aktivitásméréseket ez esetekben is a 4.3.1. fejezetnél megadottak szerint végeztük, kivéve a 5-klór-2-(β -D-xilozil)benztiazolt, amelynél a vegyület vizes közegben való rosszabb oldódása miatt Na-acetát puffer:DMSO 7:3 arányú elegyében végeztük a méréseket.

A K_i értékeket Dixon-féle módszerrel, GraFit program alkalmazásával határoztuk meg (Leatherbarrow 1990).

4.9. Kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata

A *p*NP-Xyl hidrolízisét jellemző kinetikai paramétereket (V_{max} , K_m) 0,5-5 K_m tartományban 6 különböző szubsztrátkoncentrációnál határoztuk meg, 50 °C-on, 30 perces inkubálással, reakcióközegként 20 mM Na-citrát/HCl puffert (pH 2,0-3,0) és 20 mM citrát foszfát puffert (pH 3,0-7,0) alkalmazva. A K_m és V_{max} értékeket a klasszikus Michaelis-Menten egyenlet alapján, GraFit program alkalmazásával, nem-lineáris regresszióval határoztuk meg. A szabad enzimre (K_{E1} , K_{E2}), valamint az E-S komplexre (K_{ES1}) jellemző savi disszociációs állandókat – diprotikus enzim modell alapján – ugyancsak nem lineáris illesztés révén adtuk meg (GraFit)(Leatherbarrow 1990).

4.10. Karboxil oldalláncok specifikus kémiai módosítása

Az *A. carbonarius* β -D-xilozidázának feltételezett karboxilcsoportjait Woodward K reagenssel, valamint glicin-metil-észter mint nukleofil jelenlétében vízzoldható karbodiimiddel (EDAC) módosítottuk (Lundblad és Noyes 1985).

A WRK-val végzett kinetikai vizsgálatoknál a reakcióelegy (1 ml) 20 μ g enzimet és 5-50 mM WRK-t tartalmazott 20 mM Na-acetát pufferben (pH 4,0); a méréseket 50 °C-on végeztük. EDAC esetében a módosítási reakciókat 2 ml desztillált vízben, 0,75-5 mM EDAC-

ot és 0,25 mM glicin-metil-észtert alkalmazva, 4,75 pH-n végeztük (a pH beállításához HCl-oldatot használtunk). A módosítások során a maradék β -D-xilozidáz aktivitás meghatározásához a reakcióelegyből meghatározott időközönként mintákat vettünk, amelyet 1 mM ($5 K_m$) *p*NP-Xyl-dal, 15 percig, 50 °C-on inkubáltunk. Az összehasonlító oldatok a WRK és EDAC kivételével ugyanazokat a komponenseket tartalmazták, mint az inaktivációs elegyek. Az inhibíciós folyamatok kinetikai paramétereit Kitz és Wilson módszere szerint határoztuk meg (Kitz és Wilson 1962). A maradék aktivitások természetes alapú logaritmusát az idő függvényében ábrázolva egyeneseket kaptunk, amelyek meredekségéből az egyes inaktivátor koncentrációkhoz tartozó látszólagos sebességi állandók (k_{app}) meghatározhatóak voltak. A módosítási reakciókat jellemző K_i (látszólagos inhibíciós állandó) és k_i (inaktivációs sebességi állandó) értékeket a WRK ill. az EDAC koncentrációk reciprokának függvényében ábrázolt $1/k_{app}$ adatok alapján tudtuk meghatározni.

A módosulások aktív centrumbeli lokalizációját kompetitív inhibitor alkalmazásával bizonyítottuk. Az inaktivációs elegyet, amely 20 μ g/ml enzimet és 20 mM WRK-t, vagy 0,25 mM glicin-metil-észtert és 3 mM EDAC-ot tartalmazott, 2 mM ($5,7 K_i$) XylN₃ jelenlétében ill. enélkül inkubáltuk. A maradék aktivitást ez esetekben is meghatározott időközönként vett mintákból (50 μ l), 1,5 mM ($7,5 K_m$) *p*NP-Xyl-dal szemben, 15 perces inkubálás után határoztuk meg.

A 3 mM EDAC-kal és 0,25 mM glicin-metil-észterrel végzett módosítás pH függését 3,5-6,5 tartományban, 7 különböző pH értéknél vizsgáltuk. Az egyes pH értékeknél kapott kísérleti adatokat a fentiekben megadott módon, Kitz és Wilson módszere (1962) alapján elemeztük. A meghatározott látszólagos sebességi állandókat a pH függvényében ábrázoltuk, s a kísérleti pontokhoz az elméleti görbét GraFit program alkalmazásával határoztuk meg (Leatherbarrow 1990).

A módosítási reakció kinetikai paramétereinek (V_{max} , K_m) meghatározásához megfelelő időközönként mintákat (200 μ l) vettünk a reakcióelegyből (1,3 ml), amely 20 mM Na-acetát pufferben (pH 5,0) 150 μ g enzimet és 50 mM WRK-t tartalmazott. A mintákban lévő WRK felesleg eltávolítását Sephadex G-25 oszlopokkal (1 $\times$ 5 cm) végeztük, amelyeket előzőleg 20 mM Na-acetát pufferrel (pH 5,0) ekvibráltunk. Az enzimet ugyanilyen pufferrel eluáltuk az oszlopról (2 ml frakciók). A *p*NP-Xyl hidrolízisének kinetikai paramétereit 0,5-5 K_m tartományban 6 különböző szubsztrátkoncentrációt használva, a fentiekben ismertetett módon (4.8.1.) határoztuk meg.

4.11. Inaktivációs vizsgálatok NBAXA-val

A kinetikai vizsgálatokat a WRK-val végzett módosításnál megadottakkal azonos körülmények között (50 °C, pH 4,0) végeztük, inaktivátorként 10-70 mM NBAXA-t használva. Az inaktiváció kinetikai paramétereit (k_{app} , K_i , k_i) szintén az előzőekben feltüntetett módon, Kitz és Wilson módszere alapján határoztuk meg.

A β -D-xilozidáz inaktivációjával szembeni védelmét kompetitív inhibitor (XylN₃) alkalmazásával hajtottuk végre. A 20 μ g enzimet és 25 mM NBAXA-t tartalmazó inaktivációs elegyet (1 ml) 3 mM (8,6 K_i) XylN₃ jelenlétében, ill. ennek hiányában inkubáltuk 50 °C-on. A maradék aktivitást ez esetekben is meghatározott időközönként vett mintákból (50 μ l), 1 mM (5 K_m) *p*NP-Xyl-dal szemben, 15 perces inkubálás után határoztuk meg.

Az enzim reaktiválásának vizsgálatát 2-merkaptoetanollal végeztük. 1 ml reakcióelegyben 20 μ g enzimet 45 mM NBAXA-val inaktiváltunk, majd a reagens felesleget Sephadex G-25 oszlop (1 $\times$ 5 cm) alkalmazásával eltávolítottuk az elegyből. Az inaktivált enzimet 100 mM 2-merkaptoetanollal, 25 °C-on, 5 órán át inkubáltuk, majd mértük a β -D-xilozidáz aktivitást.

4.12. Szintetikus módszerek

4.12.1. Általános módszerek

A reakciókat VRK segítségével Kieselgel 60 F₂₅₄ rétegen (Merck) követtük. Az előhívást 50%-os vizes kénsav oldattal történő permetezéssel, majd ezt követő melegítéssel végeztük. Az anyagok tisztítására, termékek elválasztására kristályosítást vagy oszlopkromatográfiát (Kieselgel 60, 70-320 mesh) használtunk. A fajlagos forgatóképesség értékeket Perkin-Elmer 241 polariméteren mértük, az olvadáspontokat Kofler-készülékkel határoztuk meg. A ¹H és ¹³C NMR spektrumok Brucker WP-200 SY (¹H: 200 MHz, ¹³C: 50.3 MHz) és Brucker AM-360 spektrométerrel (¹H: 360 MHz, ¹³C: 90.75 MHz) készültek.

4.12.2. NBAXA szintézise

5,025 g D-xilózt (33,5 mmol) 85 ml piridinben oldottunk, majd 85 ml ecetsavanhidrid hozzáadásával, kevertetés közben acetileztük. A reakció szobahőmérsékleten, 20 perc alatt teljes mértékben végbe ment. A reakcióelegyet vákuumban bepároltuk, majd a felesleges piridint többszöri toluolos lepárlással (60 °C-on) távolítottuk el. Ily módon 97%-os hozammal állítottunk elő 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- β -D-xilopiranózt.

4,09 g (12,85 mmol) 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- β -D-xilopiranózt 40 ml absz. DKM-ban oldottunk, majd kevertetés közben 2,57 ml (CH₃)₃SiN₃-dal 0,454 ml SnCl₄ jelenlétében reagáltattuk. A reakció szobahőmérsékleten, 1 ½ óra alatt teljes átalakulást eredményezett. A

reakcióelegyet DKM-nal hígítottuk, majd jeges vízzel, 5% NaHCO₃ oldattal, majd újra jeges vízzel semlegesre mostuk. A szerves fázist MgSO₄-tal szárítottuk és vákuumban bepároltuk. A nyersterméket MeOH-ból történő átkristályosítással tisztítottuk. Ily módon fehér, kristályos 2,3,4-tri-*O*-acetil-β-D-xilopiranozil azidot nyertünk 60%-os hozammal.

Az előállított 2,3,4-tri-*O*-acetil-β-D-xilopiranozil azid acetilcsoportjait Zemplén-féle módszerrel távolítottuk el. 1,81 g (6,02 mmol) 2,3,4-tri-*O*-acetil-β-D-xilozil azidot 25 ml absz. MeOH-ban oldottunk, NaOMe-tal 8-9 közötti pH értéket állítottunk be, majd a reakcióelegyet 1 órán át szobahőmérsékleten kevertettük. Az elegyet Amberlite IR 120 (H⁺) gyantával semlegesítettük, majd szűrtük és vákuumban bepároltuk. A képződött nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (CH₂Cl₂:MeOH, 92:8), s így 96%-os hozammal, 1,013 g XylN₃-ot nyertünk; o.p. 109-110 °C; [α]_D -54.4° (*c* 0.2, metanol); irodalmi adata: (Saman és munkatársai 1973) o.p. 109-110 °C, [α]_D²¹ -59° (*c* 1, metanol); ¹³C NMR (D₂O): δ 93.47 (C-1), 78.47, 75.43 és 71.54 (C-2, C-3 és C-4), 67.07 (C-5).

860 mg (4,9 mmol) XylN₃-ot 10 ml absz. DMF-ben oldottunk, majd Pd(OH)₂-dal (~50 mg) H₂-atmoszférában, szobahőmérsékleten, egy éjszakán át kevertettük. A redukció végbemenetelét VRK-val követtük (CH₂Cl₂:MeOH, 8:2). Ezt követően absz. piridint (9,9 mmol, 2 ekv.) és brómcetsav-anhidridet (7,69 mmol, 1,5 ekv.) adtunk a reakcióelegyhez és argon atmoszférában, 0 °C-on, 3 órán át kevertettük. Az elegyet Celiten szűrtük, a Celite ágyat MeOH-lal mostuk, majd a szűrletet vákuumban bepároltuk és többször toluolt pároltunk le róla az oldószer maradék eltávolítására. A reakcióban képződött nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (CH₂Cl₂:MeOH, 8:2), amely így szintelen szirupot, 475 mg NBAXA-t eredményezett (36%-os hozam). [α]_D +6.4° (*c* 0.3, metanol); NMR (CD₃OD); ¹H: δ 4.81 (d, 1 H, J_{1,2} 9.0 Hz, H-1), 3.83 (s, 2 H, Br-CH₂-CO); ¹³C: δ 175.65 (C=O), 82.05 (C-1), 78.67, 73.66 és 71.00 (C-2, C-3 és C-4), 68.67 (C-5), 28.78 (CH₂-Br).

Az NBAXA előállításához szükséges brómcetsav-anhidridet Thomas módszere szerint készítettük (Thomas 1977). 1,2 g brómcetsavat, argon atmoszféra alatt, 6 ml absz. széntetrakloridban oldottunk, majd az oldatot jeges vízzel 0 °C-ra hűtöttük, és állandó kevertetés mellett 1,0 g (1 ekv.) diciklohexil-karbodiimid 3,5 ml absz. széntetrakloridos oldatát adtuk hozzá. A reakcióelegyet 5 percig 0 °C-on, majd 15 percig szobahőmérsékleten kevertettük. A képződött csapadékos oldatot szűrtük és 2 × 3 ml hideg széntetrakloriddal mostuk. Az így nyert brómcetsav-anhidrid széntetrakloridos oldatát felhasználásig -18 °C-on tároltuk.

4.13. β -D-Xilozidáz transzferáz aktivitásának vizsgálata

Transzfer reakciók alkoholok jelenlétében

A reakcióelegy valamennyi esetben 100 μ l (25 mM) *p*NP-Xyl-ot és 200 μ l alkoholt (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 1-pentanol ill. 1-hexanol) tartalmazott 200 μ l 20 mM Na-acetát pufferrel (pH 4,0) elegyítve. A reakcióelegyekhez 0,013 U enzimet (100 μ l) adtunk, és 37 °C-on inkubáltuk. A reakciók menetét VRK-val követtük nyomon (CH_2Cl_2 :MeOH, 8:1).

Metil- β -D-xilopiranozid β -D-xilozidázzal történő előállítása

34 mg *p*NP-Xyl-ot 4,9 ml 20 mM Na-acetát pufferben (pH 4,0) oldottunk, majd 2,5 ml metanolt adtunk hozzá. A reakciót 0,013 U enzim (100 μ l) hozzáadásával indítottuk és 37 °C-on, 2 napig inkubáltuk. A reakció feldolgozása során az oldószert vákuumban lepároltuk, a visszamaradt anyagot pedig oszlopkromatográfiával tisztítottuk (CH_2Cl_2 :MeOH, 8:2). A termékként képződött metil- β -D-xilopiranozidot 86%-os hozammal (17,2 mg) nyertük. ^1H -NMR (D_2O): δ 4.28 ppm (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.9 Hz, H-1), 3.51 ppm (s, 3H, OMe).

Transzferáz aktivitás vizsgálata szabad cukrok és MeS-Xyl jelenlétében

A reakciókhoz donorként 25 mM *p*NP-Xyl-ot, akceptorként pedig 25 mM D-xilózt, D-glükózt, D-galaktózt, D-mannózt, L-arabínózt ill. MeS-Xyl-ot alkalmaztunk. A reakcióelegyek (1 ml) mindenesetben 0,013 U enzimet tartalmaztak. A vizsgálatok során a következő kísérleti körülményeket alkalmaztuk: (1) donor-akceptor arány 1:1, 5:1, 1:5, (2) 20 mM Na-acetát puffer (pH 4,0 ill. 5,0), 20 mM citrát-foszfát puffer (pH 6,5), (3) CH_3CN :acetát puffer (pH 4,0) 1:1 arányú elegye, (4) inkubációs hőmérséklet: 37 °C, 60 °C. A reakciók menetét VRK-val követtük nyomon (CH_2Cl_2 :MeOH:H₂O, 8:5:1).

Transzfer reakciók xilobióz jelenlétében

A vizsgálat során használt xilobiózt és xilotriózt xilán (Sigma Aldrich Ltd.) savas hidrolízisével Herrmann módszere alapján állítottuk elő (Herrmann és munkatársai 1997). A hidrolízis során nyert xilo-oligoszacharidok elkülönítését Bio-Gel P2 oszlopon (1×100 cm) végeztük eluensként desztillált vizet használva. 20 ml/h áramlási sebességet alkalmazva 1 ml frakciókat gyűjtöttünk, majd az azonos termékeket tartalmazó frakciókat egyesítettük. A frakciók tisztaságát VRK-val (n-butanol:etanol:víz, 5:5:3), ill. xilobióz és xilotrióz esetén HPLC-vel is ellenőriztük (CH_3CN :víz, 7:3).

A xilobiózzal végzett transzferáz reakciókat ugyancsak nagyfelbontású folyadékkromatográfon (Hewlett-Packard 1090 típusú) követtük. A reakciókat az enzim (0,013 U) hozzáadásával indítottuk és 37 °C-on inkubáltuk. A meghatározott időközönként vett minták (20 µl) vizsgálata LiChrospher NH₂ (250×4 mm, 5 µm) oszlopon történt, a kolonnatér hőmérséklete 40 °C volt. Az elúciót CH₃CN:víz 7:3 arányú elegyével végeztük, 1 ml/perc elúciós sebességet alkalmazva. Detektáláshoz RID detektort használtunk.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Értekezésem egy mikrobiális β -D-xilozidáz (*A. carbonarius*) izolálását, tisztítását, biokémiai jellemzését és működési mechanizmusának vizsgálatát foglalja magába.

Mikrobiális enzim izolálása céljából búzakorpás táptalajon növesztett *Aspergillus* fajok (*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*) extracelluláris β -D-xilozidáz termelését hasonlítottuk össze. A legjobb enzimforrásnak az irodalomban eddig még nem tanulmányozott *A. carbonarius* bizonyult, amely a többi fajnál 2-5-ször magasabb enzimaktivitást mutatott. Ezért, az optimális tenyésztési idő meghatározása után, további vizsgálatainkhoz *A. carbonarius* vizes búzakorpán növesztett 4 napos tenyészeit használtuk.

Az enzim tiszta, homogén formában történő kinyerésére egy gyors és hatékony tisztítási eljárást dolgoztunk ki. Ez a mindössze 3 lépést (hidrofób kromatográfiát, kromatofókuszálást és affinitás kromatográfiát) magában foglaló folyamat közel 50%-os hozammal az enzim 61-szeres tisztulását eredményezte. Az enzim tisztaságát SDS-PAGE-val ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy a tisztított β -D-xilozidáz egy monomer fehérje, amelynek molekulatömege SDS-PAGE-val meghatározva 100 kDa-nak, MALDI TOF MS technikával meghatározva pedig 108 kDa-nak adódott. Az enzim izoelektromos pontja, amelyet kromatofókuszálással határoztuk meg, pH 4,4-nél volt, vagyis enzimünk egy savas jellegű protein. Az enzim 3,0-4,0 közötti pH-tartományban működött maximális aktivitással és 3,5-6,5 tartományban bizonyult stabilnak. Hőmérsékleti optimuma 60 °C volt. A hőmérséklet stabilitási vizsgálatok alapján az enzim 30 perces inkubálás után csak 50 °C-ig volt stabil.

A tiszta enzim β -D-xilozidáz aktivitása mellett csekély α -L-arabinozidáz aktivitást is mutatott. Kevert szubsztrátos kísérletekkel igazoltuk, hogy a megfelelő szintetikus szubsztrátok (*p*NP-Xyl és *p*NP-Ara) hasítása az enzim ugyanazon katalitikus centrumában történik. Ezt a megállapítást inhibíciós méréseink is igazolták, amelyek egyben arra is rámutattak, hogy nemcsak a hasítóhely, hanem a szubsztrát kötőhely is azonos az adott szubsztrátok számára.

Meghatároztuk az *A. carbonarius* β -D-xilozidáz által katalizált reakciók jellemző kinetikai paramétereit. Az enzim K_m értéke *p*NP-Xyl szubsztrát esetében 0,198 mM, *p*NP-Ara-nál pedig 5,5 mM-nak adódott. A kinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy az enzim sokkal nagyobb affinitást mutat a *p*NP-Xyl iránt és azt sokkal hatékonyabban is hidrolizálja (V_{max}/K_m értéke is több mint egy nagyságrenddel nagyobb), mint a *p*NP-Ara-ot, vagyis a

cukorgyűrű C-4 helyzetű hidroxilcsoportjának *ekvatoriális* térállása jelentős mértékben kedvez a szubsztrát megkötésének.

A szubsztrát kötőhely feltérképezésére irányuló inhibíciós és kinetikai vizsgálataink rámutattak, hogy a szubsztrát ill. az inhibitor szénhidrát (glikon) része meghatározó szerepet játszik az aktív centrumba való kötődéskor. Hexopiranozid szubsztrátok esetén a cukorgyűrű C-5 helyzetű hidroxilmetil-csoportja valószínűleg sztérikus gátat képez a szubsztrát kötődésénél, ezért ennek hiánya esszenciális az enzim-szubsztrát (ES) ill. enzim-inhibitor komplex kialakulásához. Ugyancsak meghatározó szerepet játszik a piranózgyűrű C-2 hidroxilcsoportja, amelynek jelenléte valószínűleg az átmeneti állapotot stabilizáló, s ezáltal az ES komplex képződését elősegítő, kulcsfontosságú hidrogénkötések kialakításához szükséges. Ezt a megállapítást részint a 2-dezoxi-D-xilózzal végzett, részint az 1,2-telítetlen kötést tartalmazó inhibitorokkal végzett kísérleteink igazolták. Ez utóbbiaknál tapasztalt drasztikus enzimaktivitás csökkenéshez valószínűleg a C-2 hidroxilcsoport hiánya mellett, a piranózgyűrű C-1 körüli részében kialakult rigiditás is hozzájárult. Az 5-tio-D-xilózzal végzett kísérleteink arra utaltak, hogy a gyűrűben lévő heteroatomnak szintén érdemleges szerepe van a glikon rész kötődésében. A szubsztrát kötőhely aglikon kötőrészére irányuló vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az aglikon kötődésénél elsősorban hidrofób jellegű, valamint elektrosztatikus kölcsönhatások játszanak fontos szerepet, de sztérikus tényezők is befolyásolhatják az ES komplex kialakulását.

A katalitikus aminosav-oldalláncok felderítésére irányuló vizsgálataink során, a *pNP-Xyl* hidrolízis kinetikai paramétereinek pH függéséből származó eredmények arra utaltak, hogy a *pNP-Xyl* megkötésében egy deprotonált és egy protonált aminosav-oldallánc vesz részt, amelyek közül az egyik feltehetően egy karboxilát maradék ($pK_{E1} = 2,7$), a másik pedig egy karboxil vagy esetleg egy His imidazolil csoportja ($pK_{E2} = 6,4$). Feltételeztük továbbá, hogy a szubsztrát glikozidos kötésének hasításában egy ionizálható oldallánc – igen nagy valószínűséggel egy Glu vagy Asp karboxil oldallánc ($pK_{ES1} = 4,0$) – közreműködése elengedhetetlen.

Ezen feltételezéseink alátámasztására aminosav-oldallánc specifikus reagensekkel (WRK, EDAC) inaktivációs kísérleteket végeztünk. Ezen enzimmodosítási reakcióink bizonyították, hogy az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza valóban tartalmaz olyan karboxil oldalláncokat, amelyek működése elengedhetetlen a hatékony katalízishez, ezek közül legalább egy – igen nagy valószínűséggel Glu vagy Asp – az enzim aktív centrumában található és feltehetően protondonorként esszenciális szerepet játszik a *pNP-Xyl* glikozidos kötésének hasításában.

Az enzim katalitikus karboxilcsoportjának azonosítására egy új, potenciális affinitás jelölőt, N-brómacetil- β -D-xilopiranozilamint szintetizáltunk. Az ezzel végzett inaktivációs kísérletek eredményei bebizonyították, hogy a vegyület az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza esetében az aktív centrumban lévő katalitikus karboxil oldallánccal stabil, kovalens kötést alakított ki, s ez egyúttal lehetőséget teremt annak későbbi, az enzim szekvenálása utáni azonosítására. Ismereteink szerint ez az első β -D-xilozidázokra specifikus affinitás jelölő.

Az enzim transzferáz aktivitására irányuló vizsgálataink egyértelműen bizonyították, hogy az *A. carbonarius* β -D-xilozidáza, megfelelő körülmények között, nemcsak glikozidos kötés hidrolízisére, hanem annak kialakítására is alkalmas, s ezáltal kemoenzimatisz szintézisek hasznos eszköze lehet. Az enzim transzferáz aktivitása egyben lehetőséget teremtett az enzim által katalizált reakciók sztereokémiájának megállapítására is. Ez alapján az általunk vizsgált *A. carbonarius* β -D-xilozidáza a retenciós mechanizmussal működő ($e \rightarrow e$) glikozidázok csoportjába sorolható.

6. SUMMARY

Investigation of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*

Xylans are the most abundant renewable hemicelluloses of plant cell walls in hardwoods and cereals. The backbone of xylan is composed of β -1,4-linked D-xylopyranosyl residues. Most xylans occur as heteropolysaccharides, containing different substituent groups in the backbone chain. The structures of xylans vary depending on their origin, so it is not surprising that a complete hydrolysis of these complex molecules requires the synergistic action of several microbial enzymes. The presence of such xylan-degrading enzyme systems is quite widespread among fungi and bacteria. The most important xylanolytic enzymes are the endo- β -1,4-xylanase (EC 3.2.1.8), which hydrolyses the insoluble xylan backbone into shorter, soluble xylo-oligosaccharides, and the β -xylosidase (EC 3.2.1.37), which hydrolyses the soluble xylo-oligosaccharides and xylobiose from the nonreducing end to liberate xylose.

In the last decade the interest in xylan-degrading enzymes has greatly increased due to their potential biotechnological applications, especially in the paper and pulp industry, since the enzymatic degradation of xylan considerably facilitated pulp bleaching, decreasing both cost and environmental impact. From this point of view the most important xylanolytic enzymes are endoxylanases, however, the use of β -xylosidases is also essential for the overall conversion of xylans. Moreover, β -xylosidases play an important role in relieving the end product inhibition of endoxylanases. Despite their importance – in contrast to endoxylanase – limited information exists on the catalytic mechanism of β -D-xylosidases.

The aim of our research was a comprehensive investigation of a microbial β -D-xylosidase.

We compared the extracellular β -D-xylosidase productions of different *Aspergillus* strains (*A. carbonarius*, *A. nidulans*, *A. niger* and *A. oryzae*) grown on wheat bran medium. Among these strains *A. carbonarius*, which has not been investigated so far, proved to be the best enzyme producer (its β -D-xylosidase production was 2-5 times higher than that of the other strains), therefore this strain was selected as an enzyme source for further investigations. We determined the optimal fermentation time for the β -D-xylosidase production of *A. carbonarius*, and on the basis of these results the enzyme purification was carried out from four-day-old *A. carbonarius* cultures.

There are several publications on purification of β -xylosidases from fungi, including *Aspergillus* species, but in most cases the purification procedure is tedious. We developed a

rapid and efficient purification procedure of the β -D-xylosidase from *A. carbonarius* and we in detailed investigated its biochemical and catalytic properties. The enzyme was purified to homogeneity by using hydrophobic interaction chromatography, chromatofocusing and affinity chromatography. The procedure resulted in an overall yield of 48,5 %, and the specific activity increased 60-fold. The purified enzyme appeared as a single protein band on SDS-PAGE.

The molecular weight of the purified enzyme proved to be 100 000 Da estimated by SDS-PAGE and 108 kDa estimated by MALDI TOF. The isoelectric point of the β -D-xylosidase estimated by chromatofocusing was at pH 4.4, indicating that the enzyme was an acidic protein. The pH and temperature optimum values were 3.0–4.0 and 60 °C, respectively. The enzyme remained stable over a pH range of 3.5–6.5 and up to 50 °C for 30 min.

The purified enzyme possessed β -D-xylosidase and low α -L-arabinosidase activities, as well. In order to determine whether these activities could be attributed to a common catalytic site, mixed substrate experiments were carried out. The results revealed that a single active centre was responsible for the splitting of the both synthetic substrates. This observation was also proved by inhibition experiments.

The kinetic parameters of the β -D-xylosidase were determined by non-linear fitting of the classic Michaelis-Menten rate equation to the experimental data. The Michaelis constants (K_m) for *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside (*p*NP-Xyl) and for *p*-nitrophenyl α -L-arabinopyranoside (*p*NP-Ara) were 0.198 mM and 5.5 mM, respectively. Kinetic studies demonstrated that *p*NP-Xyl bound to the β -D-xylosidase more tightly (according to K_m) and it was hydrolysed also more efficiently (according to V_{max}/K_m) than *p*NP-Ara. However, the maximum velocity value was higher with the arabinoside substrate than with the xyloside. These facts indicated that the *equatorial* C-4 hydroxyl group on the pyranoside ring played an important role in substrate binding, while the *axial* orientation at position C-4 could be more advantageous in the splitting.

Inhibition studies with substrate analogues and with free sugars were carried out to obtain further information on the binding site in the active center of the enzyme. The results revealed that the carbohydrate moiety of the substrate (or the inhibitor) was a significant factor in the formation of the enzyme-substrate (-inhibitor) complex, in contrast to other, previously investigated β -D-glycosidases. The hydrophobicity and electronic properties of the aglycon also proved to be important for the inhibition, although steric factors cannot be neglected either.

The introduction of a 1,2-unsaturation into the molecule (e.g. D-xylal and D-xylal derivatives) drastically decreased the inhibitor activity. This is in good accordance with the fact that glycals typically bind worse to glycosidases than do the corresponding glycosides. A possible explanation of this observation could be the rigidity of structure around C-1 of the pyranose ring, thus the inhibitor cannot fit well or at all into the active centre of the enzyme. Another possibility is that interactions with the hydroxyl group at C-2 are required – in the sense of Koshland's "induced-fit" theory – for an optimal orientation of the catalytic groups with respect to the bond to be cleaved. The fact that the presence of the C-2 hydroxyl group on the sugar ring was relevant for the formation of the enzyme-inhibitor complex was also proven by the experiments with 2-deoxy-D-xylose.

Investigations with hexosides demonstrated that the lack of the C-5 hydroxymethyl group on the sugar ring was also essential for the substrate binding.

The fact that 5-thio-D-xylose was a better inhibitor of the enzyme than D-xylose itself suggested that the heteroatom in the sugar ring could play a remarkable role in the binding of the substrates or the inhibitors.

The pH dependence of kinetic parameters of the hydrolysis of *p*NP-Xyl was also determined. The pH-dependence curves gave apparent pK values of 2.7 and 6.4 for the free enzyme, while value of 4.0 was obtained for the enzyme-substrate complex using *p*NP-Xyl as a substrate. These values permit us to conclude that a carboxylate group and a protonated group – presumably another carboxyl residue or a histidine – took part in the binding of *p*NP-Xyl, while a glutamic acid or an aspartic acid residue was essential in the cleavage of the substrate.

In order to prove the assumption whether carboxyl groups are the essential ionizable groups in β -D-xylosidase, water-soluble carbodiimide (EDAC) and Woodward's reagent K (WRK) were used as selective modifying agents for these functional residues. The enzyme was rapidly inactivated by EDAC in the presence of glycine methyl ester as a nucleophile. The modification with WRK also resulted in a complete inactivation of the enzyme at 50 °C. The temperature dependence of the WRK-mediated modification is remarkable, which has not been reported so far. While a rapid inactivation took place at 50 °C, only 50 % modification could be observed at 37 °C even after 6 h incubation, and the enzyme was not inactivated at all at 25 °C. With regard to the fact that the temperature optimum of the enzyme was 60 °C, we suppose that the high temperature may promote a formation of the enzyme-substrate (ES) complex, consequently a formation of the optimal enzyme conformation for the hydrolysis.

The inactivation process exhibited pseudo-first order kinetics in both cases. Kinetic analysis of the modifications indicated that one molecule of EDAC or WRK was required to bind to the enzyme for inactivation, suggesting that at least one essential carboxyl group was present in the *A. carbonarius* β -D-xylosidase. The enzyme was protected against EDAC- and WRK-mediated modification by the presence of a competitive inhibitor (β -D-xylopyranosylazide, $K_i = 0.35$ mM) indicating that the catalytically active carboxyl group was located in the active centre of the enzyme.

In order to determine whether the modification of this carboxyl residue has an effect on substrate cleavage or on substrate binding, the changes in kinetic parameters ($V_{\max}$ and K_m) during inactivation of the enzyme were estimated. $V_{\max}$ decreased to 10% of that of the unmodified enzyme, while K_m did not change significantly. These results clearly indicated that the carboxyl group was involved in substrate cleavage and not in binding.

On the basis of EDAC- and WRK-mediated modifications and the proposed mechanism of action for the β -glycosidases, we synthesized and tested a new, potential affinity label, N-bromoacetyl- β -D-xylopyranosylamine (NBAXA) for β -D-xylosidase. The *A. carbonarius* β -D-xylosidase was irreversibly inactivated with NBAXA at 50 °C, according to pseudo-first-order kinetics. Kinetic analysis of the inactivation indicated that one molecule of the reagent was necessary for the alkylation of one molecule of the enzyme. The competitive inhibitor β -D-xylopyranosyl azide protected the enzyme from inactivation proving that the inactivation took place in the active centre. The treatment with a thiol reagent 2-mercaptoethanol (100 mM, 5 h, 25 °C) did not regenerate the enzyme excluding the participation of a methionyl group in the inactivation process in contrast to *Escherichia coli* β -D-galactosidase. According to our results NBAXA may prove to be useful for the identification of catalytically important amino acid residues of β -D-xylosidases.

The transferase activity of the β -D-xylosidase was also investigated. The enzyme could very effectively synthesize alkyl β -xylosides from *p*NP-Xyl in the presence of various alcohols (20% (v/v)). We could also observed transferase activity of the enzyme in the presence of xylobiose, however, under the same conditions *p*NP-Xyl was not an effective donor. The reason might be that the hydrolysis of *p*NP-Xyl was faster than the transxylosylation reaction. In contrast, the hydrolysis of xylobiose had a comparable rate with that of the transxylosylation. Our results indicated that the β -D-xylosidase from *A. carbonarius* operated with overall retention of the anomeric configuration and that the enzyme could be an useful tool for chemoenzymatic syntheses.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Armand, S., Vieille, C., Gey, C., Heyraud, A., Zeikus, G., and Henrissat, B. (1996) Stereochemical course and reaction products of the action of β -xylosidase from *Thermonaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. *Eur. J. Biochem.* **236**, 706-713
- Bacon, J. S. D., Gordon, A. H., Morris, E. J. and Farmer, V. C. (1975) Acetyl groups in cell wall preparations from higher plants. *Biochem. J.* **149**, 485-487
- Barry, V. C. and Dillon, T. (1940) The occurrence of xylan in marine algae. *Nature (London)* **146**, 620
- Biely, P. (1985) Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**, 286-290
- Biely, P., Mackenzie, C. R., and Schneider, H. (1988) Production of acetyl xylan esterase by *Trichoderma reesei* and *Schizophyllum commune*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 767-772
- Biely, P., Mackenzie, C. R., Puls, J., and Schneider, H. (1986) Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Bio/Technology* **4**, 731-733
- Biely, P., Puls, J., and Schneider, H. (1985) Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* **186**, 80-84
- Blake, C. C. F., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., and Sarma, V. R. (1967) Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysosyme. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **167**, 378-385
- Bodlaender, P., Feinstein, G., and Shaw, E. (1969) The use of isoxazolium salts for carboxyl group modification in proteins. Trypsin. *Biochemistry* **8**, 4941-4948
- Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., and Akin, D. E. (1991) Isolation and characterization of *p*-coumaroyl esterase from anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2337-2344
- Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., and Akin, D. E. (1992) Purification and partial characterization of two ferulic acid esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3762-3766
- Braun, C., Meinke, A., Ziser, L., and Withers, S. G. (1994) Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of both the cleavage pattern and the stereochemical outcome of the hydrolysis reactions catalyzed by various glycosidases. *Anal. Biochem.* **212**, 259-262
- Bravman, T., Mechaly, A., Shulami, S., Belakhov, V., Baasov, T., Shoham, G., and Shoham, Y. (2001a) Glutamic acid 160 is the acid-base catalyst of β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6: a family 39 glycoside hydrolase. *FEBS Letters*, **495**, 115-119

- Bravman, T., Zolotnitsky, G., Shulami, S., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., Shoham, G., and Shoham, Y. (2001b) Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS Letters*, **495**, 39-43
- Bray, M. R. and Clarke, A. J. (1990) Essential carboxy groups in xylanase A. *Biochem. J.* **270**, 91-96
- Capon, B. (1963) Intramolecular catalysis in glucoside hydrolysis. *Tetrahedron Lett.* **14**, 911-913
- Carraway, K. and Koshland, D. E., Jr. (1972) Carbodiimide modification of proteins. *Methods Enzymol.* **25**, 616-623
- CAZy – Carbohydrate-Active enZymes, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>
- Chanda, S. K., Hirst, E. L., Jones, J. K. N., and Percival, E. G. V. (1950) The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*, L.). *J. Chem. Soc.* **1950**, 1289-1297
- Chauthaiwale, J. and Rao, M. (1994) Chemical modification of xylanase from alkalothermophilic *Bacillus* species: evidence for essential carboxyl group. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**, 164-168
- Chinen, I., Oouchi, K., Tamaki, H., and Fukuda, N. (1982) Purification and properties of thermostable β -xylosidase from immature stalks of *Saccharum officinarum* L. (sugar cane). *J. Biochem.* **92** (6), 1873-1881
- Cornish-Bowden, A. (1995a) Effect of pH on enzyme kinetic constants. **In:** *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, pp. 187-192, Portland Press, London
- Cornish-Bowden, A. (1995b) Effect of pH on enzyme kinetic constants. **In:** *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, pp. 1-6, Portland Press, London
- Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. (1993a) β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 259-289
- Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. (eds.) (1993b) *Hemicellulose and Hemicellulases*, Portland Press, London
- Dekker, R. F. H. (1985) Biodegradation of hemicelluloses. **In:** *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, pp. 505-533, Higuchi, T., ed., Academic Press, New York
- Dekker, R. F. H. and Richards, G. N. (1976) Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**, 277-352

- Deleyn, F., Claeysens, M., Van Beeumen, J., and De Bruyne, C. K. (1978) Purification and properties of β -xylosidase from *Penicillium wortmanni*. *Can. J. Biochem.* **56**, 43-50
- Deleyn, F., Claeysens, M., and De Bruyne, C. K. (1980) β -D-Xylosidase from *Penicillium wortmanni*: binding and hydrolysis of alkyl and aryl 1-oxygen and 1-thio- β -D-xylopyranosides. *Can. J. Biochem.* **58**, 5-8
- Deleyn, F., Claeysens, M., and De Bruyne, C. K. (1985) Transfer reactions catalyzed by β -D-xylosidase from *Penicillium wortmanni*. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 204-211
- Deobald, L. A. and Crawford, D. L. (1987) Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 158-163
- Deshpande, V. V., Hinge, J., and Rao, M. (1990) Chemical modification of xylanases: Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. *Biochim. Biophys. Acta* **1041**, 172-177
- Donnelly, P. K. and Crawford, D. L. (1988) Production by *Streptomyces viridosporus* T7A of an enzyme which cleaves aromatic acids from lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2237-2244
- Eda, S., Ohnishi, A., and Kato, K. (1976) Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 359-364
- El Ashry, E. S. H., Rashed, N., and Shobier, A. H. S. (2000) Glycosidase inhibitors and their chemotherapeutic value, part 1, 2, 3. *Pharmazie* **55**, 251-262, 331-348, 403-415
- Ericksson, K.-E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. (eds.) (1990) *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, Springer-Verlag, Berlin
- Ermert, P., Vasella, A., Weber, M., Rupitz, K., and Withers, S. G. (1993) Configurationally selective transition state analogue inhibitors of glycosidases. A study with nojiritetrazoles, a new class of glycosidase inhibitors. *Carbohydr. Res.* **250**, 113-128
- Fang J., Xie, W., Li, J., and Wang, P. G. (1998) Chemical and enzymatic synthesis of glycoconjugates 3: Synthesis of lactosamine by thermophilic galactosidase catalyzed galactosylation on a multigram scale. *Tetrahedron Lett.* **39**, 919-922
- Filho, E. X. F., Puls, J., and Coughlan, M. P. (1993) Physicochemical and catalytic properties of a low-molecular-weight endo-1,4- β -D-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 535-540
- Fukuda, M., Muramatsu, T., and Egami, F. (1969) β -Xylosidase from the liver of *Charonia lampas*. *J. Biochem.* **65**, 191-199

- Garcia-Campayo, V. and Wood, T.M. (1993) Purification and characterisation of a β -D-xylosidase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *Carbohydr. Res.* **242**, 229-245
- Golubev, A. M., Brandão Neto, J. R., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. V., Kerzhner, M. A., Neustroev, K. N., and Polikarpov, I. (2000) Purification, crystallization and preliminary X-ray study of β -xylosidase from *Trichoderma reesei*. *Acta Cryst.* **D56**, 1058-1060
- Golubev, A. M., Ibatullin, F. M., Kilimnik, A. Y., Radionova, N. A. and Neustroev, K. N. (1993) Isolation and properties of endoxylanase and β -xylosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biochemistry (Russia)* **58**, 565-570
- Gómez, M., Isorna, P., Rojo, M., and Estrada, P. (2001) Chemical mechanism of β -xylosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414: pH-dependence of kinetic parameters. *Biochimie* **83** (10), 961-967
- Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427
- He, S. and Withers, S. G. (1997) Assignment of sweet β -glucosidase as a family 1 glucosidase and identification of its active site nucleophile. *J. Biol. Chem.* **272**, 24864-24867
- Heightman, T. D. and Vasella, A. T. (1999) Recent insights into inhibition, structure, and mechanism of configuration-retaining glycosidases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 750-770
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696
- Herrmann, M.C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P., and Kubicek, C.P. (1997) The β -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional β -D-xylan xylohydrolase. *Biochem. J.* **321**, 375-381
- Hoare, D. G. and Koshland, D. E., Jr. (1966) A procedure for the selective modification of carboxyl groups in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2057-2058
- Howard, S., He, S., and Withers, S. G. (1998) Identification of the active site nucleophile in jack bean α -mannosidase using 5-fluoro- β -L-gulosyl fluoride. *J. Biol. Chem.* **273**, 2067-2072

- Johannson, M. H. and Samuelson, O. (1977) Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. *Wood Sci. Technol.* **11**, 251-263
- Johnson, D. G., Silva, M. C., Mackenzie, C. R., Schneider, H., and Fontana, J. D. (1989) Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**, 245-258
- Joshi, M. D., Sidhu, G., Pot, I., Brayer, G. D., Withers, S. G., and McIntosh, L. P. (2000) Hydrogen bonding and catalysis: a novel explanation for how a single amino acid substitution can change the pH optimum of a glycosidase. *J. Mol. Biol.* **299**, 255-279
- Kaji, A. and Saheki, T. (1975) Endo-arabinase from *Bacillus subtilis* F-11. *Biochim. Biophys. Acta* **410**, 354-360
- Kaji, A. and Tagawa, K. (1970) Purification, crystallization, and amino acid composition of α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* **207**, 456-464
- Kaneko, S., Shimasaki, T., and Kusakabe, I. (1993) Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1161-1165
- Keleti, T. (1985) A pH hatása az enzimreakció sebességére. **In:** *Enzimkinetika*, pp. 252-258 Tankönyvkiadó, Budapest
- Keresztessy, Zs. and Kiss, L. N-Bromoacetyl- β -D-glycopyranosylamines as probes of the mechanism of action of β -D-glycosidases. *Biochim. Biophys. Acta* (submitted)
- Keresztessy, Zs., Kiss, L., and Hughes, M. A. (1994) Investigation of the active site of the cyanogenic β -D-glucosidase (Linamarase) from *Manihot esculenta* Crantz (Cassava). II. Identification of Glu-198 as an active site carboxylate group with acid catalytic function. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 323-330
- Kerstens-Hilderson, H., Claeysens, M., Loontjens, F. G., Kryński, A., and De Bruyne, C. K. (1970) Chain length effects of *n*-alkyl 1-oxygen- and *n*-alkyl 1-thio- β -D-xylopyranosides on β -D-xylosidases. *Eur. J. Biochem.* **12**, 403-409
- Kerstens-Hilderson, H., Claeysens, M., Van Doorslaer, E., and De Bruyne, C. K. (1976) Determination of the anomeric configuration of D-xylose with D-xylose isomerases. *Carbohydr. Res.* **47**, 269-273
- Kerstens-Hilderson, H., Van Doorslaer, E., Lippens, M., and De Bruyne C. K. (1984) The pH dependence and group modification of β -D-xylosidase from *Bacillus pumilus*: evidence for sulfhydryl and histidyl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 61-72

- Keskar, S. S., Srinivasan, M. C., and Deshpande, V.V. (1989) Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. *Biochem. J.* **261**, 49-55
- Kiss, L. and Somsák, L. (1996) Evaluation of C-(β -D-galactosyl) and C-(2-deoxy-D-*lyxo*-hex-1-enopyranosyl) (D-galactal type) derivatives as inhibitors of β -D-galactosidase from *Escherichia coli*. *Carbohydr. Res.* **291**, 43-52
- Kiss, L., Kóródi, I., and Nánási, P. (1981) Study on the role of tyrosine side-chains at the active centre of emulsin β -D-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta* **662**, 308-311
- Kitz, R. and Wilson, I. B. (1962) Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **237**, 3245-3251
- Kizawa, H., Shinoyama, H., and Yasui, T. (1990) The synthesis of new xylosyloligosaccharides by transxylosylation with *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 671-678
- Komae, K., Kaji, A., and Sato, M. (1982) An α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1899-1905
- Komissarov, A. A., Romanova, D. V., and Debabov, V. G. (1995) Complete inactivation of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by modification of Asp⁵ with Woodward's reagent K. *J. Biol. Chem.* **270**, 10050-10055
- Kormelink, F. J. M., Gruppen, H., Viëtor, R. J. and Voragen, A. G. J. (1993) Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. *Carbohydr. Res.* **249**, 355-367
- Koshland, D. E. (1953) Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* **28**, 416-436
- Krengel, U. and Dijkstra, B. W. (1996) Three dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*. Molecular basis for its low pH optimum. *J. Mol. Biol.* **263**, 70-78
- Kulkarni, N., Shendye A. and Rao, M. (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 411-456
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Leatherbarrow, R.J. (1990) *Grafit Version 2.0*, Erithacus Software Ltd., Staines, UK.
- Legler, G. (1990) Glycoside hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **48**, 319-384

- Legler, G. (1993) Mechanism of enzymic glycoside hydrolysis and of glycosyl transfer by glycosidases and glycosyltransferases. *Carbohydr. Res.* **250**, vii-xx
- Legler, G., Sinott, M. L., and Withers, S. G. (1980) Catalysis by β -glucosidase A₃ of *Aspergillus wentii*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* **9**, 1376-1383
- Li, Y. K., Yao, H. J., and Cho, Y. T. (2000) Effective induction, purification and characterization of *Trichoderma koningii* G-39 β -D-xylosidase with high transferase activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 119-125
- Lincoln, T. and Honigman, W. A. (1976) Production of cell wall hydrolyzing enzymes by barley aleurone layers in response to gibberellic acid. *Plant. Physiol.* **58**, 380-386
- Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1985) The modification of carboxyl groups. **In:** *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vol. II, pp. 105-122, eds., CRC Press, New York
- Mackenzie, C. R. and Bilous, D. (1988) Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1170-1173
- Mai, V., Wiegel, J., Lorenz, W. W. (2000) Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase-arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Gene* **247**, 137-143
- Matsuo, M. and Yasui, T. (1984) Purification and some properties of β -xylosidase from *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1845-1852
- Matte, A. and Forsberg, C. W. (1992) Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 157-168
- McCarter, J. D. and Withers, S. G. (1996) Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* α -glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* **271**, 6889-6894
- Miao, S., Ziser, L., Aebersold, R., and Withers, S. G. (1994) Identification of glutamic acid 78 as the active site nucleophile in *Bacillus subtilis* xylanase using electrospray tandem mass spectrometry. *Biochemistry* **33**, 7027-7032
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R. D., Harris, P. J. and Curzon, E. H. (1986) Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* **148**, 71-85
- Naider, F., Bohak, Z., and Yariv, J. (1972) Reversible alkylation of a methionyl residue near the active site of β -galactosidase. *Biochemistry* **11**, 3202-3208

- Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., and Kawamura, Y. (1990) Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J. Bacteriol.* **172**, 6669-6672
- Nath, D. and Rao, M. (1998) Structural and functional role of tryptophan in xylanase from an extremophilic *Bacillus*: Assessment of active site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 207-212
- Nishitani, K. and Nevins, D. J. (1991) Glucuronoxylan xylanohydrolase: a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *J. Biol. Chem.* **266**, 6539-6543
- Oguntimein, G. B. and Reilly, P. J. (1980) Purification and immobilization of *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 1127-1142
- Olczyk, K., Drozd, M., Kucharz, E., Piwowarczyk, B., Kardaszewicz, E., and Harbut-Grylka, A. (1984) Studies on the activity of selected lysosomal exoglycosidases in patients with systematic lupus erythematosus. *Med. Interne.* **22(3)**, 221-225
- Öczan, S., Kötter, P., and Ciriacy, M. (1991) Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 190-195
- Patel, V. and Tappel, L. A. (1969) β -Glucosidase and β -xylosidase of rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 653-662
- Paulsen, H., Györgydeák, Z., and Friedmann, M. (1974) *exo*-Anomerer Effekt und Circular dichroismus von Glycopyranosylaziden. *Chem. Ber.* **107**, 1568-1578
- Peller, L. and Alberty, R. A. (1959) Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics. I. The mechanism involving a single substrate and product. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5907-5914
- Pétra, H. P. (1971) Modification of carboxyl groups in bovine carboxypeptidase A. I. Inactivation of the enzyme by N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate (Woodward's reagent K). *Biochemistry*, **10**, 3163-3170
- Phillips, D. C. (1966) The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.* **215**, 78-90
- Plapp, B. V. (1982) Application of affinity labeling for studying structure and function of enzymes. *Methods Enzymol.* **87**, 469-499
- Pócsi, I. and Kiss, L. (1988) Kinetic studies on the broad-specificity β -D-glucosidase from pig kidney. *Biochem. J.* **256**, 139-146
- Poutanen, K. (1988) An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.* **7**, 271-282

- Poutanen, K. and Puls, J. (1988) Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 425-432
- Poutanen, K., Sundberg, M., Korte, H., and Puls, J. (1990) Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 506-510
- Puls, J. and Schuseil, J. (1993) Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. **In:** *Hemicellulose and Hemicellulases*, pp. 1-27, Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P., eds., Portland Press, London
- Puls, J., Poutanen, K., Schmidt, O., and Linko, M. (1986) α -1,2-Glucuronidase in the hydrolysis of hemicellulose. **In:** *Proc. 3rd Int. Conf. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, pp. 93-95, Ericksson, K. E.-E. and Ander, P., eds., STFI, Stockholm
- Puls, J., Schmidt, O., and Granzow, C. (1987) α -Glucuronidases in two microbial xylanolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 83-88
- Robinson, D. and Abrahams, H. E. (1967) β -D-Xylosidase in pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 212-214
- Robinson, P. J., Dunnill, P., and Lilly, M. D. (1972) Factors affecting scale-up of affinity chromatography of β -galactosidase. *Biochim. Biophys. Acta* **285**, 28-35
- Rodionova, N. A., Tavobilov, I. M., and Bezborodov, A. M. (1983) β -Xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. *J. Appl. Biochem.* **5**, 300-312
- Rye, C. S. and Withers, S. G. (2000) Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 573-580
- Saman, E., Claeysens, H., Kersters-Hilderson, H. and De Bruyne, C. K. (1973) Azido compounds as potential affinity labels for glycosidases. *Carbohydr. Res.* **30**, 207-210
- Saxena, S., Fierobe, H.-P., Gaudin, C., Guerlesquin, F., and Belaich, J.-P. (1995) Biochemical properties of a β -xylosidase from *Clostridium cellulolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3509-3512
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.-Y., Guittett, E. and Rolando, C. (1985) Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* **24**, 1359-1362
- Scouten, W. H. (1981) Synthetic methods. **In:** *Affinity Chromatography. Bioselective adsorption on inert matrices*, pp. 52, 78-80, Wiley, J. and Sons, eds., New York
- Sinha, U. and Brewer, J. M. (1985) A spectrophotometric method for quantitation of carboxyl group modification of proteins using Woodward's reagent K. *Anal. Biochem.* **151**, 327-333

- Sinnott, M. L. (1987) Glycosyl group transfer. **In:** *Enzyme mechanisms*, pp. 259-297, Page M. I. and Williams, A., eds., Royal Society of Chemistry, London
- Sinnott, M. L. (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202
- Sinnott, M. L. and Tzotzos, G. T. (1982) Effect of aryl substituents on the kinetics of inactivation of glycosidases by glycosylmethylaryltriazenes: examination of the “suicide” nature of these inactivations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* **507**, 1665-1670
- Stephen, A. M. (1983) D-Xylans. **In:** *Polysaccharides*, Vol. 2, pp. 166-178, Aspinall, G. O., ed., Academic Press, New York
- Stephens, M. C., Bernatsky, A., Legler, G., and Kanfer, J. N. (1979) Studies on the possible identity of particulate β -glucosidase and β -xylosidase of mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 70-78
- Sunna, A. és Antranikian, G. (1997) Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 39-67
- SWISS-PROT Protein Sequence database (<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>)
- Takenishi, S. and Tsujisaka, Y. (1975) On the modes of action of three xylanases produced by a strain of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Agric. Biol. Chem.* **39**, 2315-2323
- Takenishi, S., Tsujisaka, Y., and Fukumoto, J. (1973) Studies on hemicellulases IV. Purification and properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus niger* van Tieghem. *J. Biochem.* **73**, 335-343
- Tanaka, K. S. E., Zhu, J., Huang, X., Lipari, F., and Bennet, A. J. (2000) Glycosidase-catalyzed hydrolysis of 2-deoxyglucopyranosyl pyridinium salts: effect of the 2-OH group on binding and catalysis. *Can. J. Chem.* **78**, 577-582
- Tenkanen, M., Luonteri, E., Teleman, A. (1996) Effect of side groups on the action of β -xylosidase from *Trichoderma reesei* against substituted xylo-oligosaccharides. *FEBS Lett.* **399**, 303-306
- Tezuka, K., Hayashi, M., Ishihara, H., Nishimura, M., Onozaki, K., and Takahashi, N. (1993) Purification and substrate specificity of β -xylosidase from sycamore cell (*Acer pseudoplatanus* L.): application for structural analysis of xylose-containing N-linked oligosaccharides. *Anal. Biochem.* **211**, 205-209
- Thomas, E. W. (1977) Carbohydrate binding sites. *Methods Enzymol.* **46**, 363-368
- Tipton, K. F. and Dixon, H. B. F. (1979) Effects of pH on enzymes. *Methods Enzymol.* **63**, 183-234

- Torronen, A., Harkki, A., and Rouvinen, J. (1994) Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. *EMBO J.* **13**, 2493-2501
- Tull, D., Burgoyne, D. L., Chow, D. T., Withers, S. G., and Aebersold, R. (1996) A mass spectrometry-based approach for probing enzyme active sites: identification of Glu 127 in *Cellulomonas fimi* exoglycanase as the residue modified by *N*-bromoacetyl cellobiosylamine. *Anal. Biochem.* **234**, 119-125
- Tuohy, M. G., Puls, J., Claeysens, M., Vrsanskás, M., and Coughlan, M. P. (1993) The xylan-degrading enzyme system of *Talaromyces emersonii*: novel enzymes with activity against aryl β -D-xylosides and unsubstituted xylans. *Biochem. J.* **290**, 515-523
- Uziie, M., Matsuo, M., and Yasui T. (1985) Possible identity of β -xylosidase and β -glucosidase of *Chaetomium trilaterale*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1167-1173
- van Peij, N. N., Brinkmann, J., Vrsanska, M., Visser, J., and de Graaff, L. H. (1997) β -Xylosidase activity, encoded by xlnD, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. *Eur. J. Biochem.* **245**, 164-173
- Vikarii, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M. (1994) Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 335-350
- Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J. (eds.) (1992) *Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam
- Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R., and Withers, S. G. (2001) Catalysis by lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412**, 835-838
- Vocadlo, D. J., Mackenzie, L. F., He, S., Zeikus, G. J., and Withers S. G. (1998) Identification of Glu-277 as the catalytic nucleophile of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* β -xylosidase using electrospray MS. *Biochem. J.* **335**, 449-455
- Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J., and Yaguchi, M. (1994) Mutational and crystallographic analysis of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* **3**, 467-475
- Wen, L., Miao, Z. W., and Qing, W. D. (1999) Chemical modification of xylanase from *Trichosporon cutaneum* shows the presence of carboxyl groups and cysteine residues essential for enzyme activity. *J. Protein Chem.* **18**, 677-686
- Whistler, R. L. and Richards, E. L. (1970) Hemicelluloses. **In:** *The Carbohydrates*, Vol. 2a, pp. 447-469, Pigman, W. and Horton, D., eds., Academic Press, New York

- Withers, S. G. (1999) Understanding and exploiting glycosidases. *Can. J. Chem.* **77**, 1-11
- Withers, S. G. (2001) Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr. Polym.* **44**, 325-337
- Wolf, B., Lesnaw, J. A., and Reichmann, M. E. (1970) A mechanism of the irreversible inactivation of bovine pancreatic ribonuclease by diethylpyrocarbonate. A general reaction of diethylpyrocarbonate with proteins. *Eur. J. Biochem.* **13**, 519-525
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. (1988) Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: function and application. *Microbiol. Rev.* **52**, 305-317
- Wood, T. M. and McCrae, S. I. (1986) Studies of two low-molecular-weight endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-xylanases constitutively synthesized by the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *Carbohydr. Res.* **148**, 321-330
- Woodward, J. (1984) Xylanases: functions, properties and applications. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* **8**, 9-30
- Woodward, R. B. and Olofson, R. A. (1966) The reaction of isoxazolium salts with nucleophiles. *Tetrahedron Suppl.* **7**, 415-440
- Yamamoto, K., Li, S., and Li, Y. (2000) β -Xylosidase. **In:** *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Part II., Vol. 3, pp. 505, Ernst, B., Hart, G. W., Sinaý, P., eds., Wiley Verlag, Weinheim
- Zechel, D. L. and Withers, S. G. (2000) Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* **33**, 11-18
- Zechel, D. L. and Withers, S. G. (2001) Dissection of nucleophilic and acid-base catalysis in glycosidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 573-580
- Ziser, L., Setyawati, I., and Withers, S. G. (1995) Syntheses and testing of substrates and mechanism-based inactivators for xylanases. *Carbohydr. Res.* **274**, 137-153
- Zong, N. and Yasui, T. (1989) Purification and some properties of an α -D-xylosidase from *Bacillus* sp. No. 693-1. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 187-195
- Zong, N., Nakanishi, K., Yasui, T., and Yamasato, K. (1988) Isolation and characterization of bacteria which produce α -xylosidase and cultural conditions for enzyme production. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 3043-3050

8. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Tünde Kiss** and László Kiss

Purification and characterisation of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*

World Journal of Microbiology and Biotechnology (2000) **16(5)**, 465-470

2. **Tünde Kiss**, Anikó Erdei and László Kiss

Investigation of the active site of the extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*

Archives of Biochemistry and Biophysics, (2002) **399(2)**, 188-194

3. **Tünde Kiss**, Andrea Székely, Marietta Tóth, László Somsák, László Kiss

Inhibition of β -D-xylosidase (EC 3.2.1.37) from *Aspergillus carbonarius* by β -D-xylopyranose and D-xylal derivatives

Carbohydrate Research, közlés alatt

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

4. **Kiss Tünde**, Gyémánt Gyöngyi, Dános Béla és Nánási Pál

A *Glycyrrhiza glabra* L. és a *Glycyrrhiza echinata* L. poliszacharidjainak vizsgálata
Gyógynövény poliszacharidok II.

Acta Pharmaceutica Hungarica (1998) **68**, 263-268

5. Marcelis van der Stelt, Minke A. Noordermeer, **Tünde Kiss**, Guus van Zadelhoff, Ben Merghart, Gerrit A. Veldink, Johannes F. G. Vliegthart

Formation of a new class of oxylipins from N-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway

European Journal of Biochemistry (2000) **267**, 2000-2007

6. Zoltán Nagy, **Tünde Kiss**, Attila Szentirmai and Sándor Biró
 β -Galactosidase of *Penicillium chrisogenum*: Production, purification and characterisation of the enzyme
Protein Expression and Purification, (2001) **21**, 24-29

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

1. **Kiss Tünde** és Kiss László
*Aspergillus carbonarius*ból izolált β -xilozidáz enzim szubsztrátspecifitása és kinetikai vizsgálata
MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottsága 1997. évi előadói ülése, 1997. május 21-22, Mátrafüred
2. László Kiss and **Tünde Kiss**
Purification, substrate specificity and kinetic investigation of β -xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
3rd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, 6-9 July, 1997, Pécs, Hungary
3. **Tünde Kiss**, László Kiss and Göte Johansson
Purification of β -xylosidase by partitioning in aqueous two-phase systems
Annual Meeting of the Committee of Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, 26-27 May 1999, Mátrafüred, Hungary
4. **Tünde Kiss** and László Kiss
Purification and characterisation of an extracellular β -xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, June 19-24, 1999, Nice, France

5. **Tünde Kiss**, Andrea Székely, László Somsák and László Kiss
Synthesis of xylosidase inhibitors and their enzymatic investigations using β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*
20th International Carbohydrate Symposium, August 27-September 1, 2000, Hamburg, Germany

6. **Kiss Tünde**, Kiss László
Aspergillus carbonarius-ből izolált extracelluláris β -D-xilozidáz vizsgálata
IX. Fermentációs Kollokvium, 2000. október 5-8, Debrecen
Acta Biol. Debrecina (2000) 140-144

***Aspergillus carbonarius*-ból izolált extracelluláris β -D-xilozidáz
működési mechanizmusának vizsgálata**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a KÉMIA tudományágban

Írta: KISS TÜNDE
okleveles biológia-kémia szakos tanár, német-magyar szakfordító

Készült a Debreceni Egyetem KÉMIA doktori programja
(K/5 alprogramja) keretében

Témavezető: DR. KISS LÁSZLÓ

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök:	Dr. Lipták András	
Tagok:	Dr. Somsák László	
	Dr. Hoschke Ágoston	

A doktori szigorlat időpontja: 2000. július 4.

Az értekezés bírálói:

Dr.	
Dr.	

A bírálóbizottság:

Elnök:	Dr.	
Tagok:	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	

Az értekezés védésének időpontja: 2002